

MONIQUE CRISTINE RODRIGUES JURAS

**Efeito do etileno sobre o desenvolvimento de
Zygopetalum maxillare Lodd. e *Epidendrum
denticulatum* Barb. Rodr.**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da
Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente,
como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de DOUTOR em
BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO
AMBIENTE, na Área de Concentração de
Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2019

MONIQUE CRISTINE RODRIGUES JURAS

**Efeito do etileno sobre o desenvolvimento de
Zygopetalum maxillare Lodd. e *Epidendrum
denticulatum* Barb. Rodr.**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da
Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente,
como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de DOUTOR em
BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO
AMBIENTE, na Área de Concentração de
Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADOR: DR. ROGÉRIO MAMORU SUZUKI

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Juras, Monique Cristine Rodrigues

J95e Efeito do etileno sobre o desenvolvimento de *Zygopetalum maxillare* Lodd. e *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. / Monique Cristine Rodrigues Juras -- São Paulo, 2019.
87p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente, 2019.
Bibliografia.

1. Hormônio vegetal. 2. Germinação de sementes. 3. Organogênese direta.
I. Título.

CDU: 631.53.01

*“E aqueles que foram vistos dançando foram
julgados insanos por aqueles que não podiam escutar a música”.*

Friedrich Nietzsche

Agradecimentos

Ao Instituto de Botânica de São Paulo (IBT) pela oportunidade de aprendizado durante todo o meu mestrado e doutorado.

A Pós-graduação em Biodiversidade e Meio Ambiente do Instituto de Botânica por todo suporte concedido durante o processo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Dr. Rogério Mamoru Suzuki pela confiança e dedicação destinada à realização de mais um trabalho, que por nove anos de caminhada acadêmica compartilhou plenamente sua experiência e conhecimento científico.

Ao Dr. Eduardo Purgatto por ceder estrutura laboratorial e de equipamentos para a realização das quantificações de etileno, além da disposição em ensinar o manuseio do CG e compreensão dos seus resultados.

Ao Dr. Fábio Pinheiro pelo auxílio na identificação das matrizes de *E. denticulatum*. E saiba que sua solicitação foi cumprida, pois cuidei deles com carinho reproduzindo muitas mudinhas.

Aos queridos pesquisadores do Núcleo de Pesquisas – Orquidário do Estado, Dr. Eduardo Catharino e Dr. Fábio de Barros pelo apoio durante todo o trajeto, me proporcionando muitos momentos de conversas alegres e motivadoras.

A todos os estagiários, alunos e ex-alunos do Núcleo de Pesquisas – Orquidário do Estado; em especial ao Leonardo Guimarães, Gabriel Franco e Thaina Gelli, pelo incentivo e todos os momentos descontraídos.

Ao meu marido, Martim Juras Jr., por todo o companheirismo, amizade e amor incondicional a mim oferecidos. Sem esquecer a paciência em me aturar em incansáveis debates sobre plantas e projetos.

À minha família por todo o estímulo e compreensão.

Resumo

Ao longo dos anos as técnicas de micropropagação vêm sendo aperfeiçoadas para a obtenção de maior número de plantas e reprodução de espécies de difícil cultivo, podendo contribuir para a conservação de espécies ameaçadas de extinção, uma vez que, o aumento do número de plantas disponíveis para comercialização, torna a coleta ilegal de espécies cada vez menos atraente. O presente estudo tem como objetivo verificar a influência do etileno durante o desenvolvimento de duas orquídeas da Mata Atlântica, *Epidendrum denticulatum* e *Zygopetalum maxillare*. O experimento foi dividido em duas etapas: a primeira etapa consistiu no processo de germinação até a formação de plantas ou caules estiolados (Cap. I); a segunda etapa analisou a regeneração de explantes via organogênese direta, com a adição de reguladores de etileno (Cap. II). Durante todo o desenvolvimento das plantas foi quantificado o etileno liberado, utilizando cromatografia gasosa, ao término de cada etapa de cultivo foram avaliados parâmetros biométricos; medindo-se comprimento de caule e raiz, número de folhas, raízes e gemas. Houve correlação entre a produção de etileno e as fases de desenvolvimento para estas duas espécies de Orchidaceae (Cap. I), a germinação no escuro foi lenta mas estimulou brotações e a formação de nós. Durante a organogênese direta (Cap. II), as maiores plantas desenvolveram-se nas menores concentrações de etileno emitido; no entanto, a adição de CEPA promoveu maior diferenciação dos explantes em plantas. O estudo proporcionou a compreensão do efeito do etileno contribuindo para uma reprodução eficiente e dando subsídios para prevenir a extinção de orquídeas ameaçadas.

Palavra-chaves: Cultivo *in vitro*, Hormônio vegetal, Germinação de sementes, Orquídea, Organogênese direta.

Abstract

Over the years micropropagation techniques of orchids have been improved to obtain a greater number of plants and reproduction of species of difficult cultivation and can contribute to the conservation of endangered species, since, increasing the number of plants available for commercialization makes illegal collection of species less attractive. The present study aims to verify the influence of ethylene during the development of two orchids of the Atlantic Rainforest, *Epidendrum denticulatum* and *Zygopetalum maxillare*. The experiment was divided in two phases: the first consisted of the germination process until the formation of plants or etiolated shoot, comparing the luminosity and ethylene liberation (Chapter I); the second phase analyzed the regeneration of explants via direct organogenesis, with addition of ethylene regulators (Chapter II). Throughout the development of the plants the liberated ethylene was quantified using gas chromatography at the end of each culture stage biometric parameters were evaluated; measuring length of shoot and root, number of leaves, roots and axial buds. There was correlation between ethylene production and developmental stages for these two species of Orchidaceae (Chapter I), the germination in the dark was slow but stimulated sprouts and nodes formation. During direct organogenesis (Chapter II), the largest plants developed at the lowest concentrations of ethylene; however, the addition of CEPA promoted greater differentiation of explants in plants. The present study provided an understanding of the effect of ethylene contributing to an efficient reproduction and preventing the extinction of endangered orchids.

Key words: Direct organogenesis, *In vitro* culture, Orchid, Plant hormone, Seed germination.

Lista de Figuras

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. Adaptações de sobrevivência.....	2
Figura 2. Classificação de subtribos e tribos que compõem a subfamília Epidendroideae.....	3
Figura 3. Inflorescência de <i>Zygopetalum maxillare</i>	5
Figura 4. Inflorescência de <i>Epidendrum denticulatum</i>	6
Figura 5. Diagrama representativo das técnicas de reprodução e etapas da morfogênese direta e indireta	9
Figura 6. Esquema da via de biossíntese de etileno	11

CAPÍTULO I

Figura 1. Concentração de etileno de <i>Zygopetalum maxillare</i> em 180 dias de cultivo, com relação à luminosidade.....	29
Figura 2. Aspecto dos protocormos das sementes germinadas de <i>Zygopetalum maxillare</i>	30
Figura 3. Concentração de etileno de <i>Epidendrum denticulatum</i> durante os 180 dias de cultivo, em relação à luminosidade.....	32
Figura 4. Aspectos morfológicos no decorrer do desenvolvimento de <i>Epidendrum denticulatum</i>	33

CAPÍTULO II

Figura 1. Plantas produzidas previamente na ausência de luz.....	48
--	----

Lista de Tabelas

CAPÍTULO I

Tabela 1. Parâmetros biométricos de plântulas de <i>Z. maxillare</i> após um ano de cultivo <i>in vitro</i> , nos tratamentos claro e escuro.....	31
Tabela 2. Parâmetros biométricos de plântulas de <i>E. denticulatum</i> após um ano de cultivo <i>in vitro</i> , nos tratamentos claro e escuro.....	34

CAPÍTULO II

Tabela 1. Concentração de etileno em <i>Zygopetalum maxillare</i> durante 60 dias de cultivo, com adição de AgNO ₃	52
Tabela 2. Concentração de etileno em <i>Zygopetalum maxillare</i> durante 60 dias de cultivo, com adição de CoCl ₂	54
Tabela 3. Concentração de etileno em <i>Zygopetalum maxillare</i> durante 60 dias de cultivo, com adição de CEPA.....	56
Tabela 4. Porcentagem de sobrevivência e parâmetros biométricos de <i>Zygopetalum maxillare</i> após 90 dias de cultivo, com adição de AgNO ₃	58
Tabela 5. Porcentagem de sobrevivência e parâmetros biométricos de <i>Zygopetalum maxillare</i> após 90 dias de cultivo, com adição de CoCl ₂	59
Tabela 6. Porcentagem de sobrevivência e parâmetros biométricos de <i>Zygopetalum maxillare</i> após 90 dias de cultivo, com adição de CEPA.....	60
Tabela 7. Concentração de etileno em <i>Epidendrum denticulatum</i> durante 60 dias de cultivo, com adição de AgNO ₃	61
Tabela 8. Concentração de etileno em <i>Epidendrum denticulatum</i> durante 60 dias de cultivo, com adição de CoCl ₂	63
Tabela 9. Concentração de etileno em <i>Epidendrum denticulatum</i> durante 60 dias de cultivo, com adição de CEPA.....	65

Tabela 10. Porcentagem de sobrevivência e parâmetros biométricos de <i>Epidendrum denticulatum</i> após 90 dias de cultivo, com adição de AgNO_3	67
Tabela 11. Porcentagem de sobrevivência e parâmetros biométricos de <i>Epidendrum denticulatum</i> após 90 dias de cultivo, com adição de CoCl_2	68
Tabela 12. Porcentagem de sobrevivência e parâmetros biométricos de <i>Epidendrum denticulatum</i> após 90 dias de cultivo, com adição de CEPA.....	69

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
1. Taxonomia e Caracterização de espécies	2
1.1. Subtribo Zygotetralinae: Gênero <i>Zygotetralum</i>	3
1.1.1. <i>Zygotetralum maxillare</i>	4
1.2. Subtribo Laeliinae: Gênero <i>Epidendrum</i>	5
1.2.1. <i>Epidendrum denticulatum</i>	6
2. Cultivo <i>in vitro</i> e organogênese	7
3. Luz e Etileno	9
OBJETIVO GERAL	12
• Objetivos específicos	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
 CAPÍTULO I	 22
1. Introdução	24
2. Material e Métodos	25
2.1. Obtenção do material biológico	25
2.2. Viabilidade de sementes	26
2.3. Estabelecimento do cultivo <i>in vitro</i>	26
2.4. Quantificação de etileno	27
2.5. Parâmetros biométricos	27
2.6. Delineamento experimental e análise estatística	27
3. Resultados	28
3.1. <i>Zygotetralum maxillare</i>	28
3.2. <i>Epidendrum denticulatum</i>	31
4. Discussão	35
5. Conclusão	38
6. Referências	39

CAPÍTULO II	44
1. Introdução	46
2. Material e Métodos	48
2.1. Obtenção do material biológico	48
2.2. Estabelecimento do cultivo <i>in vitro</i>	48
2.3. Quantificação de etileno	49
2.4. Parâmetros biométricos	50
2.5. Delineamento experimental e análise estatística	50
3. Resultados	51
3.1. <i>Zygopetalum maxillare</i>	51
3.2. <i>Epidendrum denticulatum</i>	60
4. Discussão	69
5. Conclusão	74
6. Referências	75
 Anexo A	 84
Anexo B	85
Anexo C	86
Anexo D	87

INTRODUÇÃO GERAL

Orchidaceae é uma das famílias com maior diversidade de espécies do mundo, uma das maiores dentre as angiospermas e a maior das monocotiledôneas (Vieira & Barros, 2017). É composta por aproximadamente 800 gêneros e 25.000 espécies (Chase *et al.*, 2003; Dressler, 2005). No Brasil, também está bem representada com 220 gêneros e 2.477 espécies nativas (Flora do Brasil, 2020).

No decorrer da evolução da família, seus representantes adaptaram-se a diferentes ambientes, apresentando espécies epífitas, terrícolas, rupícolas e micoheterotróficas (Dressler, 1993). As diversas adaptações de sobrevivência (Fig.1), por exemplo, o desenvolvimento de pseudobulbos em algumas espécies, a presença de folhas carnosas, raízes que possuem velame e sementes muito pequenas com fácil dispersão pelo vento, possibilitam à família Orchidaceae uma distribuição cosmopolita. São encontradas em maior diversidade em florestas tropicais (Pinheiro *et al.*, 2004) com um grande número de espécies principalmente na Mata Atlântica (1.574 espécies) e representam a maior família botânica neste Bioma, em termos de número de espécies.

Ao longo dos anos, a ação humana tem causado grande destruição dos remanescentes de Mata Atlântica; cerca de 88,3% da Mata Atlântica original foi destruída (Ribeiro *et al.*, 2009), e apenas 11,7% da vegetação original permanece intocada (SOS Mata Atlântica & INPE, 2014). A metade da vegetação das florestas tropicais e subtropicais é composta de espécies epífitas (Kersten & Silva, 2001). As orquídeas apresentam epifitismo em 80% das espécies (Pinheiro *et al.*, 2004); fazendo com que os desmatamentos e o extrativismo predatório ocorridos nas áreas florestais ocasionem o declínio populacional das orquídeas.



Fig. 1. Adaptações de sobrevivência. A) Raízes com velame; B) Detalhe do velame; C) Caule intumescido (Pseudobulbo); D) Folhas carnosas; E) Fruto e pequenas sementes. Barra de escala: 2 cm (A,C e D) e 0,5 cm (B e E) Fotos: Monique Juras.

Além da degradação de habitat que colabora com o declínio populacional das orquídeas, sua baixa porcentagem de germinação na natureza (aproximadamente 0,1%), fase vegetativa longa até atingir a fase reprodutiva (aproximadamente sete anos), a ocorrência de uma única floração anual e o longo período para a maturação de frutos (mais de 8 meses para várias espécies) (Ferreira & Suzuki, 2008), entre outros fatores, aumentam o risco de extinção das orquídeas. Atualmente estão listadas para o Estado de São Paulo 108 espécies ameaçadas de extinção da família Orchidaceae (SMA, 2016).

1. Taxonomia e Caracterização de espécies

Dentre as subfamílias de Orchidaceae, Epidendroideae é a maior e mais diversificada com 21.160 espécies, abrangendo 76% da família (Freudenstein & Chase, 2015), representando a porção mais derivada do clado. As espécies abordadas no atual trabalho, *Zygopetalum*

maxillare Lodd. e *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr., pertencem à subtribo Zygotetralinae e Laeliinae, respectivamente (Fig. 2), ambas pertencentes à subfamília Epidendroideae.

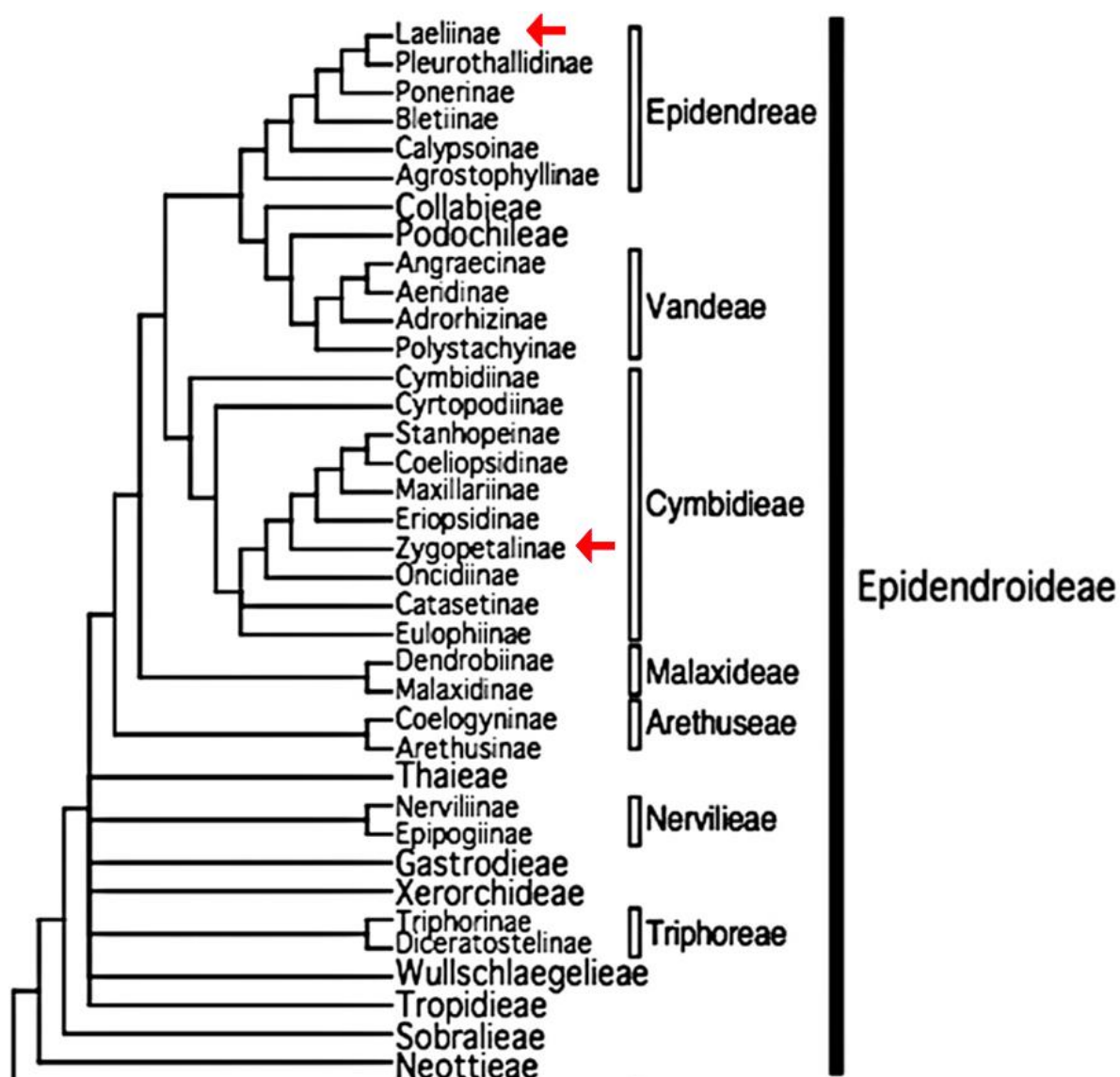


Fig. 2. Classificação de subtribos e tribos que compõem a subfamília Epidendroideae, demonstrando localização de Laeliinae e Zygotetralinae. Adaptado de Chase *et al.* (2015).

1.1. Subtribo Zygotetralinae: Gênero *Zygotetralum*

A subtribo Zygotetralinae possui aproximadamente 450 espécies distribuídas em 36 gêneros (Pupulin, 2007, 2010). Os representantes de Zygotetralinae se distribuem desde o sul do México ao norte da Argentina, em maior número e diversidade na região andina (Pridgeon

et al., 2009). A subtribo é monofilética, sendo dividida em dois grupos: o clado *Zygopetalum* com folhas plicadas e presença de pseudobulbo e o clado de *Huntleya* com folhas conduplicadas e pseudobulbos ausentes ou reduzidos (Whitten *et al.*, 2005).

O gênero *Zygopetalum* possui 14 espécies, todas encontradas no Brasil, predominantemente no Sudeste do país (WCSP, 2018; Flora do Brasil, 2020). As espécies são na maioria epífitas, com poucas espécies terrícolas, habitam principalmente florestas pré-montanhosas, adaptadas a condições sombreadas e úmidas do dossel (Pridgeon *et al.*, 2009).

1.1.1. *Zygopetalum maxillare*

Zygopetalum maxillare Lodd. é restrita geograficamente ao Brasil e Argentina (WCSP, 2018), ameaçada de extinção no Estado de São Paulo e encontrada em todas as regiões de Mata Atlântica (Barros, 2007). É uma espécie epífita, apresenta folhas lanceoladas (20-40 cm de comprimento); flores de tamanho médio (5 cm diâmetro), com 4-8 flores por inflorescência, com coloração castanha com máculas verde-limão, seu labelo é trilobado e com coloração violeta (Cogniaux, 1902; Hoehne, 1953) (Fig. 3).

A espécie é encontrada em floresta semidecídua e possui o hábito bastante restrito, crescendo exclusivamente sobre samambaias arbóreas (Decker, 1956; Wagner *et al.*, 2015), dos gêneros *Dicksonia*, *Cyathea* e *Alsophila* (Nunes *et al.*, 2017; Hoehne, 1949). Este fato restringe sua população, tornando-a uma espécie com risco de extinção, devido ao desmatamento e, conseqüentemente, a eliminação da espécie e dos forófitos.



Fig. 3. Inflorescência de *Zygopetalum maxillare* (A) e aspecto geral do crescimento em samambaias (B). Autoria das fotos: A) Monique Juras; B) Luciano Zandoná. Barra de escala: 2 cm

1.2. Subtribo Laeliinae: Gênero *Epidendrum*

Laeliinae é representada por 43 gêneros e 1466 espécies (Dressler, 1993); entre eles estão os gêneros mais importantes do comércio ornamental como *Cattleya* e *Laelia*, e também gêneros como *Epidendrum*, *Encyclia* e *Prosthechea* que compõem grande parte da flora Neotropical (Van den Berg *et al.*, 2000).

Epidendrum L. é o segundo maior gênero da família, com mais de 1.400 espécies (Chase *et al.*, 2015) e o maior gênero brasileiro possuindo 134 espécies, sendo 80 endêmicas do país (BFG, 2015). O gênero possui extensa distribuição geográfica, desde o Sul da Flórida até o Norte da Argentina (Dressler, 1993) com espécies em sua maioria epífitas, no entanto habitam diversos ambientes, como por exemplo o subgênero *Amphiglottium*, ao qual pertence *E. denticulatum* (Pinheiro *et al.*, 2009), que ocupa habitats extremos como dunas arenosas, afloramentos rochosos e terrenos alagados (Pridgeon *et al.*, 2005).

1.2.1. *Epidendrum denticulatum*

Epidendrum denticulatum Barb. Rodr. é uma espécie de hábito terrícola ou rupícola, presente nos biomas Mata Atlântica e Cerrado (Pinheiro & Barros, 2007; Flora do Brasil, 2020). A espécie apresenta folhas dísticas, coriáceas e inflorescência em formato de corimbo (Pinheiro & Barros, 2007). Flores de coloração rosa-lilás, com aproximadamente 2 cm de diâmetro, com labelo trilobado e bordas denticuladas (Cogniaux, 1902) (Fig. 4).



Fig. 4. Inflorescência de *Epidendrum denticulatum*. Autoria das fotos: A) Fábio Pinheiro; B) Monique Juras. Barra de escala: 0,5 cm.

Pouca diferenciação morfológica e facilidade em formar híbridos naturais, entre as espécies do gênero, gera dificuldade em identificá-los corretamente. Morfologicamente *E. denticulatum* é muito próxima de *E. secundum*, diferenciando-se somente pelas características do calo presente no labelo; *E. secundum* apresenta calo carnoso e recortado, em contrapartida *E. denticulatum* possui dois calos carnosos arredondados e um calo em forma de quilha (Pinheiro & Barros, 2007).

Devido à sua ampla distribuição e adaptação a diferentes ambientes, *E. denticulatum* é utilizada como modelo biológico de diversos estudos filogeográficos e evolutivos (Pinheiro & Barros, 2007; Pinheiro *et al.*, 2009, 2013, 2015). Apresentando alto número cromossômico ($40 \times 2n$) (Pinheiro *et al.*, 2009), tal variabilidade genética gera indivíduos diferentes, que desenvolvem adaptações individuais ao meio ambiente (Tejeda-Sartorius *et al.*, 2017). No entanto, existem poucos estudos relacionados à fisiologia da espécie, que poderia estar relacionada aos fatores que contribuem para seu sucesso no contexto evolutivo.

2. Cultivo *in vitro* e organogênese

Ao longo dos anos, o cultivo *in vitro* vem apresentando inovações tecnológicas para o melhoramento vegetal, proporcionando conhecimento fisiológico, estrutural e ecológico de diversas espécies. Para a multiplicação de orquídeas o cultivo *in vitro* vem sendo aperfeiçoado desde o final do século XIX ao início do XX (Knudson, 1922), sendo uma importante alternativa para uma época em que as plantas eram coletadas de florestas tropicais e multiplicadas por divisões da “planta mãe” (Minamiguchi & Machado-Neto, 2007).

Devido ao avanço do conhecimento e à importância comercial, as orquídeas são produzidas quase que em sua totalidade pelo cultivo *in vitro* (Kerbaudy, 2004), garantindo o melhoramento destas, seja por hibridação ou por clonagem de “matrizes tipos” selecionadas, dentro das espécies ou dos híbridos, que pode contribuir para a sua preservação.

Embora a germinação de sementes seja o principal recurso para a propagação de orquídeas, com intuito de conservar e manter a variabilidade genética, a micropropagação de indivíduos via explantes meristemáticos é necessária para a conservação de espécies praticamente extintas, onde o número de indivíduos é extremamente reduzido (Yeung *et al.*, 2018), garantindo integridade genética e facilitando o comércio legal de espécies nativas.

O estudo da micropropagação teve como base a *Theoria Generationis* desenvolvida por Caspar Friedrich Wolff em 1759, que considerou o ápice caulinar o desenvolvedor de novos tecidos (Steeves, 2006), abrindo caminho ao termo meristema proposto por Carl Wilhelm von Nageli (1858), nomeando assim o conjunto de células que realizava tal processo (Bahadur & Krishnamurthy, 2015).

Somente em 1902, Gottlieb Haberlandt complementou o já conhecido meristema com a “teoria de totipotência”, considerando que as células meristemáticas possuem competência de originar todos os tipos celulares de um indivíduo, com capacidade de regeneração a partir de células únicas, também conhecidas como células-tronco. (Rodrigues & Kerbauy, 2009; Read & Preece, 2014). Desde então, o avanço da biotecnologia apresentou métodos de reprodução via meristema; dentre as várias técnicas de micropropagação estão, entre outras, a embriogênese somática e a organogênese (Fig. 5).

A embriogênese somática ocorre quando células somáticas diferenciam-se em embriões somáticos, tornando desnecessária a fusão de gametas (Silva *et al.*, 2018). Tal processo gera estruturas bipolares sem conexão vascular com o explante, que comporta seu próprio meristema, um polo apical e um polo basal (Bhatia *et al.*, 2015). Em contraste, o processo de organogênese ocorre quando as células são induzidas a se diferenciar, desenvolvendo uma estrutura unipolar, cujo sistema vascular está conectado ao explante original (Thorpe, 1993; Duclercq *et al.*, 2011).

Tanto a organogênese quanto a embriogênese somática podem ocorrer diretamente do explante isolado, no caso de morfogênese direta, ou após a formação de calos, o que é chamado de morfogênese indireta (Rout *et al.*, 2006). O calo é formado pela dediferenciação de células somáticas, sendo o processo de formação de um calo realizado por células da região do periciclo ou próximas a ele, que possuem capacidade totipotente (Sugimoto *et al.*, 2011; Bustillo-Avendaño *et al.*, 2017; Sang *et al.*, 2018).

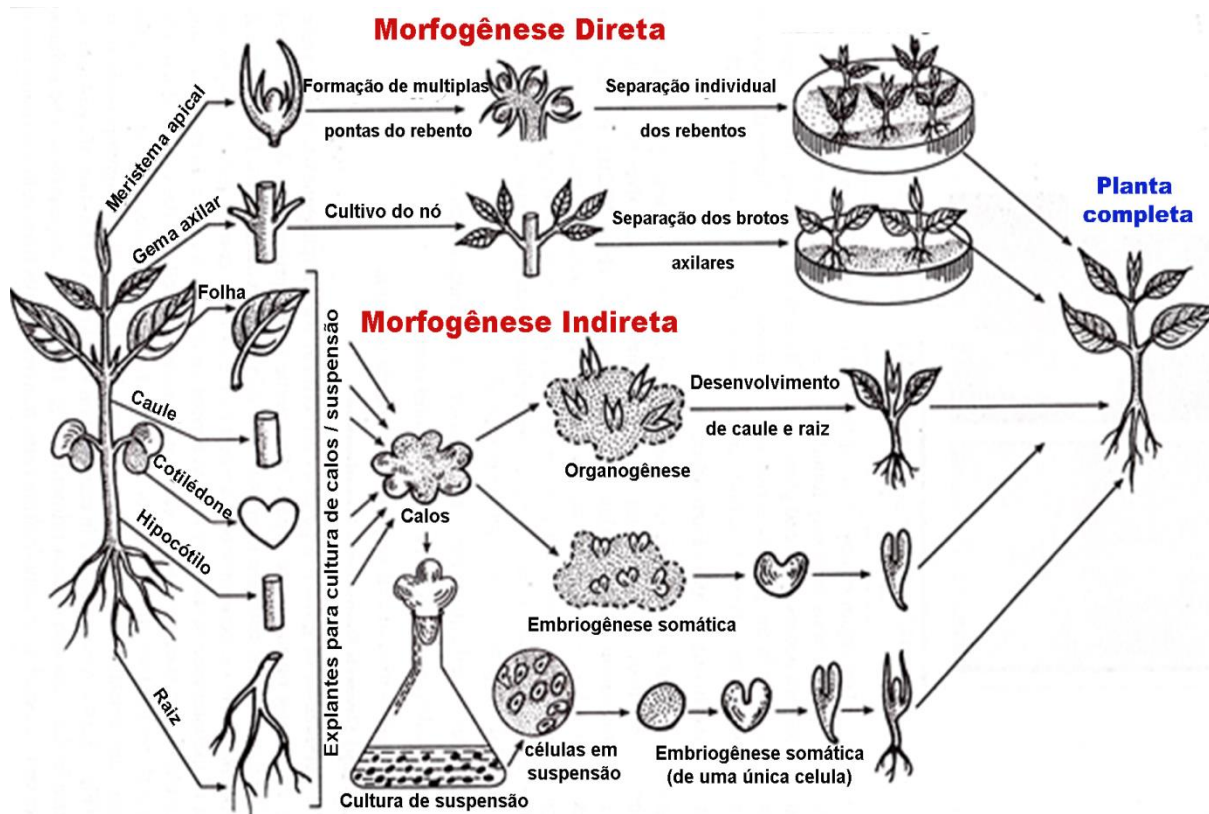


Fig. 5. Diagrama representativo das técnicas de reprodução e etapas da morfogênese direta e indireta. Ilustração adaptada do site Biology Discussion (2016).

A embriogênese somática é a mais utilizada em laboratórios comerciais, por realizar uma produção rápida e em larga escala, comparada à técnicas de organogênese que possuem menor eficiência de multiplicação (Mazri & Meziani, 2015). No entanto a organogênese direta permite a preservação de plantas idênticas às matrizes, uma vez que acarretam uma menor possibilidade de variação somaclonal, por não envolver a etapa de desdiferenciação e formação de calo durante o processo (von Arnold *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2004).

3. Luz e Etileno

O crescimento das plantas sob a luz, conhecido como fotomorfogênese, conduz o desenvolvimento destas para uma morfoanatomia potencializada para a realização da fotossíntese. O desenvolvimento no escuro promove o estiolamento que maximiza o

alongamento caulinar, diminui o número e o tamanho de folhas, de maneira a atingir condições suficientes para o crescimento (Arnim & Deng, 1996).

Geralmente no início da germinação das plantas cultivadas na ausência de luz ou sob o solo, há utilização das reservas de energia presentes no endosperma ou nos cotilédones como estratégia de crescimento, desenvolvimento no escuro conhecido como *skotomorphogenesis* (de Wit *et al.*, 2016), no entanto as sementes geradas por representantes de Orchidaceae não possuem endosperma (Yeung, 2017), o que dificulta este processo.

Os efeitos morfológicos mais evidentes do estiolamento incluem a perda de clorofila, alongamento de entrenós e formação de tecidos de menor resistência devido à menor lignificação e suberificação, diminuindo a espessura das paredes celulares (Bassuk & Maynard, 1987), facilitando a segmentação nodal caulinar para multiplicação vegetativa *in vitro*. A falta de luz também tende a provocar alterações fisiológicas, principalmente modificando níveis hormonais endógenos, aumentando o metabolismo e transporte de auxina, citocinina, giberelina e etileno durante o estiolamento (Rodrigues *et al.*, 2014; Seluzicki *et al.*, 2017).

Resposta comum em plantas expostas a estresses é a estimulação da síntese de etileno. O etileno é um gás considerado um dos cinco fitormônios clássicos que afetam diversos processos de desenvolvimento das plantas, como crescimento, diferenciação, germinação, quebra de dormência e senescência (Vieira *et al.*, 2010). O etileno possui ação no crescimento sob luz, efetuando a reorientação de microtúbulos que estimula o alongamento do eixo caulinar de algumas espécies (Ma *et al.*, 2017). Entretanto, esse fitorregulador pode promover ou inibir o crescimento dependendo da espécie estudada, do estágio de desenvolvimento e do ambiente de cultivo (Smalle *et al.*, 1997; Suzuki & Kerbaui, 2006).

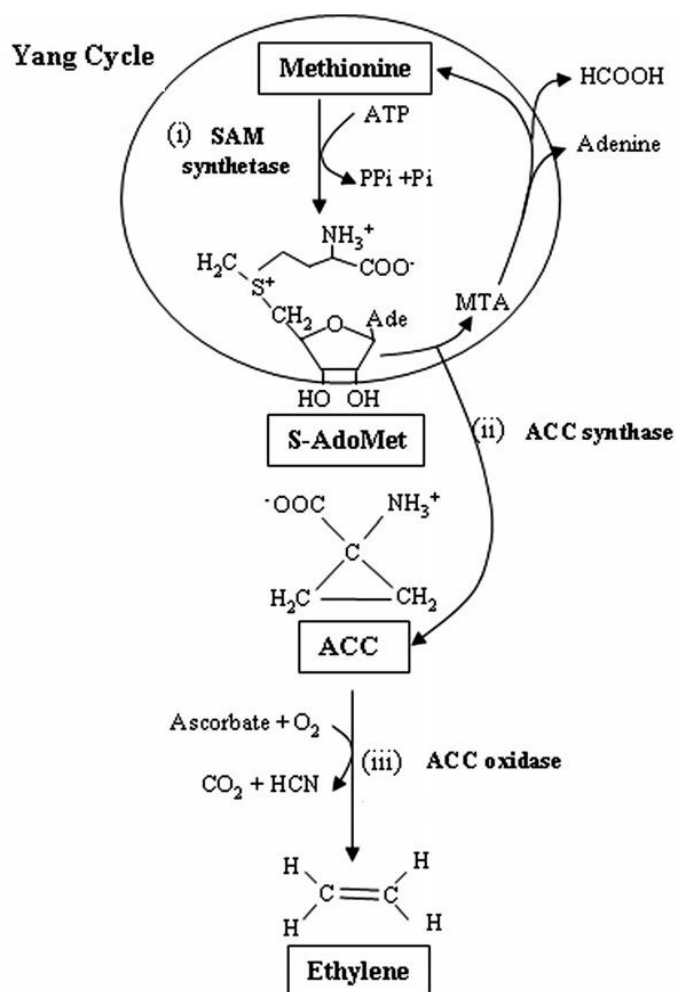


Fig. 6. Esquema da via de biossíntese de etileno. (Adaptado de Lin *et al.*, 2009). I) Formação de S-AdoMet (S-adenosilmetionina) a partir de metionina, catalisada por SAM sintetase; II) Conversão de S-AdoMet em ACC pela ACC sintase; III) ACC oxidase catalisa a etapa final usando ACC como substrato e gerando ETILENO, dióxido de carbono e cianeto.

Na última fase da biossíntese de etileno (Fig. 6), seu precursor direto o ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) é catalisado pela enzima ACC oxidase (ACO); durante o processo é necessário O₂ como co-substrato e CO₂ como ativador (Druege, 2006). A inibição da produção de etileno durante o cultivo no claro é devida à diminuição na concentração de CO₂, que é consumido durante a fotossíntese (Kao & Yang, 1982), causando a inativação da oxidação da enzima ACO que transforma ACC em etileno. No entanto, Burg & Burg (1965) relatam um efeito oposto quando ocorre excesso de CO₂, causando efeito inibitório na

produção de etileno devido a uma competição de CO₂ e etileno pelo mesmo sítio de ativação enzimático, proposta esta muito estudada na produção de frutos climatéricos retardando seu amadurecimento (Mathooko, 1996; De Wild *et al.*, 2003; Saquet & Streif, 2017).

Atualmente diversas pesquisas têm sido realizadas com o intuito de amenizar ou inibir a ação do etileno, bloqueando sua biossíntese ou a ação por meio da utilização de inibidores. O interesse em diminuir a ação do etileno é devido ao efeito inibitório deste fitormônio à regeneração de tecidos durante a organogênese e menor formação de brotos axiais em algumas espécies (Kumar *et al.*, 2009; Chae *et al.*, 2012; Lei *et al.*, 2014; Saha & Gupta, 2018). Alguns estudos ainda mostram que o excesso de etileno causa uma influência negativa na função estomática, diminuindo a captação de CO₂ e inibindo a fotossíntese (Ceusters & Poel, 2018).

OBJETIVO GERAL

- Analisar o efeito do etileno durante o cultivo *in vitro* de *Zygopetalum maxillare* e *Epidendrum denticulatum*.

- **Objetivos específicos**

- Verificar se variação da concentração de etileno é correlacionada com as etapas de desenvolvimento das espécies;

- Analisar a influência da luz e do escuro na concentração de etileno e no crescimento de tais espécies;

- Avaliar os efeitos dos reguladores de etileno durante a organogênese direta.

Referências Bibliográficas

- Arnim, A. von, & Deng, X.-W. 1996. Light control of seedling development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 215–243.
- Bahadur, B. & Krishnamurthy, K. V. 2015. Plant Biology: Past, Present and Future. In Bahadur, B., Rajam, M.V., Sahijram, L. & Krishnamurthy, K., eds. *Plant Biology and Biotechnology*. (p. 1-33). Springer, New Delhi.
- Barros, F. de. 2007. A família Orchidaceae na flora do Estado de São Paulo e suas espécies ameaçadas. In Mamede, M.C.H., Souza, V.C., Prado, J., Barros, F. de, Wanderley, M. da G.L. & Rando, J.G., eds. *Livro vermelho das espécies vegetais ameaçadas do Estado de São Paulo*. (p. 47-52). Instituto de Botânica, São Paulo.
- Bassuk, N. & Maynard, B. 1987. Stock plant etiolation. *HortScience* 22, 749–750.
- BFG - The Brazil Flora Group. 2015. Growing knowledge: An overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguesia* 66, 1085–1113 <https://doi.org/10.1590/2175-7860201566411>.
- Bhatia, S., Sharma, K., Dahiya, R. & Bera, T. 2015. Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences. Elsevier Science.
- Biology Discussion. 2016. Study Notes on Organogenesis/Biotechnology. <http://cdn.biologydiscussion.com/wp-content/uploads/2016/10/image-621.png>
- Burg, S. P. & Burg, E. A. 1965. Ethylene action and the ripening of fruits. *Science* 148, 1190–1196.
- Bustillo-Avendaño, E., Ibáñez, S., Sanz, O., Barross, J. A. S., Gude, I., Perianez-Rodriguez, J., Micol, J. L., del Pozo, J. C., Moreno-Risueno, M. A. & Perez-Perez, J. M. 2017. Regulation of hormonal control, cell reprogramming and patterning during *de novo* root organogenesis. *Plant Physiology* <https://doi.org/10.1104/pp.17.00980>.

Ceusters, J. & Poel, B. Van De. 2018. Ethylene exerts species-specific and age-dependent control of photosynthesis. *Plant physiology* 176, 2601–2612 <https://doi.org/10.1104/pp.17.01706>.

Chae, S. C., Kim, H. H. & Park, S. U. 2012. Ethylene inhibitors enhance shoot organogenesis of gloxinia (*Sinningia speciosa*). *The Scientific World Journal* 2012, 1–4 <https://doi.org/10.1100/2012/859381>.

Chase, M. W., Cameron, K. M., Barrett, R. L. & Freudenstein, J. V. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: Dixon, K.W., Kell, S.P., Barrett, R.L. & Cribb, P.J., eds. *Orchid conservation*. (p. 69-89). Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu.

Chase, M. W., Cameron, K. M., Freudenstein, J. V., Pridgeon, A. M., Salazar, G., van den Berg, C. & Schuitman, A. 2015. An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 177, 151–174 <https://doi.org/10.1111/boj.12234>.

Cogniaux, A. 1902. Orchidaceae. In Martius, C.F.P., Eichler, A.G. & Urban, I., eds. *Flora brasiliensis*. (p. 30-186) Typographia, Munique.

Decker, J. S. 1956. *As orquídeas e sua cultura*. 2^a. Melhoramentos.

De Wild, H. P. J., Otma, E. C. & Peppelenbos, H. W. 2003. Carbon dioxide action on ethylene biosynthesis of preclimacteric and climacteric pear fruit. *Journal of Experimental Botany* 54, 1537–1544 <https://doi.org/10.1093/jxb/erg159>.

De Wit, M., Galvão, V. C. & Fankhauser, C. 2016. Light-mediated hormonal regulation of plant growth and development. *Annual Review of Plant Biology* 67, 513–537 <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-112252>.

Dressler, R. L. 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Dioscorides Press,

Portland.

Dressler, R. L. 2005. How many orchid species? *Selbyana* 26, 155–158.

Druege, U. 2006. Ethylene and plant responses to abiotic stress. In Khan, N.A., ed. *Ethylene Action in Plants*. (p. 81-118) Springer, Berlin, Heidelberg.

Duclercq, J., Sangwan-Norreel, B., Catterou, M. & Sangwan, R. S. 2011. *De novo* shoot organogenesis: From art to science. *Trends in Plant Science* 16, 597–606 <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.08.004>.

Ferreira, W. M., & Suzuki, R. M. 2008. O cultivo *in vitro* de orquídeas como alternativa para a preservação de espécies nativas ameaçadas de extinção. In Loiola, M.I.B., Baseia, I.G., Lichston., J.E., eds. *Atualidades, desafios e perspectiva da botânica no Brasil*. (p. 67-68). Imagem Gráfica, Natal.

Flora do Brasil. 2020. Orchidaceae. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB179>

Freudenstein, J. V., & Chase, M. W. 2015. Phylogenetic relationships in Epidendroideae (Orchidaceae), one of the great flowering plant radiations: Progressive specialization and diversification. *Annals of Botany* 115, 665–681 <https://doi.org/10.1093/aob/mcu253>.

Guo, Y.-M., Yang, Y.-G., Guo, Y. & Guo, Z.-C. 2004. Adventitious shoot bud formation and plant regeneration from *in vitro*-cultured stem segments of reed (*Phragmites communis* Trin.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 40, 412–415 <https://doi.org/10.1079/IVP2004553>.

Hoehne, F. C. 1949. *Iconografia de orchidaceas do Brasil*. SA Indústrias Graphicars-f. Lanzara.

Hoehne, F. C. 1953. *Orchidaceas*. *Flora Brasílica*. Secretaria da Agricultura, Industria e

Comércio de São Paulo., São Paulo.

Kao, C. H. & Yang, S. F. 1982. Light inhibition of the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in leaves is mediated through carbon dioxide. *Planta* 155, 261–266 <https://doi.org/10.1007/BF00392725>.

Kerbaudy, G. B. 2004. Estágio atual do emprego de técnicas biotecnológicas para pesquisa em plantas orquidáceas. In Barros, F. & Kerbaudy, G.B., eds. *Orquidologia Sul-Americana: uma compilação científica*. (p. 51-58). Secretaria do meio ambiente/Instituto de Botânica, São Paulo.

Kersten, R. & Silva, S. 2001. Composição florística e estrutura do componente epifítico vascular em floresta da planície litorânea na Ilha do Mel, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 24, 213–226.

Knudson, L. 1922. Non-symbiotic germination of orchid seeds. *Botanical Gazette* 73, 1–25.

Kumar, V., Parvatam, G. & Ravishankar, G. A. 2009. AgNO₃ - a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. *Electronic Journal of Biotechnology* 12, 1–15 <https://doi.org/10.2225/vol12-issue2-fulltext-1>.

Lei, C., Wang, H., Liu, B. & Ye, H. 2014. Effects of silver nitrate on shoot regeneration of *Artemisia annua* L. *Plant Biotechnology* 31, 71–75 <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.13.1109a>.

Lin, Z., Zhong, S. & Grierson, D. 2009. Recent advances in ethylene research. *Journal of Experimental Botany* 60, 3311–3336 <https://doi.org/10.1093/jxb/erp204>.

Ma, Q., Wang, X., Sun, J. & Mao, T. 2017. Coordinated regulation of hypocotyl cell elongation by light and ethylene through a microtubule destabilizing protein. *Plant Physiology* 176, 678–690 <https://doi.org/10.1104/pp.17.01109>.

- Mathooko, F. M. 1996. Regulation of ethylene biosynthesis in higher plants by carbon dioxide. *Postharvest Biology and Technology* 7, 1–26 [https://doi.org/10.1016/0925-5214\(95\)00026-7](https://doi.org/10.1016/0925-5214(95)00026-7).
- Mazri, M. A. & Meziani, R. 2015. Micropropagation of Date Palm: A Review. *Cell & Developmental Biology* 4, 2–7 <https://doi.org/10.4172/2168-9296.1000160>.
- Minamiguchi, J. Y. & Machado-Neto, N. B. 2007. Embriogênese somática direta em folhas de *Phalaenopsis*: Orchidaceae. *Colloquium Agrariae* 3, 07–13 <https://doi.org/10.5747/ca.2007.v03.n1.a22>.
- Nunes, C. E. P., Wolowski, M., Pansarin, E. R., Gerlach, G., Aximoff, I., Vereecken, N. J., Salvador, M. J. & Sazima, M. 2017. More than euglossines: the diverse pollinators and floral scents of Zygopetalinae orchids. *Die Naturwissenschaften* 104, 92 <https://doi.org/10.1007/s00114-017-1511-3>.
- Pinheiro, F. & Barros, F. 2007. *Epidendrum secundum* Jacq. e *E. denticulatum* Barb. Rodr.(Orchidaceae): caracteres úteis para a sua delimitação. *Hoehnea* 34, 563–570.
- Pinheiro, F., Barros, F. & Lourenço, R. A. 2004. O que é uma Orquídea? In Barros, F. & Kerbauy, G.B., eds. *Orquidologia Sul-Americana: uma compilação científica*. (p. 11-33) Secretaria do meio ambiente/Instituto de Botânica, São Paulo.
- Pinheiro, F., Cardoso-Gustavson, P., Suzuki, R. M., Abrão, M. C. R., Guimarães, L. R. S., Draper, D. & Moraes, A. P. 2015. Strong postzygotic isolation prevents introgression between two hybridizing Neotropical orchids, *Epidendrum denticulatum* and *E. fulgens*. *Evolutionary Ecology* 29, 229–248 <https://doi.org/10.1007/s10682-015-9753-z>.
- Pinheiro, F., Cozzolino, S., de Barros, F., Gouveia, T. M. Z. M., Suzuki, R. M., Fay, M. F. & Palma-Silva, C. 2013. Phylogeographic structure and outbreeding depression reveal early stages of reproductive isolation in the neotropical orchid *Epidendrum denticulatum*. *Evolution*

67, 2024–2039 <https://doi.org/10.1111/evo.12085>.

Pinheiro, F., Koehler, S., Corrêa, A. M., Salatino, M. L. F., Salatino, A. & de Barros, F. 2009. Phylogenetic relationships and infrageneric classification of *Epidendrum* subgenus *Amphiglottium* (Laeliinae, Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 283, 165–177 <https://doi.org/10.1007/s00606-009-0224-2>.

Pridgeon, A. M., Cribb, P., Chase, M. W. & Rasmussen, F. N. 2005. *Genera Orchidacearum*. OUP Oxford.

Pridgeon, A. M., Cribb, P. J., Chase, M. W. & Rasmussen, F. N. 2009. *Genera Orchidacearum*.

Pupulin, F. 2007. Contributions toward a reassessment of Costa Rican Zygopetalinae (Orchidaceae). 3. A systematic revision of *Dichaea* in Costa Rica. *Harvard Papers in Botany* 12, 15–153 [https://doi.org/10.3100/1043-4534\(2007\)12\[15:CTAROC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3100/1043-4534(2007)12[15:CTAROC]2.0.CO;2).

Pupulin, F. 2010. Flora Costaricensis - Family #39 Orchidaceae: Tribe Cymbidieae: Subtribe Zygopetalinae. *Fieldiana Botany* 49, 1–60 <https://doi.org/10.3158/0015-0746-49.1.1>.

Read, P. E. & Preece, J. E. 2014. Cloning: Plants – Micropropagation/Tissue Culture. In Alfen, N.K. Van, ed. *Encyclopedia of agriculture and food systems*. (p. 317-336). Elsevier.

Ribeiro, M. C., Metzger, J. P., Martensen, A. C., Ponzoni, F. J. & Hirota, M. M. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142, 1141–1153 <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.02.021>.

Rodrigues, M. A., Freschi, L., Purgatto, E., Lima, V. F. G. A. P. & Kerbauy, G. B. 2014. Ethylene modulates the developmental plasticity and the growth balance between shoot and root systems in the *in vitro* grown epiphytic orchid *Catasetum fimbriatum*. *Journal of Plant*

Growth Regulation 33, 513–525 <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9399-4>.

Rodrigues, M. A. & Kerbaudy, G. B. 2009. Meristemas: fontes de juventude e plasticidade no desenvolvimento vegetal. *Hoehnea* 36, 525–549 <https://doi.org/10.1590/S2236-89062009000400001>.

Rout, G. R., Mohapatra, A. & Jain, S. M. 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: a critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology advances* 24, 531–60 <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.05.001>.

Saha, N. & Gupta, S. D. 2018. Promotion of shoot regeneration of *Swertia chirata* by biosynthesized silver nanoparticles and their involvement in ethylene interceptions and activation of antioxidant activity. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 0, 1–12 <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1423-8>.

Sang, Y. L., Cheng, Z. J. & Zhang, X. S. 2018. Plant stem cells and *de novo* organogenesis. *New Phytologist* 218, 1334–1339 <https://doi.org/10.1111/nph.15106>.

Saquet, A. A. & Streif, J. 2017. Respiration rate and ethylene metabolism of ‘jonagold’ apple and ‘conference’ pear under regular air and controlled atmosphere. *Bragantia* 76, 335–344 <https://doi.org/10.1590/1678-4499.189>.

Secretaria de Estado do Meio Ambiente. 2016. RESOLUÇÃO SMA Nº 057. <http://arquivo.ambiente.sp.gov.br/legislacao/2016/12/Resolucao-SMA-057-2016-subst-300616.pdf>

Seluzicki, A., Burko, Y. & Chory, J. 2017. Dancing in the dark : Darkness as a signal in plants. *Plant Cell Environment* 40, 2487–2501 <https://doi.org/10.1111/pce.12900>.

Silva, D. P. C., Paiva, R., Herrera, R. C., Silva, L. C., Ferreira, G. N. & dos Reis, M. V. 2018. Somatic embryogenesis of *Byrsonima intermedia* A. Juss.: Induction and maturation via

indirect approach. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 133, 115–122
<https://doi.org/10.1007/s11240-017-1366-5>.

Smalle, J., Haegman, M., Kurepa, J., Van Montagu M. & Straeten, D. V. 1997. Ethylene can stimulate *Arabidopsis* hypocotyl elongation in the light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 2756–61.

SOS Mata Atlântica & INPE. 2014. atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica período 2015-2016: Relatório técnico. Fundação SOS Mata Atlântica e Instituto de Pesquisas Espaciais, 1–61.

Steeves, T. A. 2006. The shoot apical meristem: an historical perspective. *Canadian Journal of Botany* 84, 1629–1633 <https://doi.org/10.1139/b06-144>.

Sugimoto, K., Gordon, S. P. & Meyerowitz, E. M. 2011. Regeneration in plants and animals: Dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? *Trends in Cell Biology* 21, 212–218 <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.12.004>.

Suzuki, R. M. & Kerbauy, G. B. 2006. Effects of light and ethylene on endogenous hormones and development of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae). *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18, 359–365.

Tejeda-Sartorius, O., Téllez-Velasco, M. A. A. & Trejo-Téllez, L. I. 2017. características ornamentales de orquídeas silvestres y su propagación con fines comerciales. alternativa de aprovechamiento sustentable *ex situ*. *Agroproductividad* 10, 37–45.

Thorpe, T. A. 1993. *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis: physiological and biochemical aspects. *Morphogenesis in plants*, 19–38
https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1265-7_2.

Van den Berg, C., Higgins, W., Dressler, R., Whitten, W., Soto-Arenas, M., Culham, A. &

- Chase, M. 2000. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana* 15, 96–114.
- Vieira, T. L. & Barros, F. 2017. Orchidaceae na Serra do Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguesia* 68, 691–747 <https://doi.org/10.1590/2175-7860201768224>.
- Vieira, E. L., Souza, G. S. de, Santos, A. R. & Santos-Silva, J. dos. 2010. Manual de Fisiologia Vegetal. EDUFMA, São Luis.
- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J. & Filonova, L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69, 233–249 <https://doi.org/10.1023/A:1015673200621>.
- Wagner, K., Mendieta-Leiva, G. & Zotz, G. 2015. Host specificity in vascular epiphytes: a review of methodology, empirical evidence and potential mechanisms. *AoB plants* 7.
- WCSP. 2018. World Checklist of Selected Plant Families. Royal Botanical Gardens Kew. <https://www.kew.org/science/data-and-resources/plants>
- Whitten, W. M., Williams, N. H., Dressler, R. L., Gerlach, G. & Pupulin, F. 2005. Generic relationships of Zygopetalinae (orchidaceae: Cymbidieae): Combined molecular evidence. *Lankesteriana* 5, 87–107.
- Yeung, E. C. 2017. A perspective on orchid seed and protocorm development. *Botanical Studies* 58, 33 <https://doi.org/10.1186/s40529-017-0188-4>.
- Yeung, E. C., Park, J., & Harry, I. S. 2018. Orchid seed germination and micropropagation I: Background information and related protocols. In Lee, Y.-I., Yeung, E.C.-T., eds. *Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses—Methods and Protocols*. (p. 101-125). Springer P. Humana Press, New York.

CAPÍTULO I

Influência do etileno na germinação *in vitro* de *Zygopetalum maxillare* e *Epidendrum denticulatum* (Orchidaceae)

Resumo

A luz é o principal fator de regulação do ciclo circadiano das plantas, sincronizando o processo metabólico da fotossíntese com a produção e mobilidade dos fitormônios, afetando a ação do etileno que regula vários estágios de crescimento, dentre eles a germinação. O presente estudo analisou a produção de etileno, durante o desenvolvimento *in vitro* de *Zygopetalum maxillare* e *Epidendrum denticulatum*, desde a germinação até a formação de plântulas, correlacionando com a presença e ausência de luz. Foram realizadas quantificações de etileno em 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 dias após a semeadura, em fotoperíodo de 12 h/12 h (claro) e 0 h (escuro), a 25 °C. A concentração do fitormônio aumentou em fases diferentes durante o desenvolvimento das duas espécies. O desenvolvimento das plantas cultivadas no escuro foi mais lento em comparação ao das plantas cultivadas no claro em *E. denticulatum*, mas induziu o desenvolvimento de caules estiolados com gemas; em *Z. maxillare* o escuro estimulou o desenvolvimento, aumentando o número de brotos laterais, que podem ser posteriormente utilizados para a multiplicação. Houve correlação entre a produção de etileno e as fases de desenvolvimento para estas duas espécies de Orchidaceae.

Palavras-chave: Cultivo no escuro, Estiolamento, Hormônio vegetal, Orquídea.

Abstract

Light is the main regulating factor of the circadian cycle of plants, synchronizing the metabolic process of photosynthesis with the production and mobility of phytohormones, affecting the action of ethylene that regulates various growth stages, among them the germination. The present study analyzed the production of ethylene, during the *in vitro* culture of *Zygopetalum maxillare* and *Epidendrum denticulatum*, from the germination to the formation of seedlings, correlating with the presence and absence of light. Ethylene quantifications were performed at 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150 and 180 days after sowing, in photoperiod from 12 h / 12 h (light) and 0 h, at 25 ° C. The results obtained from the quantification of ethylene showed that the concentration of phytohormone increased at different phases during the development of both species. *E. denticulatum* presented slower growth in the dark than in light, but in the dark there was a promotion of the development of etiolated stems with axillary shoots; *Z. maxillare* in dark stimulated the development, increasing the number of lateral shoots, which can later be used for multiplication. The analyzes of the current study showed that correlation between ethylene production and developmental stages for the these two Orchidaceae species.

Keywords: Cultivation in the dark, Etiolation, Plant hormone, Orchid.

1. Introdução

A reprodução de orquídeas, na natureza, apresenta diversos obstáculos desde o início da polinização até a produção de indivíduos adultos. O processo de polinização cruzada realizada naturalmente é dificultado pela necessidade e escassez de polinizadores específicos de cada espécie (Micheneau *et al.*, 2009; Nunes *et al.*, 2017), dificultando a formação de frutos e sementes. As sementes dos representantes da família Orchidaceae são de tamanho muito reduzido e não há endosperma (Yeung, 2017), por este motivo, na natureza as orquídeas necessitam da associação a fungos micorrízicos para adquirir nutrientes durante a germinação.

As plantas produzidas *in vitro* por germinação assimbiótica são ideais na utilização em programas de reintrodução de espécies nativas em áreas de preservação ambiental devido à manutenção da variabilidade genética (Schneiders *et al.*, 2012). A reprodução *in vitro* proporciona uma reprodução numerosa e em curto período, beneficiando o comércio de orquídeas nativas que pode consequentemente suprimir a coleta ilegal (Zeng *et al.*, 2014). Com o intuito de promover a germinação, diversos estudos vêm apresentando propostas de cultivos alternativos, no uso de diferentes parâmetros nutricionais, luminosos, atmosféricos e hormonais (Camargo *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2017).

A luz é o principal fator de regulação do ciclo circadiano das plantas, sincronizando o processo metabólico de fotossíntese para adequação dos períodos claro e escuro; tal processo influencia na produção e mobilidade dos fitormônios, principalmente a ação do etileno que regula vários estágios de crescimento (Haydon *et al.*, 2017).

O etileno promove a germinação em plantas de diversas famílias botânicas (Dranski *et al.*, 2013; Nascimento, 2000; Vieira *et al.*, 1998), mas isso pode variar em representantes da família Orchidaceae. Tal influência é amparada pelo relato de que fungos micorrízicos, presentes nas orquídeas, produzem etileno (Hanke & Dolwet, 1976; Rasmussen & Rasmussen, 2009), sugerindo que esse fitohormônio induz a germinação das sementes. Além

disso, a adição de etileno exogenamente estimulou a germinação em espécies terrícolas como *Dactylorhiza majalis* (Rasmussen, 1995), *Galeola septentrionalis* (Nakamura *et al.*, 1975) e *Calanthe discolor* (Miyoshi & Mii, 1995).

O efeito do etileno na reprodução de orquídeas vem sendo relatado por diversos estudos, em sua maioria com enfoque em desenvolvimento de plantas e reguladores de etileno adicionados (Gow *et al.*, 2008; Teixeira Da Silva, 2013; Rodrigues *et al.*, 2014). No entanto os estudos não apresentam relato para Orchidaceae sobre a relação do fitormônio endógeno durante a germinação.

As espécies estudadas neste trabalho possuem características opostas durante a germinação: *Zygopetalum maxillare* possui baixa porcentagem de germinação e necessidade de longo período para germinar, diferentemente de *Epidendrum denticulatum* que apresenta sementes com alta viabilidade, elevada porcentagem de germinação e em período de tempo curto. O presente estudo teve como objetivo quantificar o teor de etileno liberado, correlacionando-o com as diferentes fases do desenvolvimento *in vitro* de *Zygopetalum maxillare* e *Epidendrum denticulatum*, desde a germinação até a formação de plântulas.

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção do material biológico

Plantas de *Zygopetalum maxillare* e *Epidendrum denticulatum*, pertencentes à coleção científica de orquídeas “Frederico Carlos Hoehne” do Núcleo de Pesquisas Orquidário do Estado, foram utilizadas para polinização artificial cruzada, para a produção de frutos e coleta de sementes. As sementes foram obtidas de dez frutos maduros para cada espécie, cinco meses após a polinização das flores, para realizar a germinação *in vitro*.

2.2. Viabilidade de sementes

A determinação da porcentagem de viabilidade das sementes foi realizada por meio do teste de tetrazólio (Lakon 1949), no qual uma fração de sementes é imersa em solução aquosa de 1% de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio durante 24 horas, em estufa à temperatura de 30 °C, no escuro. Após este período, foram preparadas três lâminas para análise em estereomicroscópio, obtendo-se a porcentagem de sementes viáveis, sendo consideradas viáveis aquelas que apresentaram seu embrião corado de vermelho.

2.3. Estabelecimento do cultivo *in vitro*

Para a semeadura foi utilizado o meio MS (Murashige & Skoog 1962), suplementado com 2% de sacarose e geleificados com 0,4% de ágar bacteriológico. O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 0,05$, anteriormente à adição de ágar. Após homogeneização em temperatura de ebulição (cerca de 100 °C), foram distribuídos 5 ml do meio em frascos de 30 ml de capacidade, com tampa emborrachada, que impede a troca gasosa. A esterilização dos meios foi realizada em autoclave durante 15 minutos, a 120 °C e 1,3 atm.

As sementes, depois de retiradas dos frutos, foram embebidas durante 30 minutos em água deionizada esterilizada, em sequência transferidas para uma solução aquosa a 15% de hipoclorito de sódio comercial (com 2% de cloro) durante dez minutos. Posteriormente, a solução de hipoclorito foi retirada e as sementes lavadas três vezes com água deionizada esterilizada, antes de realizar a semeadura nos meios de cultura. Os frascos contendo as sementes foram mantidos em câmara de crescimento com temperatura de $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, sob fotoperíodo de 12 h (claro) e 0 h (escuro), proporcionado por lâmpadas fluorescentes que fornecem $30\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa; e no escuro sob as mesmas condições de temperatura, durante 365 dias.

2.4. Quantificação de etileno

Para as análises de etileno, foram coletadas três amostras dos seguintes períodos: 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 dias de cultivo após a inoculação; utilizando-se de seringa de 1 mL do tipo “gas-tight”. As amostras foram quantificadas em cromatógrafo a gás acoplado a um detector de ionização de chama (GC-FID / HP-6890) e uma coluna HP - Plot / Q (30 m, I.D. 0,53 mm). As temperaturas do injetor e do detector foram de 250 °C. O nitrogênio foi o gás carreador utilizado em uma vazão de 10 mL min⁻¹ com coluna isotérmica a 30 °C.

2.5. Parâmetros biométricos

Após um ano de cultivo foram realizadas análises biométricas dos caules estiolados crescidos no escuro ou das plântulas crescidas na luz, oriundas da germinação assimbiótica, sendo 10 plantas por tratamento de cada espécie. Foram avaliados os seguintes parâmetros biométricos de crescimento: comprimento de caule e raiz, número de folhas e raízes, número de entrenós e matéria fresca e seca das plantas.

2.6. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente ao acaso em um esquema fatorial 2 x 2. Assim, os tratamentos consistiram da combinação de 2 espécies (*Zygopetalum maxillare* e *Epidendrum denticulatum*) e 2 fotoperíodos (claro - 12 h/12 h e escuro – 0 h/24 h), sendo 5 repetições por tratamento, sendo cada uma composta por uma unidade experimental (Frasco).

Para a concentração do etileno, o delineamento experimental adotado foi o inteiramente ao acaso em um esquema de parcelas subdivididas no tempo (“split plot in time”), com 2 parcelas (espécies), 12 subparcelas (data de amostragens) e três repetições (amostras). Os dados de

quantificação de etileno sofreram transformação logarítmica ($\log_{10}$), para obtenção de homogeneidade das variâncias e da normalidade dos dados. Após transformação foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de separação de médias utilizando-se o teste Tukey em nível de 5% de significância.

Os dados biométricos de crescimento foram submetidos à análise de Mann-Whitney em nível de 5% de significância.

Para a análise estatística foi utilizado o software SPSS 20.0.

3. Resultados

3.1. *Zygopetalum maxillare*

O teste de tetrazólio indicou viabilidade de 49% das sementes de *Z. maxillare*, apresentando porcentagem de germinação de 46% no claro e 1% no escuro.

A quantificação de etileno demonstrou variação na concentração do fitormônio em relação aos dias de cultivo, tanto no claro quanto no escuro. O cultivo sob luz apresentou redução da concentração de etileno aos 45 e 90 dias (0,7 e 0,8 pL. mL⁻¹, respectivamente); entre os dois períodos houve aumento de etileno (1,6 pL. mL⁻¹) (Fig. 1A), antecedendo a germinação das sementes que foi observada aos 90 dias de cultivo. A concentração de etileno liberado atingiu o maior teor aos 180 dias (2,0 pL. mL⁻¹).

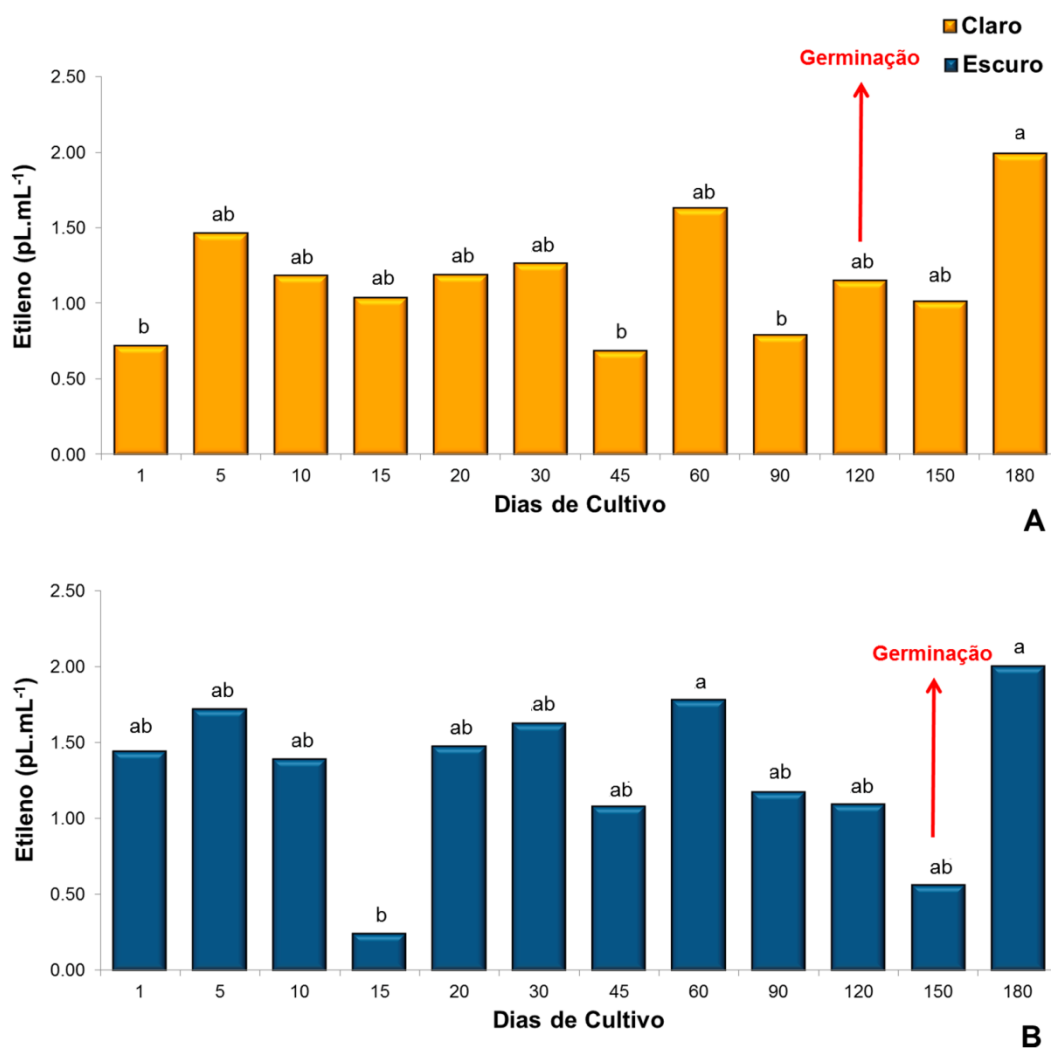


Fig. 1. Concentração de etileno em *Zygopetalum maxillare* durante 180 dias de cultivo, com relação à luminosidade. A) Fotoperíodo de 12 h/12 h (claro) e B) Fotoperíodo de 0h (escuro). Letras minúsculas indicam a diferença significativa entre os dias, segundo o teste Tukey ($P < 0,05$) ($n = 3$).

Durante o experimento no escuro os menores teores de etileno foram observados aos 15 e 150 dias (0,2 e 0,6 pL. mL⁻¹, respectivamente) (Fig. 1B). O momento da germinação da espécie durante o escuro foi maior comparativamente à germinação ocorrida no claro, ocorrida aos 90 dias (Fig. 2A), verificando-se apenas aos 150 dias no escuro (Fig. 2B) e coincidentemente neste período foi observada redução da concentração de etileno. Durante os

180 dias de experimento, em ambos os tratamentos luminosos, a espécie *Z. maxillare* se manteve em estágio de protocormo; não apresentando folhas e raízes.

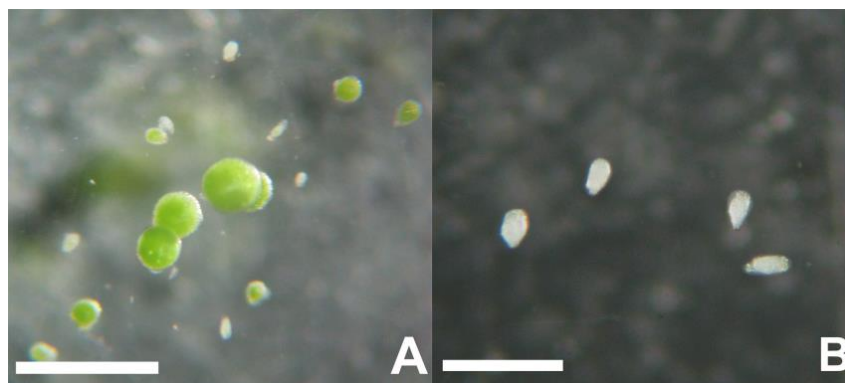


Fig. 2. Aspecto dos protocormos das sementes germinadas de *Zygopetalum maxillare* A) 90 dias na luz; B) 150 dias no escuro. Estágios que se mantiveram ao longo dos 180 dias de experimento. Barra de escala: 0,1cm.

O teor de etileno apresentou correlação com o momento de ocorrência da germinação [$F(11,48) = 4,923$; $p < 0,001$]; no entanto, a presença ou ausência de luz não mostrou diferença significativa durante o experimento. Além disso, a análise de interação não demonstrou efeito da luminosidade (claro ou escuro) somada ao período de desenvolvimento, sobre a concentração de etileno.

Ao final de um ano de cultivo o comprimento caular das plantas foi maior no escuro, no entanto não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. No cultivo no escuro não ocorreu estiolamento com presença de entrenós, no entanto ocorreu brotação lateral nos protocormos (média 2 brotações por planta). Em relação às matérias fresca e seca, o tratamento no escuro apresentou plantas com maior massa. (Tab. 1)

Tab. 1. Parâmetros biométricos de plântulas de *Z. maxillare* após um ano de cultivo *in vitro*, nos tratamentos claro e escuro.

	Caule (cm)	Nº Folhas	Nº Brotações	Matéria Fresca (mg)	Matéria Seca (mg)
Claro	0,30 a	1	-	3,32 b	0,72 b
Escuro	0,47 a	-	2	14,35 a	2,05 a

Nas colunas a Mediana com letras diferentes indica variação significativa entre claro e escuro, segundo Mann-Whitney ($P < 0,05$) ($n = 10$).

3.2. *Epidendrum denticulatum*

A análise de viabilidade, verificada pelo teste de tetrazólio, mostrou que 77% das sementes de *E. denticulatum* eram viáveis, apresentando porcentagem de germinação de 73% no claro e 12% no escuro.

A quantificação de etileno demonstrou uma variação na concentração do fitormônio em relação aos dias de cultivo, tanto no claro quanto no escuro. Durante o cultivo no claro, houve queda constante da concentração de etileno até os 10 dias de cultivo, elevando-se aos 15 dias e chegando a um aumento expressivo da concentração de etileno aos 20 dias, período que antecedeu à germinação das sementes, ocorrido aos 30 dias na luz (Fig. 3A).

No cultivo no escuro houve aumento na concentração de etileno após a semeadura nos frascos aos 5 dias (apresentou 2,1 pL. mL⁻¹), o maior teor de etileno verificado durante o experimento. Verificou-se uma drástica redução do etileno aos 10 dias de cultivo e posteriormente a este período um aumento progressivo do teor de etileno até 30 dias (Fig. 3B); período este que antecedeu à germinação das sementes ocorrida aos 45 dias, fato demonstrado também durante o cultivo no claro.

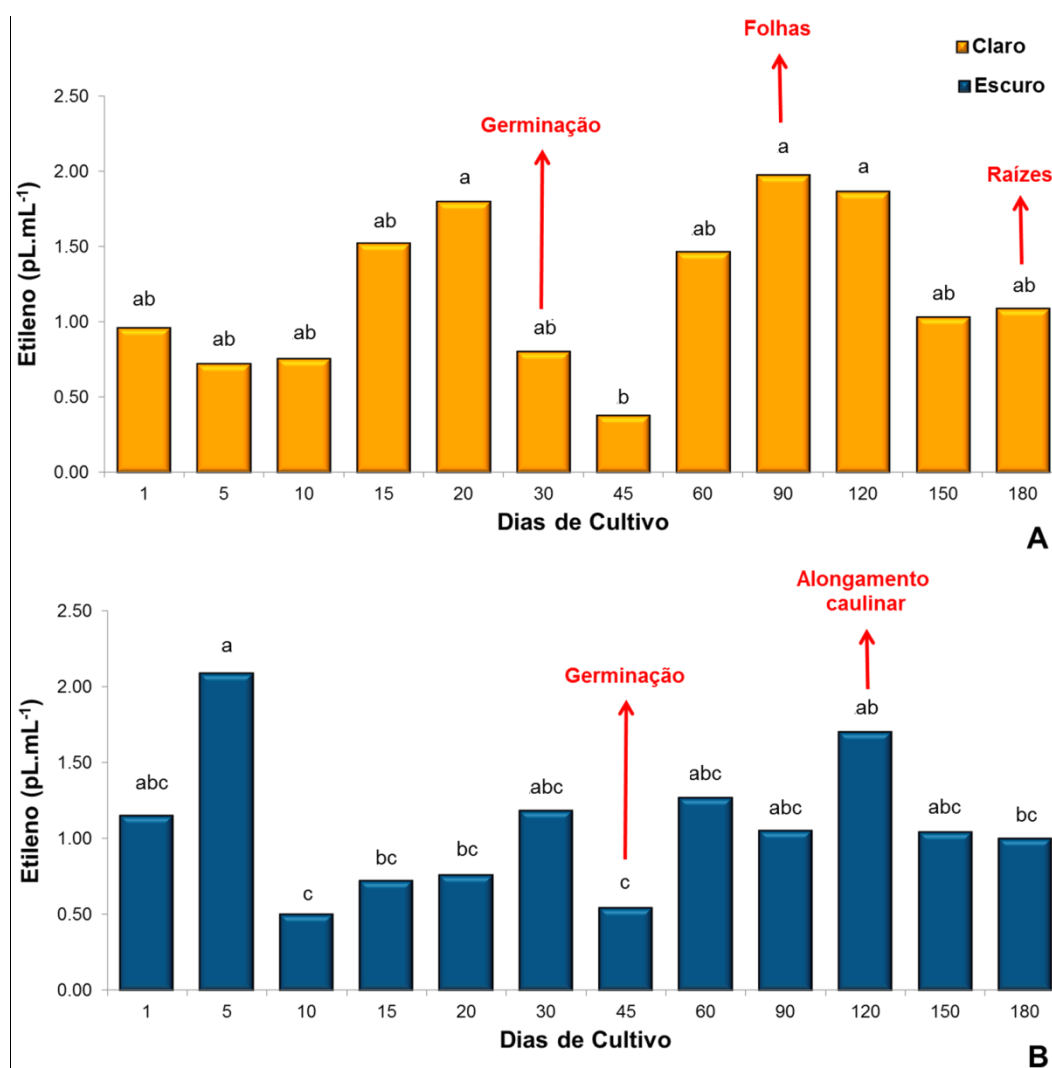


Fig. 3. Concentração de etileno de *Epidendrum denticulatum* durante os 180 dias de cultivo, em relação à luminosidade. A) Fotoperíodo de 12 h/12 h (claro) e B) Fotoperíodo de 0 h (escuro). Letras minúsculas indicam a diferença significativa entre os dias, segundo o teste Tukey ($P < 0,05$) ($n = 3$).

A concentração de etileno apresentou um aumento no período que antecedeu à germinação em ambas as condições, no entanto com início de germinação em tempos diferentes. No período anterior à germinação, aos 20 dias no claro e 30 dias no escuro, o teor de etileno foi de $1,80 \text{ pL. mL}^{-1}$ no claro e $1,18 \text{ pL. mL}^{-1}$ no escuro, uma diferença de aproximadamente 35% (Fig. 3 A-B).

No início do aparecimento das primeiras folhas durante o tratamento no claro, ocorrido aos 90 dias de cultivo (Fig. 4A), o teor de etileno foi de $1,98 \text{ pL. mL}^{-1}$ a maior concentração de etileno observada entre os dias estudados. Aos 120 dias de cultivo no escuro foi iniciado o alongamento do protocormo (Fig. 4B), indicando o início do estiolamento caulinar, neste mesmo período foi verificado um aumento da concentração de etileno, em relação ao período anterior, atingindo $1,70 \text{ pL. mL}^{-1}$.

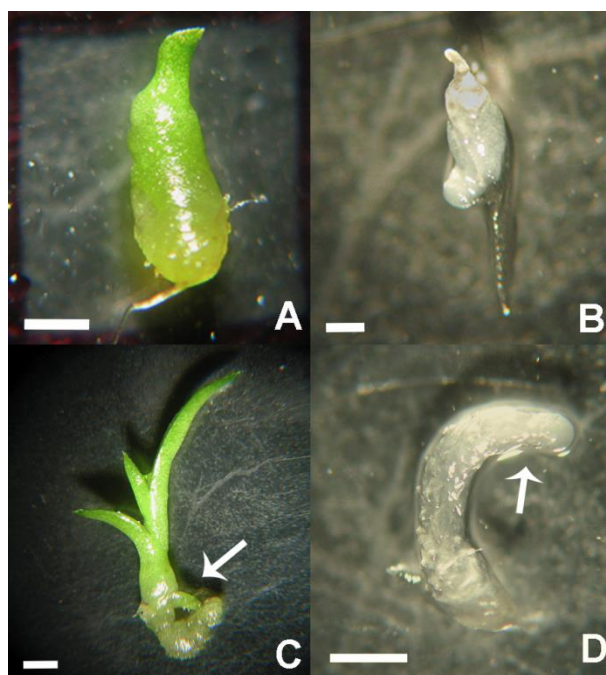


Fig. 4. Aspectos morfológicos no decorrer do desenvolvimento de *Epidendrum denticulatum*. A) 90 dias na luz; B) 120 dias no escuro; C) 180 dias na luz, seta indicando raiz e D) 180 dias no escuro, seta indicando nó. Barra de escala: 0,1cm.

Após 180 dias de cultivo no claro algumas das plântulas iniciaram o desenvolvimento radicular (Fig. 4C). No cultivo no escuro não houve desenvolvimento de raiz, no entanto aos 180 dias foi possível observar o caule estiolado com presença de um nó (Fig. 4D). Em ambos os tratamentos, claro e escuro, novamente, houve redução da concentração de etileno comparativamente ao período anterior.

As fases de desenvolvimento e o teor de etileno apresentaram correlação [$F(11,48) = 4,620$; $p < 0,001$]. Apesar de não apresentar diferença estatística significativa entre claro e escuro, as análises de interação indicaram que a luminosidade somada ao período de desenvolvimento, influenciou na concentração de etileno apresentada [$F(11,48) = 3,648$; $p < 0,001$].

Tab. 2. Parâmetros biométricos de plântulas de *E. denticulatum* após um ano de cultivo *in vitro*, nos tratamentos claro e escuro.

	Caule (cm)	Raiz (cm)	Nº Folhas	Nº Raízes	Nº Nós	Matéria Fresca (mg)	Matéria Seca (mg)
Claro	3,65 a	0,1	6	1	-	88,15 a	3,15 a
Escuro	1,85 b	-	-	-	3	7,40 b	0,30 b

Nas colunas a Mediana com letras diferentes indica variação significativa entre claro e escuro, segundo Mann-Whitney ($P < 0,05$) ($n = 10$).

Ao término de um ano de cultivo, as plantas mantidas sob luz apresentaram rápido desenvolvimento com cerca 3,48 cm de comprimento caular e 6 folhas. No cultivo no escuro os caules estiolados apresentaram desenvolvimento lento, atingindo 1,84 cm de comprimento caular, sem presença de folhas ou raízes e apenas um nó. As plantas cultivadas no claro apresentaram maiores massas de matéria fresca e seca do que as plantas cultivadas no escuro. (Tab. 2)

4. Discussão

Em relação à viabilidade das sementes de *Z. maxillare*, foi semelhante ao demonstrado por Campacci *et al.* (2017) em *Zygopetalum mackayi* que apresentou média de 51% de sementes viáveis, confirmando uma menor viabilidade de sementes no gênero *Zygopetalum*, principalmente quando comparado ao gênero *Epidendrum*. Geralmente o gênero *Epidendrum* apresenta viabilidade maior do que 80%, como em *Epidendrum fulgens* (83%) (Alvarez-Pardo & Ferreira, 2006), *Epidendrum elongatum* (89,6%) (Mercado & Manrique, 2015). No entanto, Pinheiro *et al.* (2013) apontaram que cruzamentos intrapopulacionais de *E. denticulatum* apresentaram viabilidade de sementes entre 77-94%. A diferença na porcentagem de viabilidade geralmente pode ser afetada pelo cruzamento de matrizes geneticamente próximas, devido a alta hibridização natural de *E. denticulatum* ou ainda interferência de fatores climáticos como iluminação, temperatura e disponibilidade hídrica.

Nas duas espécies estudadas o escuro inibiu drasticamente a germinação, tais resultados contradizem a literatura, pois espera-se que plantas terrícolas possam ter a germinação influenciada positivamente pelo escuro (Zeng *et al.*, 2015); apesar da diferença ser maior em *Z. maxillare* ambos tiveram menor porcentagem de germinação no escuro. O escuro não representou grande influência na germinação de *E. denticulatum* possivelmente porque o hábito terrícola facultativo desta espécie permitindo a adaptação em diferentes ambientes.

A necessidade do escuro durante a germinação de espécies terrícolas tem como função garantir que as sementes estejam enterradas no momento da germinação (Rasmussen, 1995). No entanto, diferentes resultados vêm sendo mostrados ao longo dos anos em orquídeas terrícolas, nas quais a germinabilidade pode ser influenciada pela espécie e pelo meio de cultura utilizado, apresentando diferenças dentro do mesmo gênero. O escuro estimulou a germinação em *Paphiopedilum ciliolare* (Pierik *et al.*, 1988) e *Paphiopedilum wardii* (Zeng *et al.*, 2012) e inibiu a germinação em *Paphiopedilum spicerianum* (Chen *et al.*, 2015).

Apesar de não haver diferença estatística na produção de etileno entre os tratamentos claro e escuro em diversos dias, o teor de etileno foi alterado conforme à luminosidade. No período de 5 dias de cultivo no escuro a concentração de etileno apresentou aumento relevante quando comparado ao mesmo período no claro, em ambas espécies; além disso o cultivo no escuro apresentou menor teor de etileno em 15 dias para *Zygopetalum maxillare* (Fig. 1) e 15 e 20 dias para *Epidendrum denticulatum* (Fig. 3), quando comparados ao cultivo no claro.

Nos períodos pós-germinação, de ambas as espécies, o cultivo no escuro demonstrou uma emissão do fitormônio equivalente ao cultivo no claro; mesmo com menor número de plantas produzindo etileno, devido à baixa porcentagem de germinação apresentada durante o cultivo no escuro. Tais resultados corroboram o já estabelecido conceito de que o cultivo no escuro estimula a produção de etileno (Kao & Yang, 1982; de Wit *et al.*, 2016).

Kao & Yang (1982) afirmaram que a luz inibe a produção de etileno e esta inibição é mediada pela redução da concentração de CO₂, pois o dióxido de carbono possui a função de ativar a enzima envolvida na conversão do ACC em etileno. Nas espécies estudadas a diminuição da concentração do etileno após a germinação no claro, pode ter sido ocasionada pelo início da fotossíntese realizada pelos protocormos, reduzindo a concentração de CO₂ no frasco, e consequentemente inibindo a produção de etileno.

A variação da concentração de etileno ao longo dos dias em *E. denticulatum* e *Z. maxillare* contradiz o padrão, em que as sementes começam a produção de etileno a partir do contato com a água e aumenta progressivamente ao longo do cultivo (Nascimento, 2000; Arc *et al.*, 2013). O aumento contínuo da concentração de etileno não ocorreu nas espécies estudadas provavelmente devido à ausência de endosperma nas sementes da família Orchidaceae; o contato inicial com a água desencadeia o processo de senescência do endosperma para que ocorra a germinação, tal processo é regulado pela relação antagônica entre etileno e ácido abscísico (Young *et al.*, 1997; Pirrello *et al.*, 2006; Lombardi *et al.*,

2012). É necessária uma maior concentração de etileno para induzir uma ação dos receptores no embrião do que no endosperma (Klee, 2002; Trobacher, 2009).

Diferentemente do demonstrado por diferentes famílias botânicas, que apresentaram a maior concentração de etileno durante a germinação (Takayanagi & Harrington 1971; Tonini *et al.* 2010), em *Z. maxillare* e *E. denticulatum* o período que antecede a germinação apresentou maior teor de etileno. As espécies que aumentam a concentração de etileno durante o estágio de germinação sofrem influência da testa da semente, que anteriormente a este período constitui uma barreira mecânica ou impede o contato do embrião com o oxigênio (inibindo a conversão de ACC em etileno) (Prusinski & Khan, 1990; Trobacher, 2009); tais mecanismos têm baixa ou nenhuma influência na família Orchidaceae, devido à testa de suas sementes ser simples e composta de uma única camada celular (Pinheiro *et al.*, 2004). Possivelmente tal motivo influenciou os picos de etileno pré-germinação das espécies estudadas.

Em *E. denticulatum* o cultivo no claro produziu plantas bem desenvolvidas e com maior rapidez, quando comparado ao cultivo no escuro que apresentou caules 50% menores (Fig. 4). Apesar de caules menores, o cultivo no escuro em *E. denticulatum* desenvolveu caules com diversos nós (Tab. 1) possibilitando uma reprodução futura via organogênese direta (Cap. II). A segmentação nodal caulinar, proporcionada por estiolamento caulinar, já vem sendo utilizada com o intuito de replicação clonal para propagação rápida e uniforme de diversas espécies em Orchidaceae (Suzuki & Kerbauy, 2006; Soares & Paiva, 2007; Ferreira *et al.*, 2010; Chae & Park, 2012).

O cultivo no escuro demonstrou que a indução de estiolamento por meio da germinação de sementes é muito lenta quando comparada com outros processos como a organogênese direta. Eficácia esta mostrada em *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae), que aos

60 dias de cultivo era possível obter caules estiolados de aproximadamente 5 cm de comprimento com diversos nós contendo gemas axiais (Suzuki & Kerbauy 2006).

Ao final de um ano, o cultivo no escuro apresentou maior influência positiva no desenvolvimento de *Z. maxillare*; apesar de não demonstrarem estiolamento, as plantas cultivadas no escuro apresentaram brotações laterais e maior massa de matéria fresca e seca (Tab. 2). Tal diferença quanto à luminosidade apresentada pelas duas espécies é equivalente ao hábitat de cada uma; apesar de *E. denticulatum* possuir hábito terrícola, é encontrada em Campos Rupestres e Florestas de Galeria, demonstrando maior afinidade à alta luminosidade, diferentemente de *Z. maxillare* que possui hábito epifítico mas é encontrado em Floresta Ombrófila e Floresta Estacional Semidecidual, com sensibilidade à luz solar e bem adaptado ao sombreamento (Flora do Brasil 2020) .

5. Conclusão

A concentração de etileno apresentou alta correlação com o desenvolvimento das espécies estudadas, com redução da concentração do fitormônio durante a germinação (em ambas as espécies) e aumentando durante o aparecimento de folhas, raízes e nós (em *E. denticulatum*), confirmando assim que o etileno influi diretamente na formação das plantas. O cultivo no escuro foi mais efetivo no desenvolvimento de plantas de *Z. maxillare*; apesar de não demonstrarem estiolamento, as plantas cultivadas no escuro apresentaram brotações laterais. Em *E. denticulatum*, no claro, as plantas apresentaram comprimento maior, enquanto no escuro houve indução do estiolamento. Em ambas as espécies o cultivo no escuro permitiria futuramente a multiplicação das plantas, utilizando-se caules estiolados como fonte de explante.

6. Referências

- Arc, E., Sechet, J., Corbineau, F., Rajjou, L. & Marion-Poll, A. 2013. ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Frontiers in Plant Science* 4, 1–20 <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00063>.
- Camargo, S. S., Rodrigues, D. B., Rodrigues, C. M., Assis, A. M. de, Faria, R. T. de & Schuch, M. W. 2015. Phytohormones and light spectrum in micropropagation *Oncidium baueri* Lindl. *Ciência Rural* 45, 2007–2012 <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20141780>.
- Campacci, T. V. S., Castanho, C. T., Oliveira, R. L. F., Suzuki, R. M., Catharino, E. L. M. & Koehler, S. 2017. Effects of pollen origin on apomixis in *Zygopetalum mackayi* orchids. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 226, 96–103 <https://doi.org/10.1016/j.flora.2016.11.013>.
- Chae, S. & Park, S. 2012. Improved shoot organogenesis of *Echinacea angustifolia* DC treated with ethylene inhibitors. *Life Science Journal* 9, 1725–1728.
- Chen, Y., Goodale, U. M., Fan, X. L. & Gao, J. Y. 2015. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Paphiopedilum spicerianum*: An orchid with an extremely small population in China. *Global Ecology and Conservation* 3, 367–378 <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2015.01.002>.
- de Wit, M., Galvão, V. C. & Fankhauser, C. 2016. Light-mediated hormonal regulation of plant growth and development. *Annual Review of Plant Biology* 67, 513–537 <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-112252>.
- Ferreira, W. D. M., Suzuki, R. M., Pescador, R., Figueiredo-Ribeiro, R. D. C. L. & Kerbaui, G. B. 2010. Propagation, growth, and carbohydrates of *Dendrobium* Second Love (Orchidaceae) *in vitro* as affected by sucrose, light, and dark. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 47, 420–427 <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9311-x>.
- Flora do Brasil. 2020. Orchidaceae. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB179>

- Gow, W. P., Chen, J. T. & Chang, W. C. 2008. Influence of growth regulators on direct embryo formation from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids. *Acta Physiologiae Plantarum* 30, 507–512 <https://doi.org/10.1007/s11738-008-0148-4>.
- Hanke, M. & Dolwet, H. H. A. 1976. The production of ethylene by certain soil fungi. *Sci. Biol. J.* 10, 151–211.
- Haydon, M. J., Mielczarek, O., Frank, A., Román, Á. & Webb, A. A. 2017. Sucrose and ethylene signaling interact to modulate the circadian clock. *Plant Physiology* <https://doi.org/10.1104/pp.17.00592>.
- Kao, C. H. & Yang, S. F. 1982. Light inhibition of the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in leaves is mediated through carbon dioxide. *Planta* 155, 261–266 <https://doi.org/10.1007/BF00392725>.
- Klee, H. J. 2002. Control of ethylene-mediated processes in tomato at the level of receptors. *Journal of Experimental Botany* 53, 2057–2063 <https://doi.org/10.1093/jxb/erf062>.
- Lakon, G. 1949. The topographical tetrazolium method for determining the germinating capacity of seeds. *Plant Physiology* 24, 389–394.
- Lee, H. B., An, S. K., Lee, S. Y. & Kim, K. S. 2017. Vegetative growth characteristics of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* plants under different artificial lighting sources. *Korean Journal of Horticultural Science&Technology* 35 <https://doi.org/10.12972/kjhst.20170003>.
- Lombardi, L., Mariotti, L., Picciarelli, P., Ceccarelli, N. & Lorenzi, R. 2012. Ethylene produced by the endosperm is involved in the regulation of nucellus programmed cell death in *Sechium edule* Sw. *Plant Science* 187, 31–38 <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.01.011>.
- Mercado, S. A. S. & Manrique, J. D. G. 2015. Determining the viability of orchid seeds using the Tetrazolio and Carmín Índigo tests. *Rev. ciencias uvalle* 19, 59–69.
- Micheneau, C., Johnson, S. D. & Fay, M. F. 2009. Orchid pollination: From Darwin to the present day. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161, 1–19 <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.00995.x>.
- Miyoshi, K. & Mii, M. 1995. Phytohormone pre-treatment for the enhancement of seed

germination and protocorm formation by the terrestrial orchid, *Calanthe discolor* (Orchidaceae), in asymbiotic culture. *Scientia Horticulturae* 63, 263–267 [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(95\)00813-9](https://doi.org/10.1016/0304-4238(95)00813-9).

Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with *Tobacco* tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473–497 <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.

Nakamura, S. J., Uchida, T. & Hamada, M. 1975. Atmospheric condition controlling the seed germination of an achlorophyllous orchid, *Galeola septentrionalis*. *The Botanical Magazine Tokyo* 88, 103–109 <https://doi.org/10.1007/BF02491245>.

Nascimento, W. M. 2000. Envolvimento do etileno na germinação de sementes. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12, 163–174.

Nunes, C. E. P., Wolowski, M., Pansarin, E. R., Gerlach, G., Aximoff, I., Vereecken, N. J., Salvador, M. J. & Sazima, M. 2017. More than *Euglossines*: the diverse pollinators and floral scents of *Zygopetalinae* orchids. *Die Naturwissenschaften* 104, 92 <https://doi.org/10.1007/s00114-017-1511-3>.

Pierik, R. L. M., Sprenkels, P. A., Van Der Harst, B. & Van Der Meys, Q. G. 1988. Seed germination and further development of plantlets of *Paphiopedilum ciliolare* Pfitz. *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 34, 139–153 [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(88\)90084-2](https://doi.org/10.1016/0304-4238(88)90084-2).

Pinheiro, F., Barros, F. & Lourenço, R. A. 2004. O que é uma Orquídea? In *Orquidologia Sul-Americana: uma compilação científica*. Barros, F. & Kerbauy, G. B, orgs. Secretaria do meio ambiente/Instituto de Botânica, (p. 11-33).São Paulo.

Pirrello, J., Jaimes-Miranda, F., Sanchez-Ballesta, M. T., Tournier, B., Khalil-Ahmad, Q., Regad, F., Latché, A., Pech, J. C. & Bouzayen, M. 2006. Sl-ERF2, a tomato ethylene response factor involved in ethylene response and seed germination. *Plant and Cell Physiology* 47, 1195–1205 <https://doi.org/10.1093/pcp/pcj084>.

Prusinski, J. & Khan, A. A. 1990. Relationship of ethylene production to stress alleviation in

seeds of lettuce cultivars. *Journal of the American Society of Horticultural Sciences* 115, 294–298 <https://doi.org/10.1080/01490450490438757>.

Rasmussen, H. N. 1995. *Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press.

Rasmussen, H. N. & Rasmussen, F. N. 2009. Orchid mycorrhiza: Implications of a mycophagous life style. *Oikos* 118, 334–345 <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2008.17116.x>.

Rodrigues, M. A., Freschi, L., Purgatto, E., Lima, V. F. G. A. P. & Kerbaudy, G. B. 2014. Ethylene modulates the developmental plasticity and the growth balance between shoot and root systems in the *in vitro* grown epiphytic orchid *Catasetum fimbriatum*. *Journal of Plant Growth Regulation* 33, 513–525 <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9399-4>.

Schneiders, D., Pescador, R., Booz, M. R. & Suzuki, R. M. 2012. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). *Revista Ceres* 59, 185–191 <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2012000200006>.

Soares, F. & Paiva, R. 2007. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). *Ciência e Agrotecnologia* 31, 1048–1053.

Suzuki, R. M. & Kerbaudy, G. B. 2006. Effects of light and ethylene on endogenous hormones and development of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae). *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18, 359–365.

Takayanagi, K. & Harrington, J. F. 1971. Enhancement of germination rate of aged seeds by ethylene. *Plant physiology* 47, 521–524.

Teixeira da Silva, J. A. 2013. The effect of ethylene inhibitors (AgNO₃, AVG), an ethylene-liberating compound (CEPA) and aeration on the formation of protocorm-like bodies of hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae). *Frontiers in Biology* 8, 606–610 <https://doi.org/10.1007/s11515-013-1283-x>.

Tonini, P. P., Purgatto, E. & Buckeridge, M. S. 2010. Effects of abscisic acid, ethylene and sugars on the mobilization of storage proteins and carbohydrates in seeds of the tropical tree

- Sesbania virgata* (Leguminosae). *Annals of Botany* 106, 607–616
<https://doi.org/10.1093/aob/mcq159>.
- Trobacher, C. P. 2009. Ethylene and programmed cell death in plants. *Botany* 87, 757–769
<https://doi.org/10.1139/B09-041>.
- Vieira, H. D., Roberto, F., & Barros, R. S. 1998. Efeito De Substâncias Reguladoras De Crescimento Sobre a Germinação De Sementes De Braquiário Cv. Marandu. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegeta* 10, 143–148.
- Yeung, E. C. 2017. A perspective on orchid seed and protocorm development. *Botanical Studies* 58, 33 <https://doi.org/10.1186/s40529-017-0188-4>.
- Young, T. E., Callie, D. R. & Demason, D. A. 1997. Ethylene-mediated programmed cell death during maize endosperm development of wild-type and shrunken2 genotypes. *Plant Physiology* 115, 737–751.
- Zeng, S., Huang, W., Wu, K., Zhang, J., Teixeira da Silva, J. A. & Duan, J. 2015. *In vitro* propagation of *Paphiopedilum* orchids. *Critical Reviews in Biotechnology* 0, 1–14
<https://doi.org/10.3109/07388551.2014.993585>.
- Zeng, S., Wu, K., Teixeira da Silva, J. A., Zhang, J., Chen, Z., Xia, N. & Duan, J. 2012. Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid. *Scientia Horticulturae* 138, 198–209
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.02.026>.
- Zeng, S., Zhang, Y., Teixeira Da Silva, J. A., Wu, K., Zhang, J. & Duan, J. 2014. Seed biology and *in vitro* seed germination of *Cypripedium*. *Crit Rev Biotechnol* 34, 1549–7801
<https://doi.org/10.3109/07388551.2013.841117>.

CAPÍTULO II

Organogênese direta e reguladores de etileno na clonagem de *Zygopetalum maxillare* e *Epidendrum denticulatum* (Orchidaceae)

Resumo

A popularização do comércio e o alto risco de extinção dos representantes da família Orchidaceae, aumentou a necessidade de técnicas eficazes de clonagem, como a organogênese direta. O presente estudo tem como objetivo analisar a influência do etileno durante a micropropagação de *Zygopetalum maxillare* e *Epidendrum denticulatum*; além de verificar a ação de reguladores de etileno. Os explantes obtidos do seccionamento de caules estiolados, contendo uma gema lateral, foram inoculados no meio MS com ou sem adição de AgNO₃, CoCl₂ e CEPA. Foram realizadas dosagens de etileno em 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 dias após a inoculação, em fotoperíodo de 12 h/12 h (claro) e 0 h (escuro). As maiores plantas, em ambas as espécies, apresentaram as menores concentrações de etileno; no entanto a adição de CEPA promoveu maior diferenciação dos explantes em plantas. Tais resultados proporcionam melhor entendimento da ação do etileno durante o desenvolvimento das gemas laterais destas espécies, subsidiando futuros programas de propagação das orquídeas nativas brasileiras.

Palavras-chave: Cloreto de cobalto; Ethephon; Escuro; Nitrato de prata.

Abstract

The popularization of commerce and the high risk of extinction of representatives of the Orchidaceae family has increased the need for effective cloning techniques such as direct organogenesis. The present study aims to analyze the influence of ethylene during the micropropagation of *Zygopetalum maxillare* and *Epidendrum denticulatum*; besides checking the action of ethylene regulators. The explants obtained from the sectioning of etiolated shoots, containing a lateral gem, were inoculated in the MS medium with or without addition of AgNO₃, CoCl₂ and CEPA. Ethylene dosages were performed at 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45 and 60 days after inoculation, in a photoperiod of 12 h / 12 h (light) and 0 h (dark). The largest plants, in both species, had the lowest concentrations of ethylene; however the addition of CEPA promoted greater differentiation of explants in plants. These results provide a better understanding of the action of ethylene during the development of the lateral buds of these species, helping the propagation of Brazilian native orchids.

Keywords: Cobalt chloride; Dark; Ethephon; Silver nitrate.

1. Introdução

Atualmente as orquídeas ocupam a maior produção de plantas em vasos do Brasil (Ibraflor, 2017), atingindo uma produtividade de aproximadamente 12 milhões de vasos por ano (Reis, 2011). Devido à popularização do comércio e ao alto risco de extinção dos representantes da família Orchidaceae, aumentou a necessidade do uso de técnicas eficazes de reprodução; com o intuito de promover uma multiplicação rápida de exemplares, livres de patógenos e fiéis geneticamente às matrizes (Ferreira *et al.*, 2010; Anis & Ahmad, 2016). Além de ampliar a expressão comercial, os métodos de reprodução possibilitam um comércio sustentável que indiretamente auxilia na conservação de espécies nativas uma vez que presumivelmente há redução de coletas ilegais (Zeng *et al.*, 2014), devido à maior disponibilidade de mudas de orquídeas comercializáveis legalmente.

Entre as principais técnicas de micropropagação está a organogênese (direta ou indireta), que consiste na regeneração de tecidos que apresentam potencial morfogênético (Smith, 2013); iniciando pela especificação de células competentes na formação de calos ou primórdios até o desenvolvimento de órgãos, gerando uma nova planta (Motte *et al.*, 2014). Na organogênese direta ocorre a formação de gemas ou brotos diretamente de um explante (folhas, segmentos de caules e raízes, entre outros) e o sistema vascular da nova planta torna-se uma extensão do explante matriz (Duclercq *et al.*, 2011). Devido à não ocorrência da etapa de desdiferenciação e da formação de calos há consequentemente uma menor possibilidade de variação somaclonal permitindo uma reprodução com alta fidelidade genética, com plantas idênticas às matrizes (Guo *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2010; Mali & Chavan, 2016).

Durante muito tempo a segmentação caulinar em Orchidaceae vem sendo utilizada com intuito de promover a organogênese direta, sendo eficaz em gêneros como *Dendrobium*, *Paphiopedilum*, *Spathoglottis*, *Habenaria*, *Cattleya*... entre outros (Jones & Tisserat, 1990; Chen *et al.*, 2002; Medina *et al.*, 2009; Hajong *et al.*, 2013; Hossain & Dey, 2013; Rodrigues

et al., 2017). Ao longo dos anos a segmentação caulinar, proporcionada por prévio estiolamento caulinar, demonstrou maior eficiência, aumentando o número de nós e consequentemente uma propagação rápida e uniforme, como demonstrado em estudos com *Catasetum fimbriatum* (Suzuki *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2014).

A organogênese *in vitro* é influenciada por diferentes fatores, entre eles o estado fisiológico do explante/matriz, nutrição mineral, interação entre fitohormônios e fatores ambientais. Por este motivo, diversos avanços tecnológicos na regeneração de plantas têm sido relacionados com a manipulação de trocas gasosas e o balanço hormonal, durante o cultivo *in vitro* (Phillips, 2004). Durante a morfogênese *in vitro* as células são afetadas por substâncias voláteis, que se acumulam no interior dos frascos do cultivo, produzidas pelo metabolismo secundário das plantas (Hughes, 1981). Entre os voláteis mais produzidos pelos tecidos está o etileno, a resposta ao estresse proporcionada por este varia com a espécie e as condições de cultivo (Baldwin, 2010). No entanto, o acúmulo de etileno no cultivo *in vitro*, geralmente é correlacionado a um efeito negativo sobre a organogênese caulinar (Biddington, 1992; Chatfield & Raizada, 2008).

Diversas pesquisas têm sido realizadas para regular a ação do etileno, por meio da utilização de inibidores de etileno, bloqueando sua biossíntese ou sua ação, com intuito de aumentar a regeneração de tecidos e a formação de brotos axiais durante a organogênese direta (Ozden-Tokatli *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2009; Chae & Park, 2012; Lei *et al.*, 2014). Têm sido amplamente utilizados na inibição de etileno: o nitrato de prata (AgNO_3) e cloreto de cobalto (CoCl_2) e, contrariamente, para aumentar a síntese de etileno, o ácido 2-cloroetilfosfônico (CEPA) (Ethrel ou Ethephon – nome comercial) (Yang, 1969; Chae *et al.*, 2012; Teixeira Da Silva, 2013; Prazak, 2014; Saha & Gupta, 2018).

Ao longo do tempo percebe-se que para a obtenção de técnicas de micropropagação eficazes é necessária à compreensão de processos fisiológicos, responsáveis por adaptações

ecológicas, resposta a estresse e regeneração celular. Por esse motivo o presente estudo tem como objetivo estudar a influência do etileno durante a organogênese direta de *Zygopetalum maxillare* e *Epidendrum denticulatum*, durante o cultivo no claro e no escuro, além de verificar os efeitos de reguladores de etileno no cultivo destas espécies.

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção do material biológico

O experimento foi conduzido no laboratório de cultivo *in vitro*, do Núcleo de Pesquisa Orquidário do Estado, do Instituto de Botânica, em São Paulo-SP, Brasil. Utilizou-se plantas de *Zygopetalum maxillare* e *Epidendrum denticulatum*, previamente cultivadas *in vitro* na ausência de luz (Cap.1), que desenvolveram caules estiolados que foram posteriormente seccionados e usados para micropropagação das espécies os segmentos nodais com presença de uma gema lateral (Fig. 1).

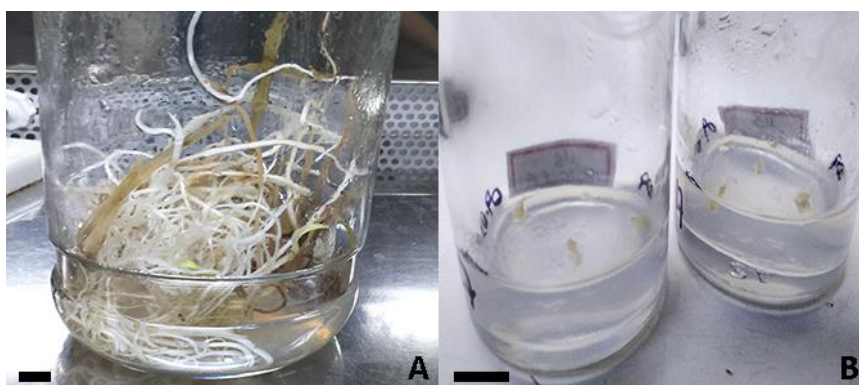


Fig. 1. Plantas previamente produzidas na ausência de luz, durante o Capítulo I. A) Caules estiolados; B) Segmentos nodais inoculados. Barra de escala: 1 cm.

2.2. Estabelecimento do cultivo *in vitro*

O meio de cultura base para a reprodução foi o meio MS (Murashige & Skoog 1962) com adição de reguladores de etileno, utilizando-se, para esta finalidade, nitrato de prata

(AgNO₃), cloreto de cobalto (CoCl₂) e CEPA (ácido 2-cloro-etil-fosfônico/ C₂H₆ClO₃P), nas concentrações: 0 (Controle), 5 µM, 10 µM, 20 µM e 40 µM. O meio foi suplementado com 2% de sacarose e geleificado com 0,4% de ágar bacteriológico, o pH foi ajustado para 5,8 ± 0,05, anteriormente à adição de ágar. Após homogeneização em temperatura de ebulição (cerca de 100 °C) foram distribuídos 5 ml dos meios, em frascos de 30 ml de capacidade e selados com tampa emborrachada, que impede a troca gasosa. A esterilização dos meios foi realizada em autoclave durante 15 minutos, a 120 °C e 1,3 atm. A adição de CEPA foi realizada após a esterilização em autoclave, devido a seu baixo ponto de ebulição. A solução de CEPA foi esterilizada por filtração, utilizando-se filtro Millipore de 0,22 µm.

Os caules estiolados foram seccionados e retirados explantes de 5 mm, contendo uma gema lateral. Após a inoculação dos explantes, os frascos foram mantidos em câmara de crescimento com temperatura de 25 °C ± 2 °C, sob fotoperíodo de 12 h/12 h (claro) e 0 h/24 h (escuro), proporcionado por lâmpadas fluorescentes que fornecem 30 µmol m⁻²s⁻¹ de radiação fotossinteticamente ativa, e no escuro sob as mesmas condições de temperatura, ambas durante 90 dias de cultivo.

2.3. Quantificação de etileno

Para as análises de etileno, foram coletadas três amostras dos seguintes períodos: 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 dias de cultivo após a inoculação; utilizando-se de seringa de 100 µL do tipo “gas-tight”. As amostras foram quantificadas em cromatógrafo a gás acoplado a um detector de ionização de chama (GC-DIC / HP-6890) e uma coluna HP - Plot / Q (30 m, I.D. 0,53 mm). As temperaturas do injetor e do detector foram de 250 °C. O nitrogênio foi o gás carreador utilizado em uma vazão de 10 mL min⁻¹ com coluna isotérmica a 30 °C.

2.4. Parâmetros biométricos

Após três meses de cultivo, cada tratamento foi avaliado quanto à porcentagem de explantes diferenciados, sendo considerados aqueles que iniciaram a formação de plântulas. Foram coletados dados biométricos dos caules estiolados crescidos no escuro ou das plântulas crescidas na luz, sendo oito amostras por tratamento de cada espécie. Foram avaliados os seguintes parâmetros biométricos de crescimento: comprimento de caule e raiz, número de folhas, raízes e nós das plantas.

2.5. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente ao acaso em um esquema fatorial $2 \times 2 \times 3 \times 4$. Assim, os tratamentos consistiram da combinação de 2 espécies (*Zygopetalum maxillare* e *Epidendrum denticulatum*), 2 fotoperíodos (claro - 12 h/12 h e escuro - 0 h/24 h), 3 reguladores de etileno (nitrato de prata; cloreto de cobalto e CEPA) e 4 concentrações de reguladores de etileno (0, 10, 20 e 40 μM), perfazendo assim 24 tratamentos, sendo 8 repetições por tratamento, totalizando 240 explantes.

Para a concentração do etileno, o delineamento experimental adotado foi o inteiramente ao acaso em um esquema de parcelas subdivididas no tempo (“split plot in time”), com 2 parcelas (espécies), 8 subparcelas (data de amostragens) e três repetições (amostras). Os dados de quantificação de etileno sofreram transformação logarítmica ($\log_{10}$), para obtenção de homogeneidade das variâncias e da normalidade dos dados. Após transformação foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de separação de médias utilizando-se o teste Tukey em nível de 5% de significância.

Os parâmetros biométricos de crescimento foram obtidos de 8 repetições e os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$).

Para a análise estatística foi utilizado o software SPSS 20.0.

3. Resultados

3.1. *Zygopetalum maxillare*

3.1.1. Quantificação de etileno

As análises de quantificação de etileno demonstraram que existe uma variação na concentração do fitormônio em relação aos dias de cultivo. Os tratamentos com adição de nitrato de prata apresentaram as maiores concentrações de etileno 5 dias após a inoculação, exceto em 5 μM , seguido este período ambos os cultivos luminosos apresentaram diminuição da produção de etileno ao longo dos dias (Tab. 1).

Durante o cultivo no claro não houve diferença significativa entre os tratamentos dentro de cada tempo; no entanto, a concentração de 20 μM de AgNO_3 apresentou a menor concentração de etileno no primeiro dia de cultivo e 10 μM de AgNO_3 a menor concentração aos 60 dias de cultivo. A concentração de 40 μM de AgNO_3 , aos 5 dias, apresentou o maior teor dentre todos os tempos e todos os tratamentos. Além disso o período de 5 dias foi o único entre todos os períodos em que os tratamentos contendo nitrato de prata ultrapassaram os valores de etileno em comparação com o tratamento controle. (Tab. 1)

Tabela 1. Concentração de etileno em *Zygopetalum maxillare* durante 60 dias de cultivo, com adição de AgNO₃. Letras maiúsculas indicam a diferença significativa dos tratamentos de AgNO₃ entre os dias; letras minúsculas indicam a diferença significativa dos tratamentos de AgNO₃ dentro de cada tempo, segundo o teste Tukey (P<0,05) (n= 3).

Tratamentos Luminosos		Concentração de etileno (pL.mL ⁻¹)											
		Claro						Escuro					
AgNO ₃ (µM)		0	5	10	20	40	Média*	0	5	10	20	40	Média*
Cultivo em dias	1	1,66 aA	1,27 aA	1,31 aAB	1,00 aB	1,28 aAB	1,31 B	1,70aA	0,97 aA	1,08 aABC	1,21 aAB	1,41 aA	1,28 BC
	5	1,47 aA	1,84 aA	1,83 aA	1,70 aA	2,01 aA	1,77 A	1,53aAB	2,12 aA	1,71 aA	1,84 aA	2,06 aA	1,85 A
	10	1,46 aA	1,39 aA	1,29 aAB	1,27 aB	1,51 aAB	1,39 B	1,46aAB	1,61 aA	1,19 aAB	1,35 aAB	1,56 aA	1,43 AB
	15	1,45 aA	1,26 aA	1,16 aAB	1,15 aB	1,41 aAB	1,29 B	1,46aAB	1,47 aA	1,07 aABC	1,23 aAB	1,43 aA	1,33 BC
	20	1,47 aA	1,14 aA	1,16 aAB	1,26 aB	1,48 aAB	1,30 B	1,51aAB	1,49 aA	1,13 aAB	1,34 aAB	1,48 aA	1,39 ABC
	30	1,33 aA	1,12 aA	1,09 aB	1,17 aB	1,25 aB	1,19 B	1,40aAB	1,21 aA	0,87 aBC	1,16 aAB	1,17 aA	1,16 BC
	45	1,19 aA	1,23 aA	1,14 aAB	1,21 aB	1,39 aAB	1,23 B	1,29aAB	1,18 aA	0,73 aBC	1,14 aAB	1,19 aA	1,11 BC
	60	1,13 aA	1,28 aA	1,10 aB	1,22 aB	1,34 aAB	1,21 B	1,26aB	0,98 aA	0,44 aC	0,85 aB	1,11 aA	0,93 C

*Média de todos os tratamentos dentro de cada tempo.

Na ausência de luz, de modo geral, as plantas cultivadas nos meios com adição de AgNO_3 apresentaram redução gradativa na emissão de etileno, a partir de 15 dias, quando comparadas as plantas do tratamento controle; apesar de não haver diferença estatística significativa entre os tratamentos. A partir do décimo dia de cultivo, as plantas cultivadas no meio contendo 10 μM de AgNO_3 apresentaram a menor emissão de etileno, enquanto o tratamento com 40 μM atingiu os maiores teores de etileno, em alguns períodos ultrapassando o tratamento controle. (Tab. 1)

As plantas submetidas aos experimentos com adição de cloreto de cobalto apresentaram as menores concentrações de etileno no primeiro dia; aos 5 dias apresentaram os maiores teores de etileno liberado, tanto no claro quanto no escuro (Tab. 2).

O cultivo sob luz, apresentou drástica redução na concentração de etileno no dia 10, mostrando oscilação no teor de etileno principalmente nas plantas submetidas a 10 e 20 μM de CoCl_2 . A concentração de 10 μM diminuiu a emissão do etileno aos 15 dias e elevou-se aos 20 dias, enquanto a concentração de 20 μM diminuiu a emissão aos 20 dias e elevou-se aos 30 dias. Ao término do experimento, em torno de 45 e 60 dias, a presença de etileno, em todos os tratamentos contendo CoCl_2 , foi maior quando comparada ao período anterior equiparando-se à concentração de etileno do tratamento controle. (Tab. 2)

As amostras cultivadas no escuro sofreram influência do cloreto de cobalto a partir do dia 10, quando todas as concentrações de CoCl_2 apresentaram menor teor de etileno do que o tratamento controle, em todos os tempos. A adição de 40 μM de CoCl_2 apresentou a menor média de etileno aos 60 dias (Tab. 2).

Tabela 2. Concentração de etileno em *Zygopetalum maxillare* durante 60 dias de cultivo, com adição de CoCl_2 . Letras maiúsculas indicam a diferença significativa dos tratamentos de CoCl_2 entre os dias; letras minúsculas indicam a diferença significativa dos tratamentos de CoCl_2 dentro de cada tempo, segundo o teste Tukey ($P < 0,05$) ($n = 3$).

Tratamentos Luminosos		Concentração de etileno (pL.mL ⁻¹)											
		Claro						Escuro					
CoCl ₂		0	5	10	20	40	Média*	0	5	10	20	40	Média*
(μM)													
Cultivo em dias	1	1,66 aA	0,72 bB	0,61 bA	1,12 abAB	0,91 bB	1,00 B	1,70 aA	0,85 abA	0,93 abA	0,93 abAB	0,37 bC	0,95 B
	5	1,47 aA	1,75 aA	1,47 aA	1,70 aA	1,86 aA	1,65 A	1,53 aAB	1,64 aA	1,75 aA	1,56 aA	1,79 aA	1,65 A
	10	1,46 aA	1,26 aAB	0,98 aA	1,24 aAB	1,37 aAB	1,26 AB	1,46 aAB	1,13 aA	1,23 aA	1,05 aAB	1,24 aAB	1,22 AB
	15	1,45 aA	1,16 abAB	0,79 bA	1,12 abAB	1,03 abB	1,11 B	1,46 aAB	1,00 aA	0,99 aA	0,94 aAB	1,10 aAB	1,10 AB
	20	1,47 aA	1,24 aAB	1,11 aA	0,81 aB	1,07 aB	1,14 B	1,51 aAB	1,08 aA	1,22 aA	0,99 aAB	1,12 aAB	1,18 AB
	30	1,33 aA	1,25 aAB	1,07 aA	1,03 aAB	0,91 aB	1,12 B	1,40 aAB	0,87 aA	1,05 aA	0,79 aAB	0,73 aBC	0,97 B
	45	1,19 aA	1,10 aAB	1,19 aA	1,13 aAB	1,23 aAB	1,17 B	1,29 aAB	0,86 aA	1,13 aA	0,86 aAB	0,56 aBC	0,94 B
	60	1,13 aA	1,09 aAB	1,18 aA	1,11 aAB	1,11 aB	1,12 B	1,26 aB	0,69 abA	1,07 abA	0,41 abB	0,24 bC	0,73 B

*Média de todos os tratamentos dentro de cada tempo.

Em geral, a adição de CEPA aumentou o teor de etileno dos frascos, principalmente no início do cultivo. Durante o experimento sob luz, o aumento do etileno foi proporcional ao aumento da concentração de CEPA, exceto a concentração de 5 μM de CEPA que apresentou, em todos os tempos, menor concentração de etileno que o tratamento controle; além disso, tal concentração induziu diminuição do etileno com o passar dos dias. (Tab. 3)

Na ausência de luz, uma redução na concentração de etileno foi iniciada a partir de 20 dias de cultivo. A partir desse ponto, as plantas cultivadas nas concentrações de 5 μM e 20 μM de CEPA apresentaram menor conteúdo de etileno do que às do tratamento controle, dado este também apresentado aos 45 dias na concentração de 10 μM , demonstrando teor de etileno menor que o controle e elevando-se novamente aos 60 dias, atingindo a maior concentração de etileno entre todos os tratamentos. Ao término do experimento (60 dias) a concentração de 5 μM atingiu a menor média no teor de etileno. (Tab. 3)

Tabela 3. Concentração de etileno em *Zygopetalum maxillare* durante 60 dias de cultivo, com adição de CEPA. Letras maiúsculas indicam a diferença significativa dos tratamentos de CEPA entre os dias; letras minúsculas indicam a diferença significativa dos tratamentos de CEPA dentro de cada tempo, segundo o teste Tukey ($P < 0,05$) ($n = 3$).

Tratamentos Luminosos		Concentração de etileno (pL.mL ⁻¹)											
		Claro						Escuro					
CEPA (µM)	0	5	10	20	40	Média*	0	5	10	20	40	Média*	
Cultivo em dias	1	1,66 cA	1,56 cA	2,06 bA	2,37 abA	2,57 aA	2,05 A	1,70 cA	1,80 bcA	1,92 bcA	2,13 bA	2,61 aA	2,03 A
	5	1,47 bcA	1,34 cAB	1,78 bA	2,18 aAB	2,34 aAB	1,82 A	1,53 cAB	1,57 cAB	1,79 bcA	1,93 bAB	2,40 aA	1,84 AB
	10	1,46 bcA	1,25 cABC	1,79 bA	2,13 aAB	2,30 aAB	1,79 A	1,46 cAB	1,52 bcAB	1,69 bcA	1,85 bAB	2,35 aA	1,78 AB
	15	1,45 bcA	1,14 cBC	1,75 bA	2,11 aAB	2,22 aAB	1,73 A	1,46 bAB	1,43 bABC	1,69 bA	1,95 abAB	2,32 aA	1,77 AB
	20	1,47 cdA	1,11 dBC	1,71 bcA	2,06 abAB	2,20 aAB	1,71 A	1,51 bAB	1,31 bABC	1,61 abA	1,61 abABC	2,26 aA	1,66 AB
	30	1,33 bcA	0,88 cCD	1,68 abA	1,81 abAB	1,92 aAB	1,52 A	1,40 aAB	0,96 aBCD	1,38 aA	1,15 aABC	2,00 aA	1,38 AB
	45	1,19 bA	0,53 bDE	1,56 aA	1,58 aB	1,68 aB	1,31 A	1,29 aAB	0,77 aCD	1,08 aA	0,73 aC	1,70 aA	1,11 B
	60	1,13 aA	0,28 aE	1,44 aA	1,69 aAB	1,72 aAB	1,25 A	1,26 aB	0,50 aD	1,57 aA	1,06 aBC	1,50 aA	1,18 B

*Média de todos os tratamentos dentro de cada tempo.

3.1.2. Porcentagem de sobrevivência das plantas e morfologia

- **Nitrato de prata**

Os explantes de *Z. maxillare* cultivados no claro e submetidos aos tratamentos que continham AgNO_3 , apresentaram porcentagem de sobrevivência semelhante ou abaixo do tratamento controle. Os experimentos com adição de 10, 20 e 40 μM apresentaram uma pequena redução sobrevivência (25% de plantas viáveis) com relação ao controle e a 5 μM de AgNO_3 (ambos com 33% de plantas viáveis). Além disso, o tratamento controle e 5 μM de AgNO_3 apresentaram plantas maiores (4,2 e 3,0 cm; respectivamente) e com presença de raiz, contrariamente às outras concentrações, que diminuíram o vigor das plantas conforme o aumento da concentração, sendo que em 40 μM observou-se o menor comprimento caulinar (0,3 cm). (Tab. 4 / Anexo I)

Semelhantemente ao ocorrido durante o cultivo no claro, os explantes de *Z. maxillare* cultivados no escuro e submetidos aos tratamentos que continham AgNO_3 , apresentaram porcentagem de sobrevivência semelhante ou menor do que o controle. O tratamento com 10 μM de AgNO_3 apresentou porcentagem de plantas viáveis semelhante ao controle (33%), enquanto as outras concentrações causaram redução da sobrevivência das plantas, atingindo a menor porcentagem no meio com 40 μM de AgNO_3 (8%). Morfologicamente as plantas submetidas a 10 μM de AgNO_3 apresentaram diversas diferenças em relação aos outros tratamentos, entre elas o maior comprimento caulinar (5 cm) e a presença de folhas, enquanto que a concentração de 40 μM , apresentou a menor sobrevivência e o menor comprimento caulinar das plantas (1,5 cm). (Tab. 4 / Anexo II)

Tabela 4. Porcentagem de sobrevivência e parâmetros biométricos de *Zygopetalum maxillare* após 90 dias de cultivo, com adição de AgNO₃. Letras maiúsculas indicam a diferença significativa dos tratamentos de AgNO₃ entre os dias; letras minúsculas indicam a diferença significativa dos tratamentos de AgNO₃ dentro de cada tempo, segundo o teste Tukey (P<0,05).

AgNO ₃ (μM)	Tratamentos luminosos								
	Claro					Escuro			
	Caule (cm)	Raiz (cm)	Folhas (uni.)	Raízes (uni.)	Sobrevivência (%)	Caule (cm)	Folhas (uni.)	Nós (uni.)	Sobrevivência (%)
0	4,2 aA	2,3 a	6 aA	4 a	33,3	3,0 cB	-	3 a	33,3
5	3,0 bA	0,5 b	6 aA	1 b	33,3	3,2 bcA	2 aB	2 ab	25,0
10	1,7 cB	-	3 bA	-	25,0	5,0 aA	3 aA	1 b	33,3
20	1,6 cB	-	3 bA	-	25,0	3,5 bA	2 aB	1 b	16,7
40	0,3 dB	-	-	-	25,0	1,5 dA	-	2 ab	8,3

- **Cloreto de cobalto**

A adição de CoCl₂, diminuiu consideravelmente a porcentagem de plantas viáveis e apresentou a menor sobrevivência nos tratamentos que continham 10 e 40 μM (ambos 8%). O tamanho das plantas também foi inibido, todos os tratamentos deram origem a plantas menores que o controle (4,2 cm), diminuindo o tamanho caular conforme aumento da dosagem de CoCl₂, até 1,5 cm na concentração de 40 μM (Tab. 5). Além de plantas menores a concentração de 40 μM de CoCl₂ mostrou falta de pigmentação em folhas e caules (Anexo I).

Durante o cultivo no escuro a adição de 5 μM de cloreto de cobalto aumentou a sobrevivência das plantas, atingindo 42% de plantas viáveis, enquanto a concentração de 20 μM CoCl₂ diminuiu para 8%; com destaque para a ausência de plantas viáveis quando o explante foi inoculado em 10 μM de CoCl₂ (Tab. 5).

Tabela 5. Porcentagem de sobrevivência e parâmetros biométricos de *Zygopetalum maxillare* após 90 dias de cultivo, com adição de CoCl_2 . Letras maiúsculas indicam a diferença significativa dos tratamentos de CoCl_2 entre os dias; letras minúsculas indicam a diferença significativa dos tratamentos de CoCl_2 dentro de cada tempo, segundo o teste Tukey ($P < 0,05$).

CoCl_2 (μM)	Tratamentos luminosos							
	Claro					Escuro		
	Caule (cm)	Raiz (cm)	Folhas (uni.)	Raízes (uni.)	Sobrevivência (%)	Caule (cm)	Nós (uni.)	Sobrevivência (%)
0	4,2 aA	2,3 ab	6 a	4 a	33,3	3,0 bB	3 a	33,3
5	2,5 bA	1,7 b	4 b	1 bc	25,0	3,1 abA	2 a	41,7
10	1,8 cA	2,6 ab	3 b	2 b	8,3	-	-	0
20	1,9 bcA	3,3 a	3 b	1 b	25,0	2,5 bA	2 a	8,3
40	1,5 cB	-	4 b	-	8,3	4,0 aA	3 a	33,3

• CEPA

Durante o cultivo no claro, o tratamento com 5 μM de CEPA aumentou drasticamente a sobrevivência das plantas, atingindo 67% de plantas viáveis, a maior porcentagem de sobrevivência entre todos os reguladores de etileno. Apesar de tal resultado, a morfologia das plantas foi afetada em todas as concentrações, originando plantas menores e com desenvolvimento retardado em relação às plantas controle. (Tab. 6 / Anexo I)

As plantas cultivadas no escuro com adição de CEPA apresentaram maior sobrevivência em todas as concentrações quando comparadas ao controle. O tratamento de CEPA 10 μM apresentou a maior sobrevivência das plantas entre todas as concentrações, com 92% dos explantes formando plantas (Fig. 7). As plantas cultivadas nesta concentração apresentaram maior comprimento caular (3,7 cm) do que as plantas controle (sem CEPA) (3 cm). No entanto, as plantas maiores foram obtidas no meio com 5 μM de CEPA, atingindo cerca de 5 cm, enquanto a concentração de 40 μM de CEPA apresentou baixo desenvolvimento (1,1 cm). (Tab. 6 / Anexo II)

Tabela 6. Porcentagem de sobrevivência e parâmetros biométricos de *Zygopetalum maxillare* após 90 dias de cultivo, com adição de CEPA. Letras maiúsculas indicam a diferença significativa dos tratamentos de CEPA entre os dias; letras minúsculas indicam a diferença significativa dos tratamentos de CEPA dentro de cada tempo, segundo o teste Tukey ($P < 0,05$).

CEPA (μ M)	Tratamentos luminosos							
	Claro					Escuro		
	Caule (cm)	Raiz (cm)	Folhas (uni.)	Raízes (uni.)	Sobrevivência (%)	Caule (cm)	Nós (uni.)	Sobrevivência (%)
0	4,2 aA	2,3 a	6 a	4 a	33,3	3,0 cB	3 ab	33,3
5	2,2 bB	0,7 b	3 b	1b	66,7	5,0 aA	4 a	58,3
10	1,4 cB	0,5 b	4 ab	1b	25,0	3,7 bA	4 a	91,7
20	2,3 bA	-	5 ab	-	33,3	2,1 dA	2 b	41,7
40	1,6 cA	-	4 ab	-	25,0	1,1 eB	2 b	58,3

3.2. *Epidendrum denticulatum*

3.2.1. Quantificação de etileno

A quantificação de etileno em *E. denticulatum* mostrou variação na concentração do fitormônio, tanto no cultivo realizado no claro quanto no escuro, com forte redução a partir dos 45 dias. Em ambos os tratamentos luminosos, com a adição de nitrato de prata, houve queda na concentração do etileno após o primeiro dia de cultivo, mantendo-se um aumento progressivo entre o 5º e o 30º dia, após este período, aos 45 e 60 dias, foi verificada uma diminuição da concentração de etileno (Tab. 7).

Tabela 7. Concentração de etileno em *Epidendrum denticulatum* durante 60 dias de cultivo, com adição de AgNO₃. Letras maiúsculas indicam a diferença significativa dos tratamentos de AgNO₃ entre os dias. Letras minúsculas indicam a diferença significativa dos tratamentos de AgNO₃ dentro de cada tempo, segundo o teste Tukey (P<0,05) (n= 3).

Tratamentos Luminosos		Concentração de etileno (pL.mL ⁻¹)											
		Claro						Escuro					
AgNO ₃ (μM)		0	5	10	20	40	Média*	0	5	10	20	40	Média*
Cultivo em dias	1	2,10 abA	2,41 aA	2,32 aA	1,75 bA	2,41 aA	2,20 A	2,61 aA	2,38 abA	2,54 abA	1,83 cA	2,07 bcA	2,29 A
	5	1,07 bcDC	1,64 aB	1,32 abcB	0,88 cBC	1,49 abC	1,28 BC	1,66 abB	1,57 abBC	1,78 aB	0,95 cAB	1,33 bABC	1,46 BC
	10	1,35 bBC	1,68 aB	1,42 abB	0,86 cBC	1,47 abC	1,36 BC	1,40 aBC	1,40 aBC	1,61 aBC	0,71 bB	1,29 abABC	1,28 BCD
	15	1,42 bBC	1,78 aB	1,51 abB	0,95 cBC	1,57 abC	1,45 B	1,65 abB	1,59 abBC	1,74 aB	1,10 bAB	1,48 abABC	1,51 B
	20	1,51 bBC	1,89 aB	1,85 aAB	1,39 bAB	1,92 aB	1,71 AB	1,81 aB	1,80 aAB	1,97 aB	1,29 bAB	1,64 abABC	1,70 B
	30	1,80 aAB	1,84 aB	1,52 aB	1,47 aAB	1,74 aBC	1,67 AB	1,53 aB	1,72 aBC	1,86 aB	1,59 aAB	1,80 aAB	1,70 B
	45	0,56 bcDE	1,09 aC	1,10 aC	0,51 cC	0,98 abD	0,85 CD	0,66 aCD	1,09 aCD	1,14 aC	0,71 aB	1,03 aBC	0,93 CD
	60	0,30 bE	0,96 aC	0,91 abC	0,35 abC	0,86 abD	0,68 D	0,37 aD	0,91 aD	1,12 aC	0,87 aB	0,96 aC	0,85 D

*Média de todos os tratamentos dentro de cada tempo

O tratamento de 20 μM de AgNO_3 , causou redução da liberação de etileno no período de 10 a 15 dias no claro e no período de 1 a 20 dias no escuro, além de apresentar, em ambos, a menor concentração de etileno comparada aos demais tratamentos, em todos os períodos. (Tab. 7)

O tratamento de 5 μM de AgNO_3 promoveu a maior produção de etileno pelas plantas durante o cultivo no claro; no escuro o maior teor de etileno liberado pelas plantas foi promovido pelo tratamento de 10 μM de AgNO_3 (Tab. 7).

No experimento contendo cloreto de cobalto a concentração de etileno liberado pelas plantas foi semelhantemente ao ocorrido com AgNO_3 , diminuiu entre 5 e 60 dias de cultivo em ambos tratamentos luminosos, apresentando redução maior aos 45 e 60 dias, independentemente da concentração de CoCl_2 adicionada (Tab. 8).

O acréscimo de cloreto de cobalto aos meios também não demonstrou influência na inibição da produção de etileno. Na presença de luz todas as plantas submetidas às diferentes concentrações de CoCl_2 apresentaram maior liberação de etileno do que as plantas do tratamento controle. No escuro, somente no primeiro dia houve redução da liberação de etileno quando foi adicionado CoCl_2 , no entanto sem apresentar diferença significativa. (Tab. 8)

Tabela 8. Concentração de etileno em *Epidendrum denticulatum* durante 60 dias de cultivo, com adição de CoCl_2 . Letras maiúsculas indicam a diferença significativa dos tratamentos de CoCl_2 entre os dias; letras minúsculas indicam a diferença significativa dos tratamentos de CoCl_2 dentro de cada tempo, segundo o teste Tukey ($P < 0,05$) ($n = 3$).

Tratamentos Luminosos		Concentração de etileno ($\mu\text{L.mL}^{-1}$)											
		Claro						Escuro					
CoCl_2 (μM)		0	5	10	20	40	Média*	0	5	10	20	40	Média*
Cultivo em dias	1	2,10 aA	2,34 aA	2,49 aA	2,52 aA	2,65 aA	2,42 A	2,61 aA	2,30 aA	2,44 aA	2,42 aA	2,36 aA	2,43 A
	5	1,07 bDC	1,55 abBC	1,65 aB	1,58 abBC	1,77 aBCD	1,53 B	1,66 aB	1,54 aBCD	1,80 aB	1,67 aBC	1,51 aBCD	1,64 BC
	10	1,35 aBC	1,38 aBCD	1,44 aBCD	1,43 aC	1,71 aBCD	1,46 B	1,40 aBC	1,36 aCDE	1,61 aB	1,49 aCD	1,46 aCDE	1,46 C
	15	1,42 aBC	1,53 aBC	1,81 aAB	1,66 aBC	1,79 aBCD	1,64 B	1,65 aB	1,77 aBC	1,73 aB	1,63 aBC	1,62 aBCD	1,68 BC
	20	1,51 bBC	1,89 abAB	1,74 abB	1,89 abB	2,18 aB	1,84 B	1,81 aB	1,96 aAB	1,88 aB	2,01 aAB	1,94 aAB	1,92 B
	30	1,80 aAB	1,61 aB	1,51 aBC	1,77 aBC	2,06 aABC	1,75 B	1,53 aB	1,81 aBC	1,86 aB	1,80 aBC	1,74 aBC	1,75 BC
	45	0,56 bDE	0,94 abCD	0,90 bCD	0,94 abD	1,34 aCD	0,94 C	0,66 bCD	1,09 abDE	1,24 aC	1,07 abDE	1,21 aDE	1,05 D
	60	0,30 bE	0,81 abD	0,76 abD	0,80 abD	1,10 aD	0,75 C	0,37 bD	0,99 abE	1,14 aC	0,99 abE	1,02 abE	0,90 D

*Média de todos os tratamentos dentro de cada tempo

Quanto maior a concentração de CEPA adicionada ao meio, mais etileno foi emitido pelas plantas (Fig. 11). Tanto no claro quanto no escuro a concentração de 5 μ M apresentou o menor teor de etileno liberado pelas plantas. Durante os períodos de 5, 45 e 60 dias, no claro, as plantas do tratamento controle apresentaram menor concentração de etileno do que as plantas do tratamento com 5 μ M de CEPA (Tab. 9).

No escuro, durante os dias 10, 45 e 60, as plantas de todos os tratamentos apresentaram maior teor de etileno quando comparados ao controle. Além disso, tanto as plantas do tratamento controle quanto às submetidas a concentração de 5 μ M apresentaram uma drástica redução de etileno ao final do experimento em ambas as luminosidades (45 e 60 dias). (Tab. 9)

Tabela 9. Concentração de etileno em *Epidendrum denticulatum* durante 60 dias de cultivo, com adição de CEPA. Letras maiúsculas indicam a diferença significativa dos tratamentos de CEPA entre os dias; letras minúsculas indicam a diferença significativa dos tratamentos de CEPA dentro de cada tempo, segundo o teste Tukey ($P < 0,05$) ($n = 3$).

Tratamentos Luminosos		Concentração de etileno (pL.mL ⁻¹)											
		Claro						Escuro					
CEPA		0	5	10	20	40	Média*	0	5	10	20	40	Média*
(μM)													
Cultivo em dias	1	2,10 bcA	1,68 dA	1,94 cdA	2,34 abA	2,63 aA	2,14 A	2,61 aA	1,68 bA	1,94 bA	2,33 aA	2,67 aA	2,25 A
	5	1,07 dDC	1,47 cA	1,85 bcA	2,13 abA	2,42 aA	1,79 A	1,66 cdB	1,48 dA	1,73 cAB	2,11 bA	2,47 aA	1,89 AB
	10	1,35 bcBC	1,04 cAB	1,81 abcA	2,12 abA	2,44 aA	1,75 A	1,40 cBC	1,41 cA	1,69 cAB	2,08 bA	2,42 aA	1,80 AB
	15	1,42 bcBC	1,33 cAB	1,77 abcA	2,12 abA	2,18 aA	1,76 A	1,65 bcB	1,34 cA	1,67 bcAB	2,07 abA	2,39 aA	1,82 AB
	20	1,51 aBC	1,28 aAB	1,71 aA	2,20 aA	2,11 aA	1,76 A	1,81 abcB	1,24 cA	1,69 bcAB	2,01 abA	2,37 aA	1,82 AB
	30	1,80 aAB	0,95 aAB	1,52 aA	2,09 aA	1,97 aA	1,67 A	1,53 abB	0,92 bA	1,55 abAB	1,85 abA	2,18 aA	1,61 AB
	45	0,56 aDE	0,59 aAB	1,31 aA	2,10 aA	1,87 aA	1,29 A	0,66 aCD	0,70 aA	1,35 aAB	1,63 aA	1,89 aA	1,24 B
	60	0,30 bE	0,30 bB	1,23 abA	1,80 abA	2,29 aA	1,18 A	0,37 aD	0,59 aA	1,14 aB	1,49 aA	1,63 aA	1,05 B

*Média de todos os tratamentos dentro de cada tempo

3.2.2. Biometria e porcentagem de sobrevivência das plantas

- **Nitrato de prata**

Os explantes de *E. denticulatum*, com a adição de AgNO_3 , apresentaram porcentagem de sobrevivência semelhante ou menor do que o tratamento controle; exceto o tratamento de 40 μM no qual se verificou a maior porcentagem, apresentando 50% de formação de plântulas. No entanto, as plantas crescidas nessa concentração de 40 μM de AgNO_3 , eram menores, com cerca de 1,3 cm de comprimento; enquanto na concentração de 5 μM as plantas apresentaram ca 2,8 cm de comprimento. A adição de 10 μM de nitrato de prata estimulou o aparecimento de novas brotações. (Tab. 10 / Anexo III)

No escuro houve menor porcentagem de plantas desenvolvidas em todas as concentrações de AgNO_3 , diminuindo a sobrevivência das plantas conforme o aumento da concentração de nitrato de prata. A adição do regulador também influenciou morfológicamente o desenvolvimento das plantas, todos os tratamentos com adição de AgNO_3 apresentaram plantas menores quando comparadas ao controle (2,2 cm). As menores plantas se desenvolveram na concentração de 40 μM , apresentando somente o início da diferenciação e atingindo 0,6 cm de comprimento. (Tab. 10 / Anexo IV)

Tabela 10. Porcentagem de sobrevivência e parâmetros biométricos de *Epidendrum denticulatum* após 90 dias de cultivo, com adição de AgNO_3 . Letras maiúsculas indicam a diferença significativa dos tratamentos de AgNO_3 entre os dias; letras minúsculas indicam a diferença significativa dos tratamentos de AgNO_3 dentro de cada tempo, segundo o teste Tukey ($P < 0,05$).

AgNO_3 (μM)	Tratamentos luminosos							
	Claro					Escuro		
	Caule (cm)	Raiz (cm)	Folhas (uni.)	Raízes (uni.)	Sobrevivência (%)	Caule (cm)	Nós (uni.)	Sobrevivência (%)
0	1,5 bB	0,6 a	4 a	2 a	33	2,2 aA	2 ab	50
5	2,8 aA	0,6 a	3 a	1 a	33	1,9 aB	3 a	50
10	1,5 bA	0,6 a	5 a	1 a	25	1,7 aA	3 a	42
20	1,6 bA	0,8 a	4 a	1 a	25	0,6 bB	2 ab	42
40	1,3 bA	0,8 a	5 a	2 a	50	0,6 bB	1 b	33

- **Cloreto de cobalto**

Os explantes cultivados no claro com adição de cloreto de cobalto apresentaram menor ou igual porcentagem de sobreviventes em relação ao controle (33%). A concentração de 10 μM apresentou menor número de plantas viáveis (17%); apesar da baixa porcentagem de plantas, estas apresentaram comprimento caulinar semelhante ao controle (1,4 cm). O cultivo com adição de 5 μM de CoCl_2 apresentou o maior comprimento das plantas (2,1 cm) e até 3 raízes em cada planta, além de muitas brotações. (Tab. 11 / Anexo III)

A sobrevivência das plantas cultivadas no escuro foi inibida pela adição de CoCl_2 , em todas as concentrações. Os meios com 20 e 40 μM de CoCl_2 resultaram na sobrevivência de 8% das plantas, enquanto na concentração de 5 μM não ocorreu a formação de plantas. O menor desenvolvimento foi verificado no tratamento com 40 μM de CoCl_2 , apresentando caules de 0,5 cm de comprimento. (Tab. 11 / Anexo IV)

Tabela 11. Porcentagem de sobrevivência e parâmetros biométricos de *Epidendrum denticulatum* após 90 dias de cultivo, com adição de CoCl_2 . Letras maiúsculas indicam a diferença significativa dos tratamentos de CoCl_2 entre os dias; letras minúsculas indicam a diferença significativa dos tratamentos de CoCl_2 dentro de cada tempo, segundo o teste Tukey ($P < 0,05$).

CoCl_2 (μM)	Tratamentos luminosos							
	Claro					Escuro		
	Caule (cm)	Raiz (cm)	Folhas (uni.)	Raízes (uni.)	Sobrevivência (%)	Caule (cm)	Nós (uni.)	Sobrevivência (%)
0	1,5 abB	0,6 a	4 a	2 a	33	2,2 aA	2 a	50
5	2,1 a	1,0 a	8 a	3 a	25	-	-	0
10	1,1 bA	0,7 a	3 a	1 a	17	1,5 abA	2 a	33
20	1,3 abA	0,5 a	4 a	1 a	33	1,3 bA	1 a	8
40	1,1 bA	0,3 a	4 a	1 a	33	0,5 cA	1 a	8

- **CEPA**

A maior porcentagem de sobrevivência das plantas durante o cultivo no claro foi obtida na concentração de 5 μM de CEPA (75%). Quanto ao desenvolvimento no claro, o maior comprimento caulinar foi observado na concentração de 20 μM (2,9 cm), concentração esta que também apresentou a menor sobrevivência das plantas entre os tratamentos (17%). As plantas submetidas a 40 μM de CEPA apresentaram o menor tamanho caulinar (1 cm), no entanto, o maior desenvolvimento radicular (1,5 cm) entre todos os reguladores e suas concentrações. (Tab. 12 / Anexo III)

Diferentemente do verificado no claro, no escuro as concentrações 5 e 40 μM de CEPA apresentaram as menores porcentagens de formação de plantas (ambas 8%); além disso, todas as concentrações de CEPA inibiram o desenvolvimento do explante diminuindo a formação de plantas, quando comparadas ao controle. No entanto o crescimento das plantas foi influenciado pela adição de CEPA, sendo promotor nas concentrações de 10 e 40 μM ,

apresentando comprimento caulinar de 3 cm e 2,7 cm, respectivamente, e inibitório nas concentrações de 5 e 20 μM apresentando os menores caules (respectivamente 1,3 e 1,4 cm), comparando-se aos 2,2 cm de comprimento caulinar do controle. (Tab.12 / Anexo IV)

Tabela 12. Porcentagem de sobrevivência e parâmetros biométricos de *Epidendrum denticulatum* após 90 dias de cultivo, com adição de CEPA. Letras maiúsculas indicam a diferença significativa dos tratamentos de CEPA entre os dias; letras minúsculas indicam a diferença significativa dos tratamentos de CEPA dentro de cada tempo, segundo o teste Tukey ($P < 0,05$).

CEPA (μM)	Tratamentos luminosos							
	Claro					Escuro		
	Caule (cm)	Raiz (cm)	Folhas (uni.)	Raízes (uni.)	Sobrevivência (%)	Caule (cm)	Nós (uni.)	Sobrevivência (%)
0	1,5 cB	0,6 b	4 a	2 a	33	2,2 abA	2 a	50
5	1,1 cA	0,5 b	5 a	2 a	75	1,3 cA	1 b	8
10	2,4 bB	1,0 ab	5 a	4 a	33	3,0 aA	2 a	17
20	2,9 aA	0,8 ab	7 a	4 a	17	1,4 bcB	-	33
40	1,0 cB	1,5 a	5 a	3 a	42	2,7 aA	1 b	8

4. Discussão

A adição de nitrato de prata não inibiu a produção de etileno em *Zygopetalum maxillare* no claro, e não reduziu a produção em nenhum experimento em *Epidendrum denticulatum*. A falta de inibição da produção de etileno na presença de AgNO_3 pode ser explicado devido aos íons de prata bloquearem a ligação do etileno ao sítio ativo que realiza a resposta fisiológica, inibindo sua ação, mas não impedirem a biossíntese do etileno (Kumar *et al.*, 2009; Navarro-García *et al.*, 2016).

Em ambas as espécies estudadas a adição de 40 μM de nitrato de prata reduziu drasticamente o tamanho das plantas, com relação ao controle; no entanto foi a concentração que mais apresentou teor de etileno. As diversas interferências do etileno no crescimento das plantas são mediadas pela interação etileno e outros fitormônios; entre eles as giberelinas demonstram grande influência no alongamento caulinar, induzindo a expressão de enzimas (expansinas e endo-hidrolases) que promovem o relaxamento da parede celular, permitindo a expansão celular impulsionada pressão de turgescência (Claeys *et al.*, 2014; Litvin *et al.*, 2016). A transdução de sinal das giberelinas está interligada com a atividade de proteínas DELLA, as quais reprimem a atividade transcricional dos genes de resposta a giberelinas; o etileno induz a estabilidade de proteínas DELLA (Achard, 2003; Colebrook *et al.*, 2014), por este motivo o alto teor de etileno torna as plantas insensíveis à ação de alongamento das giberelinas.

Estudo realizado em pimenteiras habanero (*Capsicum chinense*), também demonstrou que a adição de nitrato de prata não inibiu a produção de etileno; no entanto o AgNO_3 promoveu o desenvolvimento de plântulas maiores e com mais raízes, ao contrário do ocorrido em *Z. maxillare* e *E. denticulatum*; a adição do nitrato de prata em *Capsicum chinense* tornou-se prejudicial somente na concentração de 500 μM , apresentando plantas com intensa clorose e menor vigor (Santana-Buzzy *et al.*, 2006).

Apesar da concentração de 40 μM de nitrato de prata diminuir o desenvolvimento das duas orquídeas estudadas, estimulou o desenvolvimento do explante em *E. denticulatum*, apresentando a maior porcentagem de formação de plantas no claro, o que corrobora com o resultado apresentado para *Vanilla planifolia* por Giridhar *et al.* (2001), cujo trabalho mostrou maior formação de plantas quanto maior a concentração de AgNO_3 , chegando ao melhor resultado em 40 μM .

O possível motivo da inibição do crescimento caulinar e alta porcentagem de sobrevivência das plantas submetidas a AgNO_3 , pode estar relacionado com a interação entre

a síntese de etileno e fluxo de auxina e citocinina. Paladi *et al.* (2017) sugerem que, além do bloqueio dos íons de prata na ação do etileno, o AgNO_3 poderia mediar a expressão do gene CYP83B1 que inibe os níveis de auxina endógena, diminuindo o alongamento celular, além de ampliar a expressão do gene CRE1 que é um receptor de citocinina; o aumento da ação da citocinina justificaria a indução de brotação lateral. Além disso, altos níveis de citocinina ampliam a expressão da região WUSCHEL (WUS), responsável por promover a formação e manutenção da região meristemática durante a regeneração de explantes (Zhang *et al.*, 2017; Bhattacharyya *et al.*, 2018; Sang *et al.*, 2018).

O aumento na mortalidade dos explantes de *Z. maxillare*, quando adicionado nitrato de prata, é semelhante ao apresentado em *Chrysanthemum morifolium* cv. Shinma, por Naing *et al.* (2016), que observaram declínio na sobrevivência das plantas independentemente da concentração de nitrato de prata, aumentando a mortalidade conforme aumento da concentração; tais resultados também foram semelhantes quando utilizados tiosulfato de prata e AVG.

Diferentemente do ocorrido em *E. denticulatum*, as plantas de *Z. maxillare* cultivadas do escuro com a adição de nitrato de prata, desenvolveram folhas (Anexo II). O maior desenvolvimento foliar foi apresentado na concentração de 10 μM , concentração esta que acarretou o menor teor de etileno. Este resultado também foi observado em monocotiledôneas de crescimento lento do gênero *Poa*, ocorrendo promoção no alongamento foliar em baixa concentração de etileno (Fiorani *et al.*, 2002; Iqbal *et al.*, 2017). Estudos realizados em *Arabidopsis* descrevem um aumento foliar das plantas insensíveis ao etileno, sugerindo que o etileno tem um efeito inibidor na divisão celular e, consequentemente, sobre a expansão foliar (Tholen, 2004; Skirycz *et al.*, 2011).

Em geral, o experimento com cloreto de cobalto diminuiu a diferenciação dos explantes no desenvolvimento das plantas tanto em *Z. maxillare* quanto em *E. denticulatum*,

apresentando menor porcentagem de sobrevivência que o controle. Semelhantemente ao demonstrado em *Echinacea angustifolia*, em que nenhuma concentração de CoCl_2 influenciou positivamente a formação de plantas (Chae *et al.*, 2012). Em explantes de limoeiro, Navarro-García *et al.* (2016) demonstraram maior toxicidade com relação ao cloreto de cobalto, quando o aumento da concentração de CoCl_2 foi correlacionado à inibição da regeneração, e em sua maior concentração induziu a necrose dos explantes.

Além disso, a falta de coloração das plantas cultivadas na maior concentração de CoCl_2 em *Z. maxillare* também foi verificada em variedades de plantas de cerejeira, sendo que, quanto maior a concentração de cloreto de cobalto menor a concentração de clorofila (Sarropoulou *et al.*, 2016). Tal clorose deve ser causada pelo excesso de cobalto, levando a uma baixa absorção de ferro que compõem os cloroplastos e conseqüentemente a clorofila (Imtiyaz *et al.*, 2014; Javed & Anis, 2014).

Outro ponto observado é que a concentração de 40 μM de CoCl_2 em *Z. maxillare*, no claro, foi o tratamento que apresentou maior teor de etileno; este é um fator importante da descoloração das plantas, pois a degradação de clorofila é regulada pelo etileno (Cheng *et al.*, 2012; Cheng & Guan, 2014; Yin *et al.*, 2016), uma vez que o fitormônio aumenta a atividade da enzima clorofilase responsável pelo processo de catabolismo da clorofila (Amir-Shapira *et al.*, 1987; Trebitsh *et al.*, 1993; Jacob-Wilk *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2011). Estudo realizado com *Citrus sinensis* e *Nicotiana tabacum* demonstram que regiões responsivas ao etileno (ERF) aumentaram sua atividade concomitantemente à ativação de genes responsáveis pela degradação de clorofila (Yin *et al.*, 2016).

Durante o cultivo no escuro, os explantes de *Z. maxillare* mantidos em 10 μM de CoCl_2 apresentaram necrose e nenhum explante se desenvolveu em plântula; tal resultado também pode ter sido decorrente do excesso de etileno verificado nesta concentração de CoCl_2 , que não houve a inibição na produção deste fitormônio.

A menor adição de CEPA (5 μ M) mostrou resultado inesperado com redução na produção do etileno tanto nos tratamentos de *Z. maxillare* quanto em *E. denticulatum*, comparativamente ao controle. Diferentemente do demonstrado no cultivo de *Helianthus annuus* e *Citrus limon*, nos quais a adição de CEPA aumentou invariavelmente a concentração de etileno; no entanto, influenciou negativamente a sobrevivência do explante, apresentando menor desenvolvimento de plantas com o aumento do fitormônio (Chraibi *et al.*, 1991; Saiprasad & Raghuveer, 2007).

O uso de 5 μ M de CEPA induziu maior formação de plantas e de maior comprimento, nos tratamentos no claro, em *Z. maxillare* e *E. denticulatum*, confirmando que menores teores de etileno promovem a diferenciação celular, dado também observado por Teixeira da Silva (2013) em cultivar de *Cymbidium*, no qual a formação de plântulas foi inibida pelo aumento da concentração de CEPA.

Durante o experimento realizado no escuro, a adição de CEPA produziu resultados diferentes para as duas espécies. Em *Z. maxillare* a formação de plantas aumentou e em *E. denticulatum* diminuiu, indicando que *E. denticulatum* provavelmente é mais sensível ao estresse oxidativo proporcionado pelo etileno (Mattoo & Suttle, 1991; Pimenta *et al.*, 2013), que induz uma senescência precoce. Semelhantemente ao ocorrido em *Phalaenopsis amabilis* (Orchidaceae), no qual o aumento do etileno foi induzido pela adição de ACC (1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid) verificando-se maior oxidação dos explantes (Gow *et al.*, 2008).

As plantas de *E. denticulatum* com adição de CEPA, cultivadas no escuro, apresentaram estiolamento do caule maior que o controle. Estudos realizados em *Arabidopsis* mostraram que o escuro induz adaptações mediadas pela interação auxina-etileno; no processo, genes (ACS6, ACS8 e ACS9) envolvidos na biossíntese do etileno são regulados positivamente pela auxina, em resposta a uma redução na intensidade luminosa (Tian *et al.*, 2002;

Vandenbussche *et al.*, 2003b). E o oposto também ocorre, com a redistribuição de auxinas sendo estimulada pelo etileno durante o desenvolvimento do gancho apical em plântulas de *Arabidopsis* estioladas (Vandenbussche *et al.*, 2003a), o que possivelmente pode ter ocorrido em *E. denticulatum*.

5. Conclusão

A adição de cloreto de cobalto e do nitrato de prata inibiram a produção de etileno somente no escuro em *Zygopetalum maxillare*. As menores concentrações de etileno liberado apresentaram caules maiores no escuro, tanto em *Z. maxillare* quanto em *E. denticulatum*. O experimento com CEPA demonstrou grande influência na formação de plantas no escuro, apresentando a maior porcentagem de sobrevivência em *Zygopetalum maxillare* e inibindo drasticamente o desenvolvimento de plantas em *Epidendrum denticulatum*. Tais resultados colaboram para a compreensão de respostas fisiológicas sob ação do etileno em espécies de Orchidaceae que representam gêneros e hábitos distintos, o que propicia um avanço na propagação de espécies nativas brasileiras.

6. Referências

- Achard, P. 2003. Ethylene regulates Arabidopsis development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *The Plant Cell* 15, 2816–2825 <https://doi.org/10.1105/tpc.015685>.
- Amir-Shapira, D., Goldschmidt, E. E. & Altman, A. 1987. Chlorophyll catabolism in senescing plant tissues: In vivo breakdown intermediates suggest different degradative pathways for *Citrus* fruit and parsley leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 1901–5 <https://doi.org/10.1073/pnas.84.7.1901>.
- Anis, M. & Ahmad, N. 2016. *Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement*. Springer, Singapore.
- Baldwin, I. T. 2010. Plant volatiles. *Current biology: CB* 20, 392–397 <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.02.052>.
- Bhattacharyya, P., Paul, P., Kumaria, S. & Tandon, P. 2018. Transverse thin cell layer (t-TCL)-mediated improvised micropropagation protocol for endangered medicinal orchid *Dendrobium aphyllum* Roxb: an integrated phytomolecular approach. *Acta Physiologiae Plantarum* 40, 0 <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2703-y>.
- Biddington, N. L. 1992. The Influence of Ethylene in Plant-Tissue Culture. *Plant Growth Regulation* 11, 173–187 <https://doi.org/10.1007/BF00024072>.
- Chae, S. C., Kim, H. H. & Park, S. U. 2012. Ethylene inhibitors enhance shoot organogenesis of gloxinia (*Sinningia speciosa*). *TheScientificWorldJournal* 2012, 1–4 <https://doi.org/10.1100/2012/859381>.

- Chae, S. & Park, S. 2012. Improved shoot organogenesis of *Echinacea angustifolia* DC treated with ethylene inhibitors. *Life Science Journal* 9, 1725–1728.
- Chatfield, S. P. & Raizada, M. N. 2008. Ethylene and shoot regeneration: Hookless1 modulates *de novo* shoot organogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* 27, 655–666 <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0496-3>.
- Chen, T.-Y., Chen, J.-T. & Chang, W.-C. 2002. Multiple shoot formation and plant regeneration from stem nodal explants of *Paphiopedilum* orchids. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 38, 595–597 <https://doi.org/10.1079/IVP2002332>.
- Cheng, Y., Dong, Y., Yan, H., Ge, W., Shen, C., Guan, J., Liu, L. & Zhang, Y. 2012. Effects of 1-MCP on chlorophyll degradation pathway-associated genes expression and chloroplast ultrastructure during the peel yellowing of Chinese pear fruits in storage. *Food Chemistry* 135, 415–422 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.017>.
- Cheng, Y. & Guan, J. 2014. Involvement of pheophytinase in ethylene-mediated chlorophyll degradation in the Peel of Harvested “Yali” Pear. *Journal of Plant Growth Regulation* 33, 364–372 <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9383-z>.
- Chraïbi, B. K. M., Latche, A., Roustan, J.-P. & Fallot, J. 1991. Stimulation of shoot regeneration from cotyledons of *Helianthus annuus* by the ethylene inhibitors, silver and cobalt. *Plant Cell Reports* 10, 204–207.
- Claeys, H., De Bodt, S. & Inzé, D. 2014. Gibberellins and DELLAs: Central nodes in growth regulatory networks. *Trends in Plant Science* 19, 231–239 <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.10.001>.
- Colebrook, E. H., Thomas, S. G., Phillips, A. L. & Hedden, P. 2014. The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. *Journal of Experimental Biology* 217, 67–75 <https://doi.org/10.1242/jeb.089938>.

Duclercq, J., Sangwan-Norreel, B., Catterou, M. & Sangwan, R. S. 2011. *De novo* shoot organogenesis: From art to science. Trends in Plant Science 16, 597–606 <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.08.004>.

Ferreira, W. D. M., Suzuki, R. M., Pescador, R., Figueiredo-Ribeiro, R. D. C. L. & Kerbaudy, G. B. 2010. Propagation, growth, and carbohydrates of *Dendrobium* Second Love (Orchidaceae) *in vitro* as affected by sucrose, light, and dark. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 47, 420–427 <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9311-x>.

Fiorani, F., Bo, G. M., Visser, E. J. W., Lambers, H. & Voesenek, L. a C. J. 2002. Ethylene emission and responsiveness to applied ethylene vary among *Poa* species that inherently differ in leaf elongation rates. Plant Physiology 129, 1382–1390 <https://doi.org/10.1104/pp.001198>.

Giridhar, P., Reddy, B. & Ravishankar, G. 2001. Silver nitrate influences *in vitro* shoot multiplication and root formation in *Vanilla planifolia* Andr. Curr Sci India 81, 1166–1170.

Gow, W. P., Chen, J. T. & Chang, W. C. 2008. Influence of growth regulators on direct embryo formation from leaf explants of *Phalaenopsis* orchids. Acta Physiologiae Plantarum 30, 507–512 <https://doi.org/10.1007/s11738-008-0148-4>.

Guo, Y.-M., Yang, Y.-G., Guo, Y. & Guo, Z.-C. 2004. Adventitious shoot bud formation and plant regeneration from *in vitro*-cultured stem segments of reed (*Phragmites communis* Trin.). In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 40, 412–415 <https://doi.org/10.1079/IVP2004553>.

Hajong, S., Kumaria, S. & Tandon, P. 2013. Effect of plant growth regulators on regeneration potential of axenic nodal segments of *Dendrobium chrysanthum* Wall. ex Lindl. Journal of Agricultural Science. 15, 1425–1435.

Hossain, M. M. & Dey, R. 2013. Multiple regeneration pathways in *Spathoglottis plicata*

Blume - A study *in vitro*. South African Journal of Botany 85, 56–62
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2012.12.005>.

Hughes, K. W. 1981. *In vitro* ecology: Exogenous factors affecting growth and morphogenesis in plant culture systems. Environmental and Experimental Botany 21, 281–288 [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(81\)90038-1](https://doi.org/10.1016/0098-8472(81)90038-1).

Ibraflor - Instituto Brasileiro de Floricultura -. 2017. O mercado de flores no brasil.
<http://www.ibraflor.com/site/wp-content/uploads/2017/11/release-imprensa-ibraflor-10-2017.pdf>

Imtiyaz, S., Agnihotri, R. K., Ganie, S. A. & Sharma, R. 2014. Biochemical response of Glycine max (L.) Merr. to cobalt and lead stress. Journal of Stress Physiology & Biochemistry 10, 259–272.

Iqbal, N., Khan, N. A., Ferrante, A., Trivellini, A., Francini, A. & Khan, M. I. R. 2017. Ethylene role in plant growth, development and senescence: Interaction with other phytohormones. Frontiers in Plant Science 8, 1–19 <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00475>.

Jacob-Wilk, D., Holland, D., Goldschmidt, E. E., Riov, J. & Eyal, Y. 1999. Chlorophyll breakdown by chlorophyllase: Isolation and functional expression of the Chlase1 gene from ethylene-treated *Citrus* fruit and its regulation during development. Plant Journal 20, 653–661 <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00637.x>.

Javed, S. Bin & Anis, M. 2014. Cobalt induced augmentation of *in vitro* morphogenic potential in *Erythrina variegata* L.: a multipurpose tree legume. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 120, 463–474 <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0613-2>.

Jones, D. & Tisserat, B. 1990. Clonal propagation of orchids. In Pollard, J.W., Walker, J.M., eds. Methods in Molecular Biology. Plant Cell and Tissue Culture. (p. 181- 191). Humana Press.

Kumar, V., Parvatam, G. & Ravishankar, G. A. 2009. AgNO₃ - a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. *Electronic Journal of Biotechnology* 12, 1–15 <https://doi.org/10.2225/vol12-issue2-fulltext-1>.

Lei, C., Wang, H., Liu, B. & Ye, H. 2014. Effects of silver nitrate on shoot regeneration of *Artemisia annua* L. *Plant Biotechnology* 31, 71–75 <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.13.1109a>.

Litvin, A. G., Van Iersel, M. W. & Malladi, A. 2016. Drought stress reduces stem elongation and alters gibberellin-related gene expression during vegetative growth of tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 141, 591–597 <https://doi.org/10.21273/JASHS03913-16>.

Mainardi, J. A., Purgatto, E., Vieira-Jr., A., Bastos, W. A., Cordenunsi, B. R., Nascimento, J. R. O. Do & Lajolo, F. M. 2006. Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene (1-MCP) on gene expression and activity profile of α -1,4-glucan-phosphorylase during banana ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 7294–7299 <https://doi.org/10.1021/jf061180k>.

Mali, A. M. & Chavan, N. S. 2016. In vitro rapid regeneration through direct organogenesis and *ex-vitro* establishment of *Cucumis trigonus* Roxb.-An underutilized pharmaceutically important cucurbit. *Industrial Crops and Products* 83, 48–54 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.036>.

Mattoo, A. K. & Suttle, J. C. 1991. The plant hormone ethylene. Boca Raton: CRC Press.

Medina, R. D., Flachslund, E. A., Gonzalez, A. M., Terada, G., Faloci, M. M. & Mroginski, L. A. 2009. *In vitro* tuberization and plant regeneration from multinodal segment culture of *Habenaria bractescens* Lindl., an Argentinean wetland orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 97, 91–101 <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9505-2>.

- Motte, H., Vereecke, D., Geelen, D. & Werbrouck, S. 2014. The molecular path to *in vitro* shoot regeneration. *Biotechnology advances* 32, 107–21 <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.12.002>.
- Naing, A. H., Il Park, K., Chung, M. Y., Lim, K. B. & Kim, C. K. 2016. Optimization of factors affecting efficient shoot regeneration in *Chrysanthemum* cv. Shinma. *Revista Brasileira de Botanica* 39, 975–984 <https://doi.org/10.1007/s40415-015-0143-0>.
- Navarro-García, N., Martínez-Romero, D. & Pérez-Tornero, O. 2016. Assessment of the impact of ethylene and ethylene modulators in *Citrus limon* organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 127, 405–415 <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1062-x>.
- Ozden-Tokatli, Y., Ozudogru, E. A. & Akcin, A. 2005. *In vitro* response of pistachio nodal explants to silver nitrate. *Scientia Horticulturae* 106, 415–426 <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.04.001>.
- Paladi, R. K., Rai, A. N. & Penna, S. 2017. Silver nitrate modulates organogenesis in *Brassica juncea* (L.) through differential antioxidant defense and hormonal gene expression. *Scientia Horticulturae* 226, 261–267 <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.038>.
- Phillips, G. C. 2004. *In vitro* morphogenesis in plants-recent advances. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 40, 342–345 <https://doi.org/10.1079/IVP2004555>.
- Pimenta, M. R., Ribeiro, C., Soares, C. Q. G., Mendes, G. C., Braga, V. F., Reis, L. B., Otoni, W. C., Resende, C. F., Viccini, L. F. & Peixoto, P. H. P. 2013. Ethylene synthesis inhibition effects on oxidative stress and *in vitro* conservation of *Lippia filifolia* (Verbenaceae). *Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia* 73, 617–21 <https://doi.org/10.1590/S1519-69842013000300020>.
- Pražák, R. 2014. Influence of cobalt concentration on the growth and development of *Dendrobium kingianum* Bidwill orchid in an *in vitro* culture. *Journal of Elementology* 19,

495–506 <https://doi.org/10.5601/jelem.2013.18.4.366>.

Reis, J. N. P. 2011. Cultivo de orquídeas: uma opção à agricultura familiar? IX Encontro da Sociedade Brasileira de Economia Ecológica. <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/4349>

Rodrigues, M. A., Freschi, L., Purgatto, E., Lima, V. F. G. A. P. & Kerbaudy, G. B. 2014. Ethylene modulates the developmental plasticity and the growth balance between shoot and root systems in the *in vitro* grown epiphytic orchid *Catasetum fimbriatum*. *Journal of Plant Growth Regulation* 33, 513–525 <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9399-4>.

Rodrigues, A. A. de J., Santos, E. de O., Takane, R. J. & de Carvalho, A. C. P. P. 2017. Artificial light and growth regulators on the *in vitro* etiolation of *Cattleya labiata*. *Revista Ciencia Agronomica* 48, 296–302 <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20170034>.

Saha, N. & Gupta, S. D. 2018. Promotion of shoot regeneration of *Swertia chirata* by biosynthesized silver nanoparticles and their involvement in ethylene interceptions and activation of antioxidant activity. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 0, 1–12 <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1423-8>.

Saiprasad, G. V. S. & Raghuveer, P. 2007. Influence of ethylene inhibitors and ethrel on production of protocorm like bodies in orchid - *Dendrobium* “ Sonia ”. *Journal of Horticultural Science* 2, 13–18.

Sang, Y. L., Cheng, Z. J. & Zhang, X. S. 2018. Plant stem cells and *de novo* organogenesis. *New Phytologist* 218, 1334–1339 <https://doi.org/10.1111/nph.15106>.

Santana-Buzzy, N., Canto-Flick, A., Iglesias-Andreu, L. G., Montalvo-Peniche, M. D. C., López-Puc, G. & Barabona-Pérez, F. 2006. Improvement of *in vitro* culturing of *Habanero pepper* by inhibition of ethylene effects. *HortScience* 41, 405–409.

Sarropoulou, V., Dimassi-Theriou, K. & Therios, I. 2016. Effect of the ethylene inhibitors

silver nitrate, silver sulfate, and cobalt chloride on micropropagation and biochemical parameters in the cherry rootstocks CAB-6P and Gisela 6. *Turkish Journal of Biology* 40, 670–683 <https://doi.org/10.3906/biy-1505-92>.

Skirycz, A., Claeys, H., De Bodt, S., Oikawa, A., Shinoda, S., Andriankaja, M., Maleux, K., Eloy, N. B., Coppens, F., Yoo, S.-D., Saito, K. & Inzé, D. 2011. Pause-and-Stop: The Effects of osmotic stress on cell proliferation during early leaf development in *Arabidopsis* and a role for ethylene signaling in cell cycle arrest. *The Plant Cell* 23, 1876–1888 <https://doi.org/10.1105/tpc.111.084160>.

Smith, R. H. 2013. *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments*. 3^o ed Academic Press.

Suzuki, R. M., Kerbauy, G. B., Pescador, R., Purgatto, E., Ceccantini, G. C. T. & Ferreira, W. D. M. 2010. Dark-induced hormone changes coincide with the resumption of light-inhibited shoot growth in *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae). *Journal of plant physiology* 167, 375–381 <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.10.002>.

Teixeira Da Silva, J. A. 2013. The effect of ethylene inhibitors (AgNO₃, AVG), an ethylene-liberating compound (CEPA) and aeration on the formation of protocorm-like bodies of hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae). *Frontiers in Biology* 8, 606–610 <https://doi.org/10.1007/s11515-013-1283-x>.

Tholen, D. 2004. Ethylene Insensitivity Does Not Increase Leaf Area or Relative Growth Rate in *Arabidopsis*, *Nicotiana tabacum*, and *Petunia x hybrida*. *Plant Physiology* 134, 1803–1812 <https://doi.org/10.1104/pp.103.034389>.

Tian, Q., Uhler, N. J. & Reed, J. W. 2002. *Arabidopsis* SHY2/IAA3 inhibits auxin-regulated gene expression. *Plant Cell* 14, 301–319 <https://doi.org/10.1105/tpc.010283.GH3>.

Trebitsh, T., Goldschmidt, E. E. & Riov, J. 1993. Ethylene induces de novo synthesis of chlorophyllase, a chlorophyll degrading enzyme, in *Citrus* fruit peel. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences 90, 9441–9445.

Vandenbussche, F., Vriezen, W. H., Smalle, J., Laarhoven, L. J. J., Harren, F. J. M. & Straeten, D. Van Der. 2003a. Ethylene and auxin control the *Arabidopsis* response to decreased light intensity. *Plant Physiology* 133, 517–527 <https://doi.org/10.1104/pp.103.022665>.and.

Vandenbussche, F., Vriezen, W. H., Smalle, J., Laarhoven, L. J. J., Harren, F. J. M., & Van Der Straeten, D. 2003b. Ethylene and auxin control the *Arabidopsis* response to decreased light intensity. *Plant physiology* 133, 517–27 <https://doi.org/10.1104/pp.103.022665>.

Yang, S. F. 1969. Ethylene evolution from 2-chloroethylphosphonic acid. *Plant physiology* 44, 1203–4.

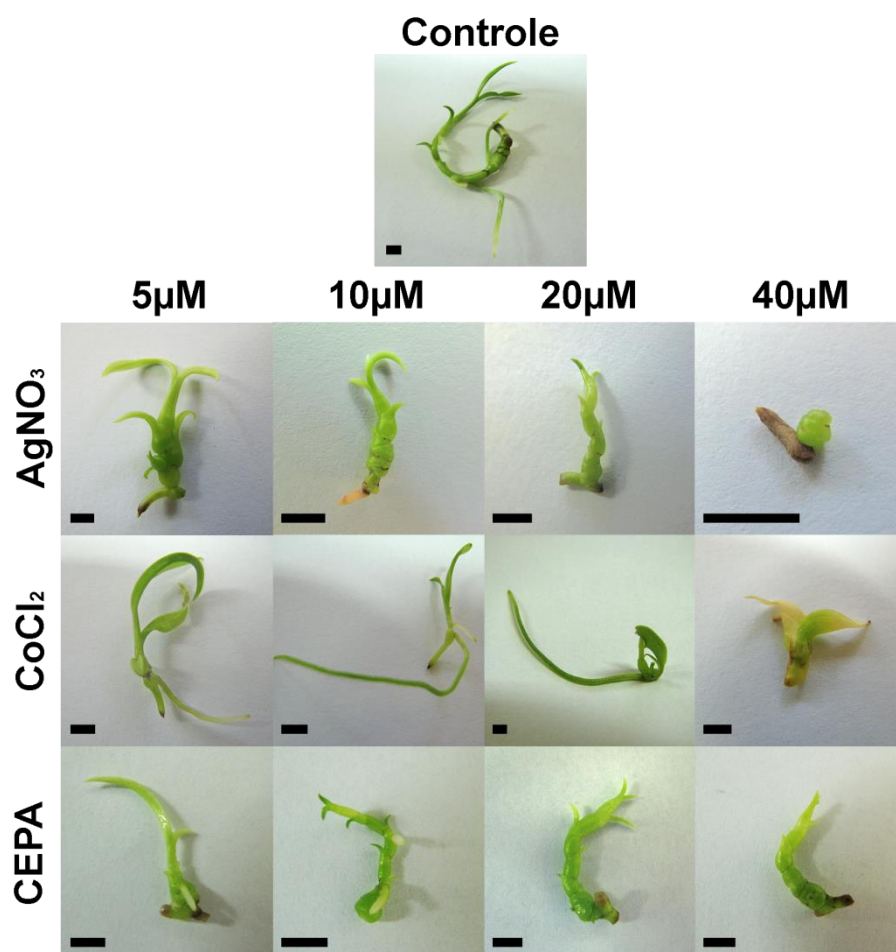
Yin, X. R., Xie, X. L., Xia, X. J., Yu, J. Q., Ferguson, I. B., Giovannoni, J. J. & Chen, K. S. 2016. Involvement of an ethylene response factor in chlorophyll degradation during citrus fruit degreening. *The Plant journal: for cell and molecular biology* 86, 403–412 <https://doi.org/10.1111/tpj.13178>.

Zeng, S., Zhang, Y., Teixeira Da Silva, J. A., Wu, K., Zhang, J. & Duan, J. 2014. Seed biology and *in vitro* seed germination of *Cypripedium*. *Crit Rev Biotechnol* 34, 1549–7801 <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.841117>.

Zhang, T.-Q., Lian, H., Zhou, C.-M., Xu, L., Jiao, Y. & Wang, J.-W. 2017. A Two-Step model for *de novo* activation of WUSCHEL during plant shoot regeneration. *The Plant Cell* <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00863>.

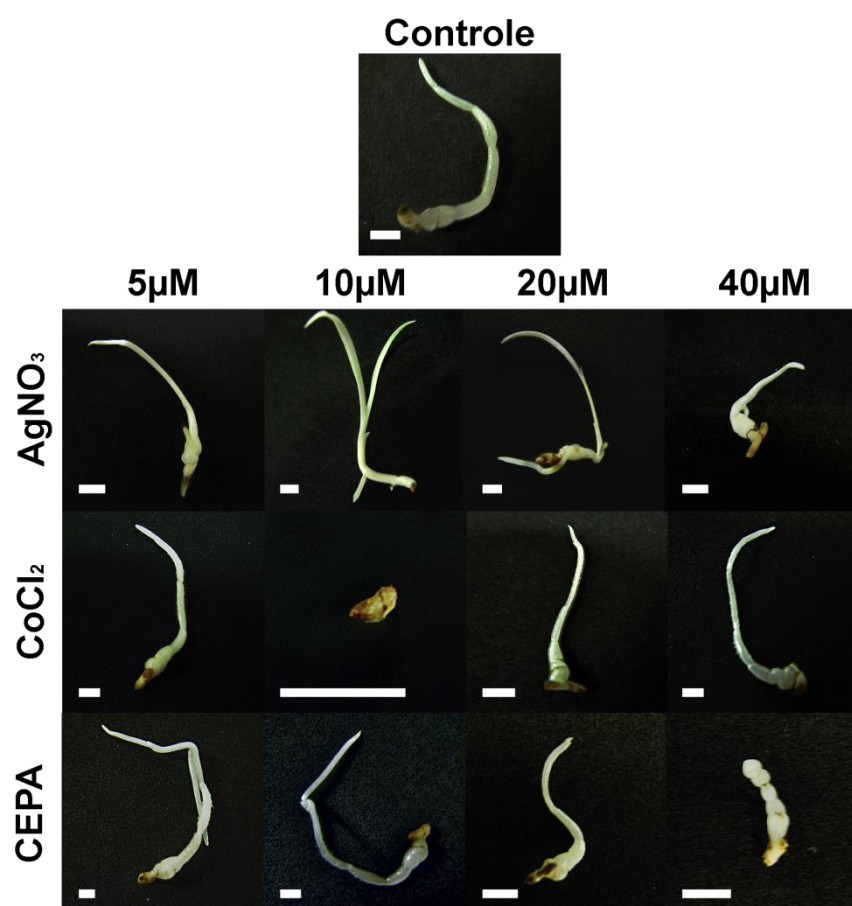
Zhang, X., Zhang, Z., Li, J., Wu, L., Guo, J., Ouyang, L., Xia, Y., Huang, X. & Pang, X. 2011. Correlation of leaf senescence and gene expression/activities of chlorophyll degradation enzymes in harvested Chinese flowering cabbage (*Brassica rapa* var. parachinensis). *Journal of Plant Physiology* 168, 2081–2087 <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.06.011>.

Anexo A



Morfologia das plantas de *Z. maxillare* submetidas a diferentes tratamentos, em cultivo sob luz. Barra de escala: 0,5 cm.

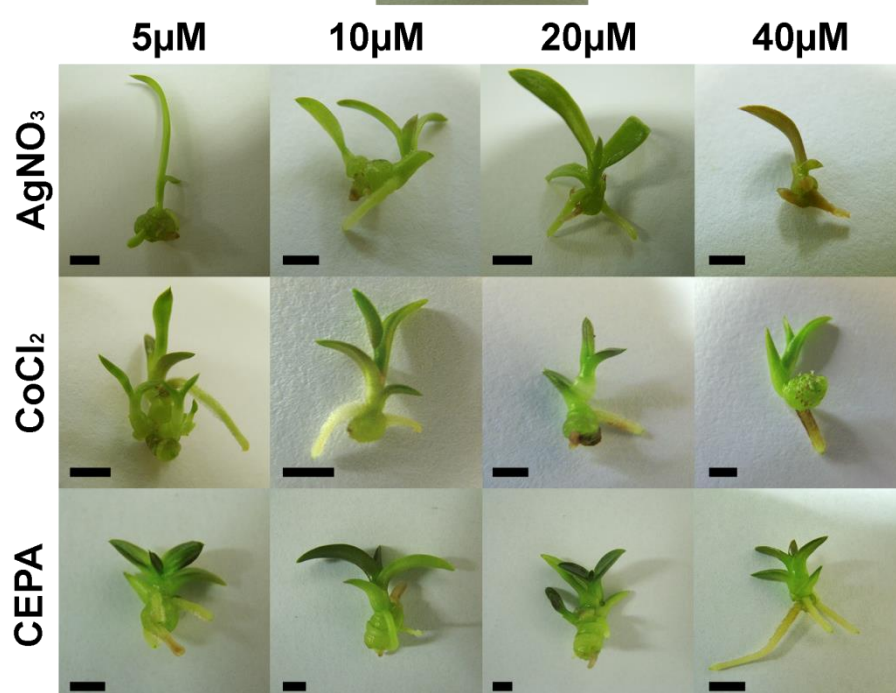
Anexo B



Morfologia das plantas de *Z. maxillare* submetidas a diferentes tratamentos, em cultivo na ausência de luz. Barra de escala: 0,5 cm.

Anexo C

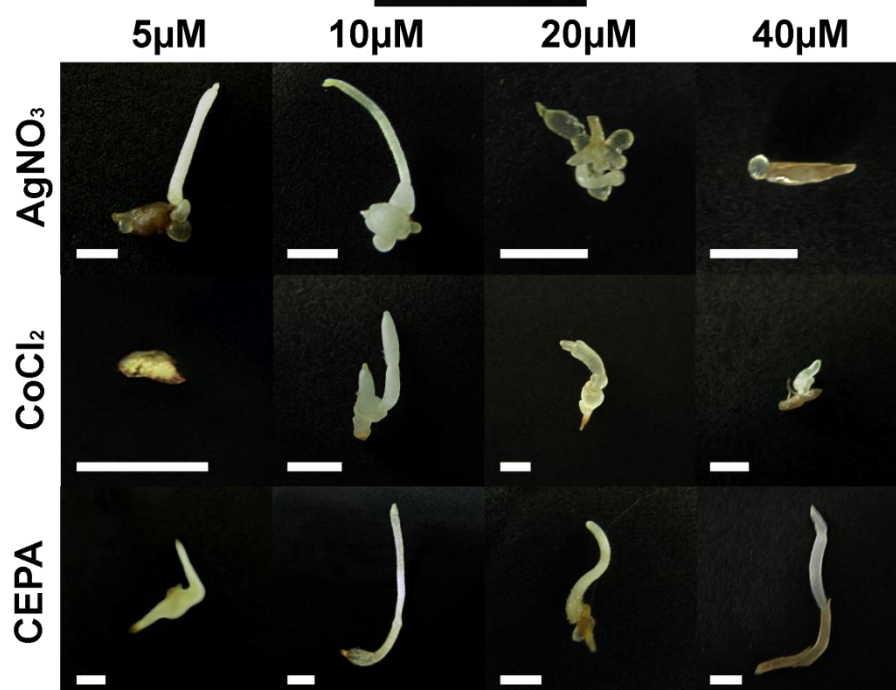
Controle



Morfologia das plantas de *E. denticulatum* submetidas a diferentes tratamentos, em cultivo sob luz. Barra de escala: 0,5 cm.

Anexo D

Controle



Morfologia das plantas de *E. denticulatum* submetidas a diferentes tratamentos, em cultivo na ausência de luz. Barra de escala: 0,5 cm.