

LINDOMAR MARIA DE SOUZA

**USO DE CITOCININAS NÃO CONVENCIONAIS (*META*-TOPOLINAS) NO
CONTROLE DE ANOMALIAS EM PLANTAS MICROPROPAGADAS: REDUÇÃO
DE PERDAS NA MICROPROPAGAÇÃO.**

RECIFE

2013

LINDOMAR MARIA DE SOUZA

**USO DE CITOCININAS NÃO CONVENCIONAIS (*META*-TOPOLINAS) NO
CONTROLE DE ANOMALIAS EM PLANTAS MICROPROPAGADAS: REDUÇÃO
DE PERDAS NA MICROPROPAGAÇÃO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Melhoramento Genético de Plantas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Agronomia, área de concentração: Melhoramento Genético de Plantas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Terezinha Rangel Camara

Coorientadora: Dra. Andrea Cristina Baltar Barros

RECIFE

2013

LINDOMAR MARIA DE SOUZA

**USO DE CITOCININAS NÃO CONVENCIONAIS (*META*-TOPOLINAS) NO
CONTROLE DE ANOMALIAS EM PLANTAS MICROPROPAGADAS: REDUÇÃO
DE PERDAS NA MICROPROPAGAÇÃO.**

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora em 28/02/2013.

Orientadora: _____

Dra. Terezinha Rangel Camara
Professora do Departamento de Química - UFRPE

Examinadores:

Dra. Lilia Willadino
Professora do Departamento de Biologia – UFRPE

Dra. Cláudia Ulisses
Professora do Departamento de Biologia - UFRPE

Dra. Josabete Salgueiro Bezerra de Carvalho
Professora da Unidade Acadêmica de Garanhuns - UFRPE

Recife

28 de Fevereiro de 2013

“Querem que vos ensine o modo de chegar à ciência verdadeira? Aquilo que se sabe, saber que se sabe; aquilo que não se sabe, saber que não se sabe; na verdade é este o saber”.

Confúcio

AGRADECIMENTOS

À Deus, o sentido da minha existência.

À toda minha família, pelo apoio, amor e compreensão nos momentos difíceis.

À professora Terezinha, pelo apoio e compreensão durante essa jornada, pelos ensinamentos e incentivos quando mais precisei.

À professora Lília, pelos ensinamentos e motivação que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

À professora Cláudia, pela paciência e conselhos que me ajudaram na finalização desse trabalho.

A Wellington pelo carinho e amizade, pelos ensinamentos durante a realização das análises.

A todos que fazem parte do laboratório de cultura de tecidos vegetais: Gemima, Marciana, Ronaldo, Jayne, Marina, Arquimedes, João, Fernando, Eduarda, Thamyres, Vinícius e Maíza, que contribuíram para a conclusão deste trabalho, pela amizade, carinho e dedicação de todos.

À amiga Laís pelo auxílio nas análises, por sua dedicação e companheirismo, muito obrigada.

À amiga Luciana sempre prestativa, por sua amizade e cumplicidade nos momentos difíceis dessa jornada, obrigada por tudo.

À amiga Marta, pelo companheirismo, apoio e incentivo quando precisei, pela sua amizade incondicional.

À amiga Natália pela amizade e dedicação nos momentos que precisei.

Ao professor Levy pelos conselhos e ensinamentos que contribuíram para finalização de mais essa etapa.

Ao CETENE (Biofábrica Governador Miguel Arraes) pela concessão do material vegetal para realização dos trabalhos.

À FACEPE pela concessão de bolsa de estudos.

Muito obrigada!

RESUMO

A presente pesquisa visou avaliar respostas morfofisiológicas e bioquímicas em plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) e em plantas de palma forrageira (*Opuntia stricta* Haw) em função da exposição a diferentes tipos e concentrações de citocininas durante a micropropagação dessas espécies. As citocininas são reguladores de crescimento que são amplamente empregadas na fase de multiplicação por induzir a quebra da dominância apical, estimulando a divisão celular e a brotação de gemas laterais. A 6-benzilaminopurina (BAP) é a citocinina mais utilizada na indústria de micropropagação devido à sua efetividade e acessibilidade, porém pode acarretar crescimento anormal em algumas plantas. Um tipo de citocinina aromática não convencional, a *meta*-topolina (*mT*), tem sido alternativa ao uso do BAP a fim de reduzir o aparecimento de desordens morfofisiológicas. Anomalias morfofisiológicas como fasciação em cana-de-açúcar e hiperidricidade, em palma forrageira, são problemas atribuídos ao efeito do excesso ou tempo de exposição prolongado ao BAP. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais/UFRPE com colaboração da Biofábrica Governador Miguel Arraes/CETENE. Plantas de cana-de-açúcar variedade RB98710 foram cultivadas em sistema estático líquido em diferentes concentrações de citocininas (6,66 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BAP; 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BAP ou *mT*). Brotações de palma forrageira, cultivar Orelha de Elefante Mexicana cultivadas *in vitro* foram utilizadas na obtenção de unidades propagativas. Os tratamentos consistiram em dois tipos de citocininas, BAP e *mT* nas concentrações de 2,22 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BAP, 1,11 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BAP ou 1,11 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de *mT* em sistema estático em meio líquido ou sólido. Foram realizadas avaliações da taxa de multiplicação, matéria fresca, altura, avaliação da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT), como também a quantificação dos níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e malondialdeído (MDA). Em cana-de-açúcar foi observado que *mT* promoveu maior taxa de multiplicação e maior altura de plantas e perfilhos. Foi observado o papel do peróxido de hidrogênio no crescimento e desenvolvimento vegetal. As plantas submetidas a maior concentração de BAP apresentaram maior teor de MDA. No cultivo da palma forrageira foi constatado que altas concentrações de BAP favoreceu para a redução da matéria fresca, bem como da altura das brotações. Houve formação de brotos em meio líquido, mesmo que em número reduzido quando comparado com o meio sólido. As características de hiperidricidade

foram mais intensas em brotos provenientes do cultivo com BAP. As brotações hiperídricas apresentaram uma coloração púrpura, principalmente nas podarias. A partir desse estudo foi constatado que a variedade de cana-de-açúcar RB98710 respondeu de forma favorável à adição de *mT*. O uso de *mT* na micropropagação da palma forrageira em meio MS sólido apontam resultados promissores para a produção de mudas em larga escala.

Palavras chaves:, micropropagação, anomalias morfofisiológicas, estresse *in vitro*, fasciação, hiperidricidade, cana-de-açúcar, palma forrageira.

ABSTRACT

This paper has analyzed the morphophysiological and biochemical responses in sugarcane plants (*Saccharum* spp) and cactus pear (*Opuntia stricta* Haw) in function of exposition to various kinds and concentrations of cytokinins during these species' micropropagations. The cytokinins are growth regulators which are largely used in the multiplication phase to induce breaking of the apical dominance, stimulating cell division and budding of lateral buds. The 6-benzylaminopurine (BAP) is the most used cytokinin in the micropropagation industry due to its effectiveness and accessibility; however it may incur abnormal growth in some plants. A kind of aromatic, non-conventional cytokinin, the *meta*-topolin (*mT*), has been an alternative to BAP for the purpose of reducing occurrence of morphophysiological disorders. Morphophysiological anomalies like fasciation in sugarcane and hyperhydricity in cactus pear, are problems caused by excessive exposure to BAP. The work was done in the Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais/UFRPE with collaboration of the Biofábrica Governador Miguel Arraes/CETENE. Sugarcane plants of the RB98710 variety were grown in static liquid system in various cytokinin concentrations (6,66 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of BAP; 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of BAP or *mT*). Buddings of cactus pear from variety Orelha de Elefante Mexicana, growth in vitro were used in the experiment. The treatments consisted in two kinds of cytokinins, BAP and *mT* in concentrations of 2,22 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of BAP, 1,11 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of BAP or 1,11 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of *mT* in static system in liquid or solid medium. Analysis were realized for multiplication ratio, fresh matter, height, analysis for enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT), as well as quantification in hydrogen peroxidase (H_2O_2) and malondialdehyde (MDA). In sugarcane it was observed that the *mT* promoted the higher rate on multiplication and higher height of plants and tillers. The role of hydrogen peroxyde in plant growth and development was observed. The plants submitted to higher BAP concentration displayed a higher MDA content. In the cactus pear growth it was observed that high concentrations of BAP favored the reduction of fresh matter, as well as buddings' height. Formation of buds in liquid medium happened, in low amounts compared to solid medium. The hyperhydricity characteristics were more intense in buds grown with BAP. The hyperhydric buddings displayed a purple coloring, primarily in the podaries. From this paper it was verified that the sugarcane variety RB98710 responded positively to *mT*

addition. The use of *mT* in cactus pear micropropagation in MS solid medium leads to promising results for bud production.

Key words: micropropagation, morphophysiological anomalies, in vitro stress, fasciation, hyperhydricity, sugarcane, cactus pear.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA.

Figura 1. Estrutura química de algumas citocininas aromáticas N^6 -benziladenina (BAP), N^6 -(3-hidroxibenzil)adenina (mT) e N^6 -(2-hidroxibenzil)adenina (oT), com os respectivos nomes e abreviaturas.

Figura 2. Processo de peroxidação lipídica com a formação dos radicais alquila (L •), alcoxila (LO •) e peroxila (LOO •).

CAPÍTULO II - META-TOPOLINA: UMA ALTERNATIVA AO USO DO BAP NA MICROPROPAGAÇÃO DA CANA-DE-AÇÚCAR.

Figura 1. Plantas e perfilhos de cana-de-açúcar variedade RB98710 cultivadas *in vitro* com diferentes concentrações de citocininas, durante 40 dias.

CAPÍTULO III - USO DE CITOCININA NÃO CONVENCIONAL NA MICROPROPAÇÃO DA PALMA FORRAGEIRA *Opuntia stricta* Haw.

Figura 1. Aspectos de hiperidricidade em brotos de palma forrageira (*Opuntia stricta* Haw) cultivadas *in vitro* com diferentes tipos e concentrações de citocininas, durante 45 dias. (a) brotos cultivados em meio líquido; (b) brotos cultivados em meio sólido.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II - META-TOPOLINA: UMA ALTERNATIVA AO USO DO BAP NA MICROPROPAGAÇÃO DA CANA-DE-AÇÚCAR.

Tabela 1. Matéria fresca, altura de perfilhos e plantas, número de perfilhos por planta de cana-de-açúcar variedade RB98710 cultivadas *in vitro* com diferentes tipos e concentrações de citocininas, durante 40 dias.

Tabela 2. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) e teores de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e malondialdeído (MDA) em plantas de cana-de-açúcar variedade RB98710 cultivadas *in vitro* com diferentes tipos e concentrações de citocininas, durante 40 dias.

Tabela 3. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) e teores de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e malondialdeído (MDA) em perfilhos de plantas de cana-de-açúcar variedade RB98710 cultivadas *in vitro* com diferentes tipos e concentrações de citocininas, durante 40 dias.

CAPÍTULO III - USO DE CITOCININA NÃO CONVENCIONAL NA MICROPROPAÇÃO DA PALMA FORRAGEIRA *Opuntia stricta* Haw.

Tabela 1. Número de brotações por explante, altura e matéria fresca de brotos de palma forrageira (*Opuntia stricta* Haw) cultivadas *in vitro* em meio sólido com diferentes tipos e concentrações de citocininas, durante 45 dias.

Tabela 2. Índices de formação de broto (IFB), formação de calo (IFC), enraizamento (IE) e hiperidricidade (IH) em brotos palma forrageira (*Opuntia stricta* Haw) cultivadas *in vitro* em meio líquido ou sólido com diferentes tipos e concentrações de citocininas, durante 45 dias.

Tabela 3. Atividade das enzimas ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) e teores de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e malondialdeído (MDA) em brotos de palma forrageira (*Opuntia stricta* Haw) cultivadas *in vitro* em meio sólido com diferentes tipos e concentrações de citocininas, durante 45 dias.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIA - Ácido 3 – indolacético
APX – Ascorbato Peroxidase
BAP – 6- benzilaminopurina
BAP9G - 6-benzil-amino-9-β-D-glucopiranosilpurine
BIT - Biorreatores de Imersão Temporária
CAT - Catalase
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
MDA – Malondialdeído
MS – Murashig Skoog
mT – *Meta*- topolina
O₂ - Oxigênio molecular
L • - Radical alquila
LO • - Radical alcoxila
LOO • - Radical peroxila
O₂⁻ - Radical superóxido
¹O₂ - Oxigênio singleto
OH• – Radical hidroxila
ROS – Espécies reativas do oxigênio
SOD – Superóxido dismutase
TBA – Àcido tiobarbitúrico
TCA – Àcido tricloroacético

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	15
1 INTRODUÇÃO GERAL	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Micropropagação	18
2.2 Reguladores de crescimento	20
2.2.1 Citocininas.....	20
2.3 Desordens morfofisiológicas	23
2.3.1 Hiperidricidade.....	24
2.4 Espécies reativas de oxigênio.....	25
2.5 Sistema de defesa antioxidativo	27
2.6 A cana-de-açúcar	29
2.7 A palma forrageira	30
3 REFERÊNCIAS	32
CAPÍTULO II	42
<i>Meta</i> -topolina: uma alternativa ao uso do bap na micropropagação da cana-de-açúcar.....	42
Resumo	43
Abstract	44
Introdução	45
Material e métodos	46
Resultados e discussão	48
Conclusão	51
Referências	53
CAPÍTULO III	56
Uso de citocinina não convencional na micropropagação da palma forrageira <i>Opuntia stricta</i> Haw.....	56
Resumo.....	57
Abstract.....	58
Introdução.....	59
Material e métodos.....	60

Resultados e discussão.....	61
Conclusão.....	66
Referências	68
Anexo – Instruções para submissão de artigo a Revista Scientia Agricola	72

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO GERAL

A propagação clonal de plantas *in vitro*, ou micropropagação, ganhou o status de uma indústria multibilionária através do mundo (MEHROTRA et al. 2007).

As taxas de crescimento e multiplicação, bem como a qualidade dos brotos dependem do genótipo da planta e da composição do meio de cultura, em especial, dos reguladores de crescimento adicionados, os quais têm influência sobre a morfogênese dos tecidos que crescem a partir do explante inicial (AKIN-IDOWU et al. 2009).

Na micropropagação de plantas, a rápida produção e crescimento de tecidos e órgãos vegetais se dão em meio sólido ou líquido em condições assépticas, sob ambiente controlado, visando a produção de mudas de alta qualidade fisiológica, uniformes e livres de doenças (CHANDRA et al. 2010).

A aplicação da micropropagação em larga escala exige que se alcancem altas taxas de multiplicação e para isso, reguladores de crescimento são acrescidos ao meio nutritivo. Citocininas derivadas de purina, amplamente utilizadas na fase de multiplicação, induzem a divisão celular e estimulam a brotação de gemas laterais por meio da inibição da dominância apical. A taxa de multiplicação das plantas *in vitro* é geralmente em função do tipo e da concentração de citocinina exógena, bem como do tempo de exposição do material vegetal a esse grupo de regulador de crescimento (SÁENZ et al. 2010).

Na indústria de micropropagação a 6-benzilaminopurina (BAP) é a citocinina mais utilizada devido à sua efetividade e acessibilidade. Entretanto estudos têm mostrado que o excesso ou exposição prolongada podem acarretar alteração genética e crescimento anormal em algumas plantas (BAIRU et al. 2007), com efeitos deletérios no enraizamento e aclimatização das plantas ao ambiente *ex vitro* pela inibição do crescimento ou ausência total de raiz (VALERO-ARACAMA et al. 2010).

Os protocolos de micropropagação de plantas visam a rápida multiplicação de plantas e que estas sejam uniformes e com características morfofisiológicas normais. Entretanto, durante a micropropagação de algumas espécies de plantas, ocorrem distúrbios fisiológicos, o que reduz a aplicação comercial da micropropagação em algumas espécies de plantas. Reguladores de crescimento, em especial as citocininas, estão relacionadas na ocorrência de distúrbios morfofisiológicos, isto necessita de estudos mais aplicados nas respotas

morfológicas das plantas à aplicação exógenas desses reguladores (AREMU et al. 2012).

Anomalias morfofisiológicas como entoceiramento (ou fasciação), hiperidricidade e perda da capacidade morfogênica são desordens atribuídas ao efeito causados pelo uso excessivo ou por longo período de exposição à citocininas. Hiperidricidade, por exemplo, já foi demonstrada ser afetada por altas concentrações de citocinina (ANDRADE et al., 1999; PHAN, 1991; GRIBAUDO e FRONDA, 1991).

A compreensão acerca do modo de ação das citocininas na fisiologia das plantas, bem como a diferença entre os vários tipos de citocininas é de fundamental importância na otimização de protocolos de micropropagação. A busca por alternativas a fim de resolver diversos problemas associados ao uso excessivo ou prolongado de citocininas favoreceu a descoberta de um novo grupo de citocininas aromáticas, *meta* – topolinas (*mT*), as quais têm mostrado resultados promissores na micropropagação de plantas (AREMU et al. 2012).

Diversos autores relatam a eficácia de *mT* em promover o aumento na taxa de multiplicação e na qualidade de brotos na aclimatização (ALDELBERG, 2012; ESCALONA et al. 2003).

Nesse sentido a busca por citocininas alternativas para otimização de protocolos de micropropagação de espécies de interesse econômico, tais como, a cana-de-açúcar e a palma forrageira são importantes.

A cultura da cana-de-açúcar não é tratada apenas como mais um produto agrícola nacional, mas como a mais importante fonte de biomassa energética. O setor sucroalcooleiro responde por cerca de 1 milhão de empregos, dos quais 511 mil estão diretamente envolvidos na produção de cana-de-açúcar e o restante distribuído na cadeia de processamento do açúcar e etanol. Isso representa 6% dos empregos na agroindústria nacional (Conselho de Informações sobre Biotecnologia, 2009).

A palma forrageira tem importante destaque para a região do semiárido do Nordeste brasileiro devido a mecanismos fisiológicos que a torna uma das plantas mais adaptadas às condições desfavoráveis das zonas áridas e semiáridas do mundo (OLIVEIRA et al. 2010). Portanto tem importância na atividade pecuarista a qual constitui a atividade básica das populações rurais em função das condições edafoclimáticas desfavoráveis onde as lavouras apresentam-se apenas como um subcomponente dos sistemas de produção predominantes. A região semi-árida nordestina é representada por cerca de 95 milhões de hectares (NÓBREGA, 2011).

Além do uso na alimentação animal (sendo este o principal), a palma forrageira vem sendo utilizada também na alimentação humana na forma de verdura, bem como matéria-prima para o preparo de outros alimentos (BATISTA et al. 2010).

A micropropagação dessas espécies pode ser prejudicada por problemas causados pelo uso prolongado ou excesso de citocininas, favorecendo a ocorrência de anomalias, tais como, fasciação e hiperidricidade. Em cana-de-açúcar, fasciação pode ser caracterizada pela fusão de vários brotos, formando “massas verdes”, tornando as mudas inviáveis para aclimatização. A hiperidricidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de água nas células, tornando os órgãos vegetais intumescidos, coloração verde claro e folhas quebradiças. Anomalias morfofisiológicas causam alterações que comprometem a taxa de sobrevivência durante a aclimatização.

A proposta do presente trabalho foi investigar a ocorrência de anomalias morfofisiológicas (fasciação em plantas de cana-de-açúcar e hiperidricidade em palma forrageira) em resposta ao efeito do tipo e concentração de citocininas utilizadas no meio de cultivo indutor de multiplicação, mediante análises bioquímicas e biométricas das mudas obtidas *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Micropropagação

O processo de crescimento de células, tecidos e órgãos retirado de uma planta e cultivado em ambiente artificial é conhecido como cultura de tecido de plantas. Esse cultivo baseado na capacidade de uma célula vegetal regenerar uma planta idêntica àquela de origem, que é conhecida por totipotência (BANDHU, 2012).

A cultura de tecidos abrange uma variedade de técnicas *in vitro* que permite manipular células, tecidos ou órgãos de plantas que tem como resultado a formação de novos órgãos ou plantas inteiras a partir de um único segmento, o explante (WATT, 2012).

Dentre as técnicas de cultura de tecidos a micropropagação proporciona rápida multiplicação em um meio asséptico, sob condições nutricionais e ambientais controladas. A utilização da micropropagação em âmbito comercial já é realidade em diversos países do mundo. Há alguns anos, a aplicação comercial da micropropagação concentra-se principalmente na multiplicação de espécies de

interesse econômico e ecológico (CRUZ et al. 2009; JALAJA et al. 2008). Através dessa técnica é possível a obtenção de indivíduos geneticamente idênticos a partir de um segmento de uma planta utilizado como explante, o que permite a multiplicação para produção comercial de espécies de interesse econômico bem como espécies ameaçadas de extinção (WATT, 2012).

A micropropagação é conhecida por auxiliar na propagação clonal de plantas, sendo uma aplicação prática amplamente aceita da biotecnologia vegetal, baseia-se em inocular o material vegetal, propagar e enraizar propágulos em condições de ambiente controlado para posterior aclimatização ao ambiente *ex vitro* (ALADELE et al. 2012). A micropropagação além da rápida produção, permite a obtenção de material uniforme, independentemente da estação e do clima (CHANDRA et al. 2010).

O processo de micropropagação pode ser dividido em três etapas: etapa I - seleção e desinfestação de explantes, posteriormente o explante é cultivado em meio nutritivo sob condições assépticas com temperatura e luminosidade controladas; etapa II - multiplicação dos propágulos mediante sucessivos subcultivos em meio indutor de multiplicação; etapa III - transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e subsequente transplântio das plantas obtidas para substrato ou solo. Esse esquema pode ser alterado conforme peculiaridades de cada espécie, podendo ser necessária uma fase adicional de alongamento da parte aérea antes do enraizamento (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Os meios nutritivos são utilizados com a finalidade de fornecer ao tecidos vegetal que está sendo cultivado, substâncias essenciais para o crescimento e desenvolvimento. Eles podem ser líquidos ou sólidos. Os meios sólidos ou semi sólidos resultam da adição de gelificantes, como por exemplo, o ágar, um polissacarídeo produzido a partir de algas marinhas (CALDAS et al. 1998). Os sistemas de cultivo em meio líquido podem ser estáticos ou em sistema de biorreatores de imersão temporária.

Meios líquidos proporcionam um contato amplo e uniforme dos explante com os nutrientes e demais componentes do meio, além de reduzir os custos de produção pela supressão de gelificantes. No entanto, o cultivo em meio líquido apresenta desvantagens, dificultando as trocas gasosas entre os tecidos e o ambiente do frasco onde estão sendo cultivados além de provocar distúrbios fisiológicos tais como hiperidricidade, (WATT, 2012; VASCONCELOS, et al. 2012).

Uma série de questões precisa ser abordada para tornar a técnica mais útil e amplamente aceitável. As tentativas de promover a multiplicação excessiva e ciclos de cultura prolongados muitas vezes levam às plantas a se desenvolverem com morfologia aberrante. Estas alterações causadas devido a desequilíbrios ambientais e hormonais geralmente são expressas através da produção de plantas com superbrotações, internódios curtos, folhas estreitas e curtas, hiperidricidade, habituação, entre outras (JALAJA et al. 2008).

2.2. Reguladores de crescimento

O crescimento e o desenvolvimento vegetal são controlados por hormônios vegetais, que são sintetizados pelas plantas e funcionam como inibidores ou estimuladores de processos fisiológicos vitais. Outras substâncias, sintéticas ou não, são denominadas de reguladores de crescimento e têm efeitos similares aos dos hormônios vegetais (TAIZ e ZEIGER, 2004). A regeneração e multiplicação de brotos durante a micropropagação é afetada pelo tipo e concentração de reguladores de crescimento aplicados, especialmente as citocininas, devido à sua importância no processo de divisão celular e organogênese (AREMU, et al. 2012).

2.2.1. Citocininas

O tipo e a concentração de citocinina na etapa de multiplicação, constitui um passo importante na micropropagação de plantas (CSABAI et al. 2011). As citocininas são indispensáveis para a quebra da dominância apical e estão relacionadas com a diferenciação celular, sobretudo no processo de formação de gemas caulinares, das quais surgirão novos brotos (MACHADO et al. 2011).

As citocininas naturais são derivados da adenina e podem ser classificadas como citocininas isoprenóides ou aromáticas em função da configuração da cadeia lateral ligada ao N6. Entre as citocininas aromáticas está a 6-benziladenina (BA), também conhecida como 6-benzilaminopurina (BAP) (Figura 1). Os derivados hidroxilados da BAP foram nomeados topolinas (STRNAD, 1997) e foram reconhecidos como naturais com base em seu isolamento a partir de distintas espécies de plantas. As formas hidroxiladas *meta* - e *orto*-topolinas ocorrem naturalmente, acompanhadas por seus nucleosídeos, nucleotídeos e O-glucosídeos.

A *meta*-topolina é muito mais ativa do que os *para* e *orto*-derivados (MOK e MOK, 2001).

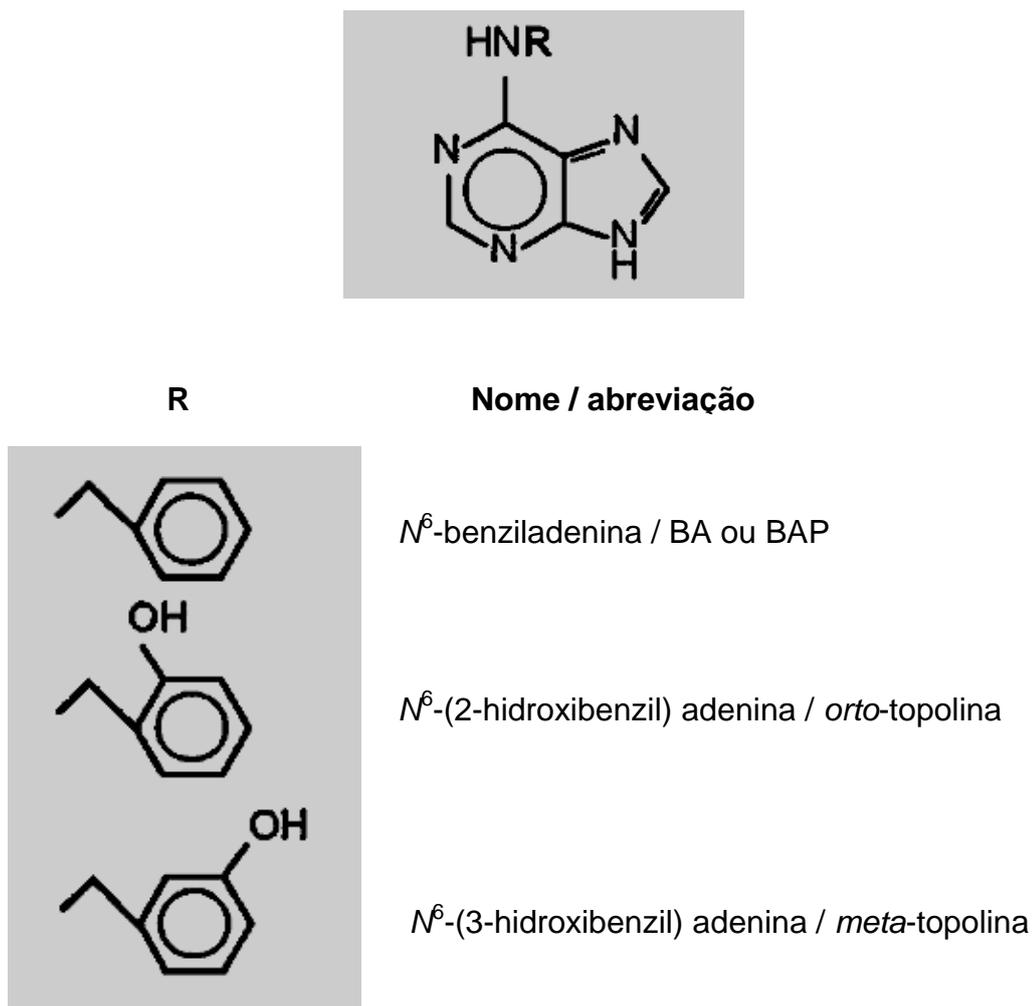


Figura 1. Estrutura química de algumas citocininas aromáticas *N*⁶-benziladenina (BAP), *N*⁶-(3-hidroxibenzil) adenina (*mT*) e *N*⁶-(2-hidroxibenzil) adenina (*oT*), com os respectivos nomes e abreviaturas (modificado de STRNAD, 1997 e MOC & MOC, 2001).

Na indústria de micropropagação a 6-benzilaminopurina (BAP) (figura 1), é a citocinina mais utilizada devido à sua efetividade e acessibilidade, mas pode acarretar alteração genética e crescimento anormal em algumas plantas (BAIRU et al. 2007), ocasionando efeitos deletérios no enraizamento e aclimatização (VALERO-ARACAMA et al. 2010).

A adequação das condições de cultivo e dos indutores da morfogênese é fundamental para garantir uma elevada taxa de multiplicação sem comprometer a qualidade fisiológica das plantas micropropagadas o que irá assegurar a aclimatização.

Na tentativa de resolver vários problemas no desenvolvimento das plantas associados ao uso excessivo de citocininas em geral e, em particular, o BAP, outras citocininas estão sendo testadas (AREMU et al. 2012). Pesquisas recentes têm mostrado resultados promissores com o uso de topolinas em sistemas de cultura de tecidos de plantas.

Bairu et al. (2008) observaram maior taxa de multiplicação e maior número de brotos em duas cultivares de banana (*Musa spp.*) nos tratamentos em que se utilizou a *meta*-topolina (*mT*) nas concentrações de 7,5 μ M, 15 μ M e 30 μ M, em relação aos demais tratamentos em que o BAP foi aplicado em concentrações equimolares. Além disso, verificou-se a expressiva influência da *mT* na redução do aparecimento de anormalidades no cultivo *in vitro* das cultivares estudadas.

O uso de *mT* (N6 -(3-hidroxibenzil) adenina) e seus derivados como alternativas para o uso de BAP reverteu a hiperidricidade e aumentou as taxas de multiplicação e enraizamento na micropropagação de *Aloe polyphylla* quando foram utilizados 5,0 μ M de *mT* (BAIRU et al. 2007).

Outros autores observaram a eficácia de *mT* em promover o aumento na taxa de multiplicação e na qualidade de brotos para aclimatização (ALDELBERG, 2012; ESCALONA et al. 2003).

As citocininas formam conjugados reversíveis com açúcares e aminoácidos que agem no transporte, armazenamento ou inativação. As bases livres podem representar apenas uma pequena porção do total de citocininas, enquanto os ribosídeos correspondentes e especialmente os nucleotídeos são frequentemente mais abundantes. A maioria dos tecidos vegetais armazena citocininas em formas inativas de O- e N-glucosídeos (MOK et al. 2005).

Uma limitada formação de derivados de BAP foi observada após a aplicação de *meta*-topolina ao meio de cultura, bem como constatou-se a formação de *mT* e BAP em explantes de *Sorbus torminalis* tratados com a citocinina 6-(3-metoxibenzilamino) purina (MeOBAPR) (MALÁ et al 2009). A diferença nos metabólitos de diferentes citocininas pode indicar que é improvável que todas elas possam ser convertidas em um tipo de metabólito comum responsável pelas respostas de crescimento (AREMU et al. 2012; AMOO et al. 2010).

O acúmulo do metabólito do BAP, o 9-B-glucopiransosil-benziladenina ([9G]BA), tem sido apontada como responsável pela redução do enraizamento em algumas culturas (AMOO et al. 2010). Os 9-glucosídeos estão entre os principais metabólitos das citocininas em tecidos vegetais. A toxicidade do [9G]BA é muitas

vezes atribuída à natureza mais estável da BAP e seus metabólitos em tecidos vegetais *in vitro* e *ex vitro*, em comparação a outras citocininas (AMOO et al. 2010).

2.3. DESORDENS MORFOFISIOLÓGICAS

Plantas propagadas *in vitro* estão sujeitas a várias situações envolvendo estresse que podem levar ao desenvolvimento de plantas com anomalias morfológicas (BARBOSA, 2006).

A regeneração e multiplicação de brotos durante a micropropagação têm sido afetadas pelo tipo e concentração de reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultivo, em especial as citocininas (AREMU et al. 2012). Alguns efeitos residuais atribuídos às citocininas têm sido observados em plantas após o plantio como, por exemplo, menor capacidade de sobrevivência durante a aclimatização decorrente da hiperidricidade (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Eventualmente podem surgir diferentes anomalias morfofisiológicas em culturas durante o cultivo *in vitro* tais como hiperidricidade, habituação, crescimento desordenado ou fasciação bem como perda da capacidade de regeneração. Durante a etapa de aclimatização, outro problema pode ocorrer, devido prejuízos causados pela má formação ou inibição da formação da raiz. Muitos sistemas de micropropagação utilizam a citocinina BAP devido a sua eficiência e baixo custo (WERBROUCK et al. 1995; BAIRU et al. 2007).

Souza et al. (2003) observaram anormalidades no crescimento de brotos de arnica (*Lychnophora pinaster*), os quais se apresentaram com morfologia anormal e hiperidricidade quando cultivados em meio MS contendo $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP. Além disso, constataram redução no tamanho e no número das brotações.

Mesmo estimulando a multiplicação, o excesso de citocininas ou a escolha inadequada da citocinina pode provocar o surgimento de variações morfofisiológicas durante a fase de multiplicação, podendo comprometer o desenvolvimento normal das plantas (FACHINELLO et al. 1994).

A exposição prolongada ao BAP pode levar à ocorrência de fasciação, anomalia caracterizada pelo descontrole no desenvolvimento normal dos brotos (ANDRADE, 2011). A fasciação é caracterizada pelo achatamento na parte aérea devido a falhas na separação dos ramos laterais durante o crescimento. Também tem sido descrita como a fusão de órgãos devido a desvio do processo normal de desenvolvimento (BAIRU et al. 2011; FUJITA et al. 2011). Reguladores de

crescimento têm sido relacionados ao surgimento desse tipo de anomalia (RAMAGE e WILLIAMS, 2004). Em cana-de-açúcar a fasciação é conhecida vulgarmente como “massa verde”.

2.3.1. Hiperidricidade

A hiperidricidade é definida como um distúrbio morfofisiológico de plantas propagadas *in vitro*. Nessas condições os tecidos vegetais apresentam-se intumescidos pelo acúmulo anormal de água resultando em aspecto translúcido com aparência vítrea e coloração verde claro (VASCONCELOS et al. 2012), folhas mais espessas, enrugadas e quebradiças (KEVERS et al. 2004).

Brotos que se desenvolvem em condições contínuas de alta umidade apresentam maior susceptibilidade à hiperidricidade. Culturas mantidas em meio líquido geralmente desenvolvem essa anomalia mais facilmente do que aquelas mantidas em meio sólido (HAZARIKA, 2006).

A hiperidricidade pode ser reversível, apresentar-se em grau variado e acometer apenas parte dos explantes ou brotos em cultivo (OLIVEIRA, et al. 2008).

Alguns efeitos residuais atribuídos às citocininas têm sido observados em plantas micropropagadas, por exemplo, menor capacidade de sobrevivência durante a aclimatização decorrente da hiperidricidade (MAKUNGA et al. 2005).

Embora suas causas e características morfológicas sejam conhecidas, há muita dificuldade de controlar e compreender as alterações bioquímicas e morfológicas que ocorrem em plantas acometidas por essa anomalia. Assim, o estudo dessa síndrome visando a paralisação e/ou reversão das alterações que ocorrem durante o desenvolvimento das plantas hiperídricas é de fundamental importância na cultura de tecidos para a obtenção de plantas fisiologicamente sadias (CHAKRABARTY et al. 2005).

Medeiros (2011) avaliando a resposta fisiológica e bioquímica da palma forrageira cultivar Orelha de Elefante Mexicana (*Opuntia stricta* Haw) em diferentes sistemas de cultivo *in vitro* com diferentes concentrações de BAP, verificou alta frequência de brotações hiperídricas no sistema de biorreatores de imersão temporária no tratamento contendo a menor concentração de BAP. Nos outros sistemas de cultivo a ocorrência de hiperidricidade só se verificou no tratamento contendo a maior concentração de BAP (1,0 mg L⁻¹). Os brotos hiperídricos apresentaram-se com aspecto translúcido, arredondados, cobertos com padrão

irregular de podárias. Makunga et al. (2005), buscando a adequação de protocolo para a regeneração *in vitro* de *Thapsia garganica* sob influência de auxinas e citocininas, também observaram maior incidência de brotações hiperídricas nos tratamentos que continham maiores concentrações de BAP, em meio semi-sólido.

Essas pesquisas demonstram que a alta disponibilidade de água e de citocininas contribuem para a manifestação da síndrome de hiperidricidade, com um aparente efeito sinérgico.

2.4. Espécies reativas de oxigênio

Fatores bióticos ou abióticos podem levar ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), que acarretam distúrbios metabólicos graves, com alterações no sistema redox e danos a macromoléculas e estruturas celulares, caracterizando o estresse oxidativo (GILL & TUJEDA, 2010).

Fatores do ambiente do cultivo *in vitro* como por exemplo, a alta umidade relativa, suprimento inadequado de reguladores de crescimento, dentre outros fatores, impõem algumas situações que podem levar a uma condição estressante para as células e tecidos cultivados (CAMARA e WILLADINO, 2005).

A imposição de condições estressantes ocasiona o aumento da taxa de produção de ROS tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido ($\bullet O_2^-$), radical hidroxila ($\bullet OH$) e oxigênio singlete (1O_2). Os locais mais importantes na geração de ROS são cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (BATKOVÁ et al. 2008). Outro importante local onde ocorre a formação de ROS é no espaço apoplástico, que acontece mediante ação das proteínas NADPH oxidase (NOX), que oxidam e transferem elétrons para a região do apoplasto, os quais serão doados para moléculas de oxigênio formando superóxido, que é a fonte para a formação de outras ROS, tais como peróxido de hidrogênio (BELL et al. 2009).

No seu estado fundamental o oxigênio molecular (O_2) é um tripleto com dois elétrons ímpares, o que faz dele um di-radical. A excitação dessa molécula conduz a uma mudança na distribuição de elétrons nos orbitais e formação do 1O_2 (BARTOSZ, 1997).

O não emparelhamento de elétrons na última camada eletrônica do O_2 é a causa da sua afeição por elétrons, que favorece a ocorrência de reduções parciais,

formando, respectivamente, $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 e $\cdot\text{OH}$ (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; BARTOSZ, 1997).

Após a primeira redução do O_2 forma-se o $\cdot\text{O}_2^-$. Se duas sucessivas reações de redução ocorrerem, será formada H_2O_2 que, embora não seja um radical também é uma ROS (BARTOSZ, 1997; FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

O H_2O_2 quando reage com o Fe^{3+} forma $\cdot\text{OH}$, que é considerada a ROS mais reativa nos sistemas biológicos. Trata-se de um forte agente oxidante que, uma vez formado pode reagir indiscriminadamente com moléculas orgânicas e causar danos ao organismo como um todo (BARTOSZ, 1997).

Rápidas reações entre as ROS e os sistemas biológicos podem ocorrer e causar danos a todas as classes de biomoléculas, incluindo a peroxidação de lipídios de membrana, danos ao DNA, estragos ao aparelho fotossintético (ANJUM et al. 2011).

A atividade biológica das ROS é regida por sua concentração no ambiente celular. Quando em baixas concentrações ao invés de causar danos, o H_2O_2 , por exemplo, pode atuar como sinalizador em vários processos, tais como crescimento e desenvolvimento de plantas, bem como ativação de mecanismos de defesa e morte celular programada (LOCATO et al. 2010; BELL et al. 2009).

Todos os componentes celulares podem sofrer a ação das ROS, sendo que as membranas são as mais atingidas em decorrência do processo de peroxidação lipídica, acarretando alterações na estrutura e conseqüentemente no funcionamento, ocasionando perdas na seletividade das células (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). A peroxidação de ácidos graxos insaturados presentes na membrana das células é um processo conhecido como lipoperoxidação ou peroxidação lipídica (BEZERRA, 2004).

O processo de peroxidação lipídica pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação de radicais livres sobre os lipídios insaturados das membranas celulares, gerando principalmente radical alquila ($\text{L}\cdot$), alcóxila ($\text{LO}\cdot$) e peróxila ($\text{LOO}\cdot$), levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e numa condição extrema, pode levar à morte celular (LIMA et al. 2001).

A peroxidação lipídica pode ocorrer por reação enzimática, através de lipoxigenases ou através de reação não enzimática, a qual é iniciada por radicais livres tais como oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (MONTILLET et al. 2004).

O oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) gerado durante processos foto-oxidantes contribui para formação de uma dupla ligação, levando após o rearranjo a produção de hidroperóxidos de dienos conjugados. A proximidade das moléculas de ácidos graxos favorece a propagação de uma reação em cadeia por meio de reações entre os radicais $\text{L} \cdot$, $\text{LO} \cdot$ e $\text{LOO} \cdot$ com o oxigênio (Figura 2), que pode levar a uma desorganização de grandes áreas de membrana devido a propagação dos danos causados pela peroxidação lipídica (MONTILLET et al. 2004; LIMA et al. 2001).

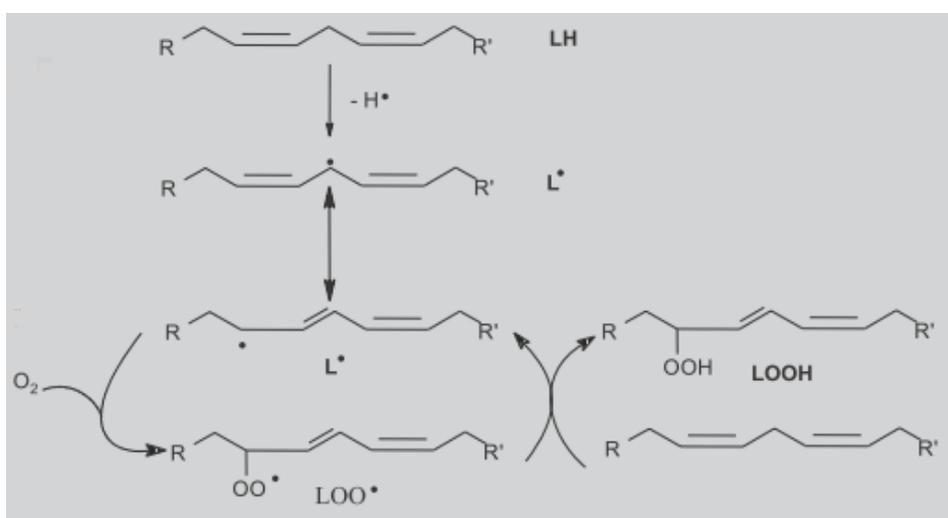


Figura 2. Processo de peroxidação lipídica com a formação dos radicais alquila ($\text{L} \cdot$), alcóxila ($\text{LO} \cdot$) e peróxila ($\text{LOO} \cdot$) (Gill & Tuteja, 2010).

Os danos causados às membranas biológicas em decorrência da peroxidação lipídica podem ser avaliados indiretamente através da mensuração do teor de malondialdeído (MDA) o qual é um subproduto da reação peroxidativa (ALI & ASHRAF, 2011). As membranas celulares apresentam um sistema de defesa contra a ação das ROS. Esse sistema é composto por um conjunto de antioxidantes hidrofóbicos, em primeiro lugar os tocoferóis, além dos carotenóides e das xantofilas (FERREIRA et al. 2007).

2.5. Sistema de defesa antioxidativo

As plantas desenvolveram um sistema de defesa capaz de controlar os níveis das ROS. Um sistema antioxidativo composto por enzimas e metabólitos de baixo

peso molecular desempenham importante papel na prevenção dos danos oxidativos, atuando no controle dos níveis de ROS, garantindo assim o funcionamento normal das células (ANJUM et al. 2011).

O termo antioxidante refere-se a qualquer molécula capaz de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que eles causem danos às células. Os componentes do sistema antioxidante atuam em sinergia, uns com os outros (RAHMAN, 2007).

As principais enzimas envolvidas no controle dos níveis de ROS nas plantas incluem a superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), peroxidases (POD, EC 1.11.1), glutathione redutase (GR), monodehidroascorbato redutase (MDHAR), dehidroascorbato redutase (DHAR) (MITTLER et al. 2004).

A SOD é responsável por atuar na dismutação do radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) gerando H_2O_2 e O_2 . Essa enzima em suas isoformas está localizada nos cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos e citosol e constitui um importante mecanismo de defesa frente ao excesso de geração de ROS prevenindo dessa forma o acúmulo que desencadeia o estresse oxidativo (BATKOVÁ et al. 2008; DEL RÍO et al. 1996).

A ascorbato peroxidase apresenta alta afinidade pelo H_2O_2 realizando sua remoção mesmo quando encontrado em baixas concentrações. Esta enzima também está presente nos peroxissomos, localizado-se na membrana com o sítio catalítico voltado para o citoplasma, além de presente em cloroplastos, mitocôndrias e citosol. Apesar de essa organela ser bem provida de CAT, a presença de APX deve-se provavelmente à baixa afinidade de CAT por H_2O_2 . Portanto em baixas concentrações, essa ROS logo é reduzida água e oxigênio pela APX assim que atravessa a membrana peroxissomal (LOCATO et al. 2011).

A catalase desempenha papel semelhante ao da APX, atuando na remoção de H_2O_2 convertendo-o a H_2O e oxigênio, apresenta entretanto menor afinidade pelo substrato atuando principalmente quando ocorre excesso de H_2O_2 , uma vez que para a reação ocorrer são necessárias duas moléculas de H_2O_2 (ISAH e MUJIB, 2012).

As enzimas glutathione redutase (GR), monodehidroascorbato redutase (MDHAR) e dehidroascorbato redutase (DHAR) estão respectivamente, envolvidas na reciclagem de glutathione e ácido ascórbico e fazem parte do ciclo ascorbato – glutathione (GILL & TUTEJA, 2010).

A glutatona redutase é uma flavoproteína presente em cloroplastos, mitocôndrias e citosol responsável por catalisar a reação de redução da GSSH a GSH utilizando NADPH, portanto, importante para manter uma concentração intracelular constante de GSH (LOCATO et al. 2010).

A enzima MDHAR é uma flavina adenina dinucleotídeo (FAD), que apresentar-se como isoenzimas nos cloroplastos e citosol. As DHAR regeneram ascorbato (ASH) do seu estado oxidado e regula o estado redox celular que é crucial para a tolerância a vários stress abiótico (GILL & TUTEJA, 2010).

2.6. A cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma planta nativa das regiões tropicais, cujo cultivo se estende, atualmente, aos dois hemisférios. Foi considerada como remédio e até como artigo de luxo até o século XVIII. Sua crescente valorização como adoçante deve-se ao antigo costume de se adoçar chá, café e chocolate com mel (CESNIK e MIOCQUE, 2004).

A cana-de-açúcar é uma planta, pertencente à tribo Andropogoneae, à família Poaceae (antiga Gramineae), gênero *Saccharum* (BORÉM, 2005).

A área cultivada com cana-de-açúcar que será colhida e destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2012/13 está estimada em 8.520,5 mil hectares, distribuídos em todos os Estados produtores conforme suas características. O estado de São Paulo é o maior produtor com 51,87% (4.419,46 mil hectares) e Pernambuco com 3,84% (327,61 mil hectares). A produtividade média brasileira está estimada em 69.846 kg/ha, 4,2% maior que na safra 2011/12, que foi de 67.060 kg/ha. A previsão atual de produção de açúcar na safra 2012/13 é de 37,66 milhões de toneladas, 4,72% a mais que na safra anterior, que foi de 35,97 milhões de toneladas. Deste total 11,32% refere-se à Região Nordeste (CONAB, 2013).

O Brasil é atualmente referência mundial como produtor de cana-de-açúcar, açúcar e etanol, capaz de gerar uma energia renovável e limpa. Devido ao aumento na busca por combustíveis que gerem menos poluentes e venham de uma fonte renovável, ocorreu rápida expansão na área de cultivo de cana-de-açúcar a fim de atender à demanda desses produtos (VIDAL, 2010).

A produção de etanol a partir da cana-de-açúcar no Brasil tem construído caminhos para a estabilidade e a consolidação para o fornecimento mundial de combustível (CHEAVEGATTI - GIANOTTO et al. 2011).

De acordo com a União da Indústria da Cana-de-açúcar (UNICA), o setor sucroalcooleiro tem potencial para suprir 15% das necessidades brasileiras até 2015, com a geração de mais de 14.000Mw médios a partir da utilização de 75% do bagaço e 50% da palha disponível nas usinas (UNICA, 2011) .

Além do açúcar e do álcool utilizado como combustível, a cana-de-açúcar tem servido de matéria prima para outros produtos tais como bebidas, ração animal e biofertilizantes (JALAJA et al. 2008).

Atualmente, cerca de 58% da área brasileira cultivada com cana-de-açúcar utiliza cultivares provenientes do programa de melhoramento da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético – RIDESA, chegando em algumas regiões a representar até 70% de área cultivada (RIDESA, 2011).

A implantação de novas tecnologias que possibilitem um aumento da produtividade e da competitividade dos produtores sempre causa impacto positivo no setor (JALAJA et al., 2008). Dentre as novas tecnologias aplicadas, encontra-se a bioprodução de mudas utilizando a cultura de tecidos, mais precisamente a micropropagação, a qual tem sido utilizada com sucesso para aumentar produção de mudas em vários países do sudeste asiático (JALAJA et al., 2008).

2.7. A Palma forrageira

No Estado de Pernambuco a área de produção de forrageiras corresponde a aproximadamente 210 hectares, sendo essa produção em virtude principalmente da agricultura familiar (IBGE, 2006). A produção de forragem na região do semiárido brasileiro tem sido comprometida devido à distribuição e o baixo índice pluviométrico durante o ano (COSTA, 2010).

A seca que atingiu a região nordeste nos últimos meses foi considerada a pior dos últimos trinta anos. Os estados mais atingidos pela estiagem foram a Bahia, Pernambuco, Ceará, Rio Grande do Norte e Piauí (DIÁRIO DE PERNAMBUCO, 2012).

Nas regiões do semiárido a palma forrageira vem sendo plantada pelas comunidades a fim de garantir alimento para os rebanhos em épocas de secas prolongadas. No Estado de Pernambuco, que é o segundo maior produtor de leite do nordeste, a palma tem sido utilizada como base da alimentação do rebanho leiteiro (EMBRAPA, 2011).

A palma forrageira pertence à Divisão Embryophyta, Subdivisão Angiospermea, Classe eudicotiledôneas, Subclasse Archiclamideae, Ordem Caryophyllales e família Cactaceae. A família das cactáceas é composta de 178 gêneros com cerca de 2.000 espécies conhecidas. Aos gêneros *Opuntia* e *Nopalea* pertencem as espécies de palma mais utilizadas como forrageiras (SOUZA & LORENZI, 2012).

A utilização da palma (*Opuntia stricta* Haw.) na alimentação de ruminantes tem aumentado consideravelmente, visto que apresenta aspectos especiais em sua fisiologia por apresentar metabolismo fotossintético CAM (Metabolismo ácido das crassuláceas), que permite o uso eficiente da água (SILVA, 2006; MAREROWICZ, 2008).

Além de sua importância como forragem a palma forrageira vem sendo utilizada na alimentação humana na forma com o uso de vários produtos obtidos a partir da palma e que também vem sendo consumida *in natura*. Além disso é usada como cercas vivas em projetos de ornamentação (BATISTA et al. 2010).

Devido a sua importância agroeconômica, por ser adaptável às condições edafoclimáticas desfavoráveis e ser fonte de água e nutrientes em períodos de seca, é de extrema importância a aplicação de técnicas que venham a contribuir para a produção de mudas. Nesse âmbito a aplicação da micropropagação de plantas desempenha importante papel na produção de mudas em larga escala.

Em estudos recentes no qual foram avaliadas algumas das cultivares e clones que são mais utilizados na região nordeste, verificou-se que dentre as cultivares estudadas, a palma Orelha de elefante (*Opuntia stricta* Haw) teve bom desempenho em relação ao nível de infestação pela cochonilha do carmim (CHIACCHIO, 2006; VASCONCELOS, 2009).

3. REFERÊNCIAS

ADELBERG, J.; NAYLOR-ADELBERG, J. Effects of cytokinin on multiplication and rooting of *aloe barbadensis* during micropropagation on agar and liquid medium. **Journal of Medicinally Active Plants**. V.1: 1-26. 2012.

AKIN-IDOWU, P.E.; IBITOYE, D.O.; ADEMOYEGUN, O.T. Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. **African Journal of Biotechnology**, v.8, (16), p.3782-3788., 2009.

ALADELE, S. E.; OKERE, A.U.; JAMALDINNE, E.; LYAM, P.T. ; FAJIMI, O.; ADEGEYE, A.; ZAYAS, C.M. The Science of Plant Tissue Culture as a Catalyst for Agricultural and Industrial Development in an Emerging Economy. p.41-62. 2012.

ALI, Q.; ASHRAF, M. Induction of drought tolerance in maize (*Zea mays* L.) due to exogenous application of trehalose: growth, photosynthesis, water relations and oxidative defence mechanism. **J. Agronomy & Crop Science**. p.258-271, 2011.

AMOO, S. O.; FINNIE, J. F.; STADEN, J. The role of meta-topolins in alleviating micropropagation problems.. **Plant Growth Regulation**. v. 63: 197–206, 2010.

ANDRADE, G. R. Resposta do sistema antioxidativo sob a influência de 6-benzilaminopurina na micropropagação de cana-de-açúcar. 75f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2011.

ANDRADE, L.B.; ECHEVERRIGARAY, S.; FRACARO, F.; PAULETTI, G.F.; ROTA, L. The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandura vera* DC). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.56, p.79–83, 1999.

ANJUM, S. A.; XIE, X.; WANG, L.; SALEEM, M. F.; MAN, C.; LEI, W. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress Shakeel Ahmad Anjum. **African Journal of Agricultural Research** v. 6(9): 2026 - 2032, 2011.

SOUZA, L. M. Uso de citocininas não convencionais (*meta*-topolinas) no controle de anomalias...

AREMU, A. O.; BAIRU, M. W.; DOLEZAL, K.; FINNIE, J. F.; STADEN, J. V. Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges? **Plant Cell Tiss Organ Cult** . v.108, p.1–16, 2012.

BAIRU, M. W.; KANE, M. E. Physiological and developmental problems encountered by in vitro cultured plants. **Plant Growth Regul.** 63:101–103, 2011.

BAIRU, M.W.; STIRK, W.A.; DOLEZAL, K.; VAN STADEN, J.; Optimizing the micropropagation protocol for the endangered Aloe polyphylla: can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin? **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v.90, p.15–23, 2007.

BAIRU, M.W.; STIRK, W.A.; DOLEZAL, K.; VAN STADEN, J.; The role of topolins in micropropagation and somaclonal variation of banana cultivars ‘Williams’ and ‘Grand Naine’ (Musa spp. AAA). **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v.95, p. 373–379, 2008.

BANDHU, A.. Plant tissue culture techniques for global food production. **Science horizon**. 9 edição. 35-41, 2012.

BARBOSA, L. M. P. Caracterização anatômica e bioquímica da hiperidricidade em morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) e videira (*Vitis vinifera x Vitis rotundifolia*) propagados *in vitro*. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade de Viçosa , Minas Gerais - Brasil - . p.128, 2006.

BARTOSZ, G. Oxidative stress in plants. **Acta physiologia e plantarum**. vol. 19. n.1 47-64.1997.

BATISTA, R. D. S. R.; SILVA, R. A.; BRANDÃO, T. M.; VELOSO, T. R.; NEVES, J. A.; SANTOS, D. N. Bebida mista à base de goiaba (*Psidium guajava* L.) e palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*): desenvolvimento e aceitabilidade. **Archivos latinoamericanos de nutrición**. Organó oficial de la sociedad latinoamericana de nutrición. Vol. 60 Nº 3, 2010.

SOUZA, L. M. Uso de citocininas não convencionais (*meta-topolinas*) no controle de anomalias...

BATKOVÁ, P.; POSPÍSILOVÁ, J.; SYNKOVÁ, H. Production of reactive oxygen species and development of antioxidative systems during in vitro growth and ex vitro transfer. **Biologia plantarum** 52 (3): 413-422, 2008.

BELL, E.; TAKEDA, S.; DOLAN, L. Reactive Oxygen Species in Growth and Development. In: DEL RÍO, A.; PUPPO, A. Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. **Springer**. p. 43-54, 2009.

BEZERRA, F. J.; REZENDE, A. A.; RODRIGUES, S. J.; ALMEIDA, M. G. Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico como indicador da peroxidação lipídica em ratos tratados com sevoflurano. **Rev Bras Anesthesiol**. 54 (5): 640 – 649, 2004.

BORÉM, A. Melhoramento de plantas. 22 ed., Viçosa: **Editora UFV**, 422p., 2005.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília, DF: **EMBRAPA/CNPH**, v. 2, p. 87- 132, 1998.

CAMARA T. R.; WILLADINO L. Compreendendo o estresse abiótico in vitro. In: NOGUEIRA R.J.M., ARAÚJO E. L. A., WILLADINO L., MAAZE U. (Eds) Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas, 1ª ed. **MXM Gráfica e Editora**, Recife, v.1, pp. 325-333, 2005.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**. p.307 , 2004.

CHAKRABARTY, D.; PARK, S. Y.; ALI, M. B.; SHIN, K. S.; PAEK, K. Y. Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. **Tree Physiology** v.26, p. 377–388, 2005.

CHANDRA, S.; BANDOPADHYAY, R.; KUMAR, V.; CHANDRA, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**, v.32, p.1199–1205, 2010.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; ABREU, H. M. C.; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J. C.; BURNQUIST, W. L.; CRESTE, S.; DI CIERO, L.; FERRO, A.; FIGUEIRA, A. V. O.; FILGUEIRAS, T. S.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; GUZZO, E. C.; HOFFMANN, H. P.; LANDELL, M. G. A.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; REINACH, F. C.; ROMANO, E.; SILVA, W. J.; SILVA FILHO, M. C.; ULIAN, E. C. Sugarcane (*Saccharum x officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. **Review Tropical Plant Biol.** v.4; p. 62-89, 2011.

CHIACCHIO, F. P. B.; MESQUITA, A. S.; SANTOS, J. R. Palma forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o semiárido baiano. Bahia **Agríc.**, v.7, n.3, 2006.

Companhia Nacional de Abastecimento (**CONAB**). Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2012. Brasília. Acesso em: 09/02/2013. Disponível em <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=>.

Conselho de Informações sobre biotecnologia. **Guia da cana-de-açúcar**. 2009. Disponível em: www.cib.org.br. Acesso em 06/08/2011.

COSTA, M. R. G.F.; CARNEIRO, M. S.S.; PEREIRA, E. S.; FEITOSA, J. V.; SALES, R.O.; MORAIS NETO, L. B.; PEIXOTO, M. J. A. Produção e composição química da palma forrageira micropropagada in vitro. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.11, n.4, p. 953-960, 2010.

CRUZ, M. A. L.; SILVA, A. D. C.; VEIGA, C. F. M.; SILVEIRA, V. Biofábricas para produção de mudas por micropropagação: estratégia para o aumento da produtividade de cana-de-açúcar no rio de janeiro. **Revista Científica Internacional** ano 2 - N ° 05, 2009.

CSABAI, J.; NAGY, Z.; MÁNDY, A. T. *In vitro* shoot proliferation of telekia speciosa (schreb.) Baumg. Induced by different cytokinins. **Acta biologica hungarica**. v. 62(4) :453–462, 2011.

DEL RIO, L. A.; PALMA, J. M.; SANDALIO, L. M.; CORPAS, F. J.; PASTORI, G. M.; BUENO, P.; LÓPEZ-HUERTAS, E. Peroxisomes as a source of superoxide and

SOUZA, L. M. Uso de citocininas não convencionais (*meta-topolinas*) no controle de anomalias...

hydrogen peroxide in stressed plants. **Biochemical Society Transactions**. v.24. p. 434-438, 1996.

Empresa Brasileira de Pesquisa em Agropecuária – **EMBRAPA**. Acesso em: 24/09/2011. Disponível em: www.agencia.cnptial.embrapa.br.

ESCALONA, M.; CEJAS, I.; GONZÁLEZ-OLMEDO, J.; CAPOTE, I.; ROELS, S.; CAÑAL, M. J.; RODRÍGUEZ, R.; SANDOVAL, J.; DEBERGH, P. The effect of meta-topolin on plantain propagation using a temporary immersion bioreactor. **InfoMusa** - Vol. 12 - No.2. p. 28-30, 2003.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E.; FORTES, G. R. L. Propagação de plantas frutíferas de clima temperado. Pelotas: **Editora e Gráfica Universitária da UFPel**, 1994.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**; 43(1): 6. p.1-8, 1997.

FERREIRA, I. C.F.R.; ABREU, R. M. V. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. **Bioanálise** / Ano IV • n. 2, 2007.

FUJITA, H.; KAWAGUCHI, M. Strategy for shoot meristem proliferation in plants. **Plant Signaling & Behavior** v.6:11, 1851-1854, 2011.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 48:909 – 930, 2010.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, A. M. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília, DF: **EMBRAPA/CNPq**, v. 1, p. 183 – 260, 1998.

GRIBAUDO, I.; FRONDA, A. Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds cultivated in vitro. **HortSci.**, v.26, p. 1083-1086, 1991.

- SOUZA, L. M. Uso de citocininas não convencionais (*meta-topolinas*) no controle de anomalias...
- HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. **Scientia Horticultureae** v. 108, p. 105–120, 2006.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – **IBGE**. Censo agropec., Rio de Janeiro, p.1-267, 2006.
- ISAH, T.; MUJIB, A. Studies on Antioxidant Enzymes Activity During *in vitro* Morphogenesis of *Caladium bicolor* Linn. **Int. J. Modern Cell. Mol. Biol.**, v.1(1): 1- 9, 2012.
- JALAJA, N.C.; NEELAMATHI, D.; SREENIVASAN, T.V. Micropropagation for quality seed production in sugarcane in Asia and the Pacific. – **FAO -Food and Agricultural Organization of United States of America**. Bangkok. 46p, 2008.
- KEVERS, C.; FRANCK, T.; STRASSER, R. J.; DOMMES, J.; GASPAR, T.2004.Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 77: 181–191.
- LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol. 37, n. 3, 2001.
- LOCATO, V.; PINTO, M.C.; PARADISO, A.; GARA, L. 2010. Reactive Oxygen Species and Ascorbate-Glutathione Interplay in Signaling and Stress Responses. In: In: GUPTA, S. DUTTA. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. p. 45-64.
- MACHADO, M. P.; SILVA, A. L. L.; BIASI, L. A. Effect of plant growth regulators on in vitro regeneration of *lavandula dentata* L. Shoot tips. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v. 2 (3) 28-31, 2011.
- MAKUNGA, N. P.; JAGER, A. K.; STADEN, J. V. Otimização de protocolo para a regeneração in vitro de *Thapsia garganica* via organogênese direta - influência de auxinas e citocininas. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** v. 82, p. 271–280, 2005.

MALÁ, J.; MÁCHOVÁ, P.; CVRCKOVÁ, H.; KARADY, M.; NOVÁK, O.; MIKULÍK, J.; HAUSEROVÁ, E.; GREPLOVÁ, J.; STRNAD, M.; DOLEZAL, K. Micropropagation of Wild Service Tree (*Sorbus torminalis*[L.] Crantz): The Regulative Role of Different Aromatic Cytokinins during Organogenesis. **J Plant Growth Regul**, 28:341–348, 2009.

MAREROWICZ, N. Fotossíntese. In: KERBAUY, G. B. Fisiologia Vegetal. 2ª ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p.82–133, 2008.

MEDEIROS, E. C. Aspectos bioquímicos e fisiológicos da palma forrageira *Opuntia stricta* Haw sob distintos sistemas de cultivo in vitro. 88f. Dissertação (Mestrado em Química - Agrobioquímica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2011.

MEHROTRA, S.; GOEL, M. K.; KUKREJA, A. K.; MISHRA, B. N. Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: a progress towards commercialization. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 6, n. 13, p. 1484-1492, 2007.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; BREUSEGEM, F. V. Reactive oxygen gene network of plants. **TRENDS in Plant Science**.v.9 (10): 490-498, 2004.

MOK, D.W.S; MOK, M.C. Cytokinin Metabolism and Action. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 52:89-118, 2001.

MOK, M.C.; MARTIN, R.C.; DOBREV, P.I. VANKOVA´, R.; HO, P.S.; YONEKURA-SAKAKIBARA, K.; SAKAKIBARA, H.; MOK, D.W.S. Topolins and Hydroxylated Thidiazuron Derivatives are Substrates of Cytokinin O-Glucosyltransferase with Position Specificity Related to Receptor Recognition. **Plant Physiology**, v. 137, p. 1057–1066, 2005. www.plantphysiol.org.

MONTILLET, J.; CACAS, J.; GARNIER, L.; MONTANE, M. N.; DOUKI, T.; BESSOULE, J.; POLKOWSKA-KOWALCZYK, L.; MACIEJEWSKA, U.; AGNEL, J.; VIAL, A.; TRIANTAPHYLIDE`S, C. The upstream oxylipin profile of Arabidopsis thaliana: a tool to scan for oxidative stresses. **The Plant Journal** (2004) 40, 439–451.

SOUZA, L. M. Uso de citocininas não convencionais (*meta-topolinas*) no controle de anomalias...

NÓBREGA, G. H.; SILVA, E. M. N.; SOUZA, B. B.; MANGUEIRA, J. M. A produção animal sob a influência do ambiente nas condições do semiárido nordestino. **Revista Verde**. v.6, n.1, p. 67-73, 2011.

OLIVEIRA, F. T.; SOUTO, J. S.; SILVA, R. P.; ANDRADE FILHO, F. C.; PEREIRA JÚNIOR, E. B. Palma forrageira: adaptação e importância para os ecossistemas áridos e semiáridos. **Revista Verde** (Mossoró – RN – Brasil) v.5, n.4, p. 27 – 37. 2010.

OLIVEIRA, J. E. Z.; AMARAL, C. L. F.; CASALI, V. W. D. Caracterização isozimática e atividade de peroxidase em folhas de plantas hiperídrica, intermediária e normal de *bidens pilosa* L. mantidas *in vitro*. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 32, n. 1, p. 32-36, 2008.

PHAN, C.T. Vitreous state in vitro culture: ethylene versus cytokinin. **Plant Cell Rep.**, v.9, p.517–519, 1991.

RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical Interventions in Aging**. v.2(2), 2007.

RAMAGE, C.M.; WILLIAMS, R.R. Cytokinin-induced abnormal shoot organogenesis is associated with elevated Knotted1-type homeobox gene expression in tobacco. **Plant Cell Reports** (2004) v. 22 p.919–924, 2004.

RIDESA – Rede Interuniversitária para o desenvolvimento do setor sucroalcooleiro. Acesso: 28/10/2011. Disponível em: <http://www.ridesa.com.br>.

SÁENZ, L.; AZPEITIA, A.; OROPEZA, C.; JONES, L. H.; FUCHSOVA, K.; SPICHAL, L.; STRNAD, M. Endogenous cytokinins in cocos nucifera. In vitro cultures obtained from plumular explants. **Plant Cell Rep.** 29:1227–1234, 2010.

SILVA, C. C. F.; SANTOS, L. C. Palma Forrageira (*Opuntia Ficus- Indica* Mill) como alternativa na alimentação de ruminantes. **Red vet** vol. VII, Nº 10, 2006.

SOUZA, A. V. .; PINTO, J. B. E. P.; PEREIRA, B.; BERTOLUCCI, S. K. V.; CORRÊA, R. M.; CASTRO, E. M. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de

- SOUZA, L. M. Uso de citocininas não convencionais (*meta-topolinas*) no controle de anomalias... *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciênc. agrotec.**, Lavras. Edição Especial, p.1532-1538. 2003.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática : guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APGIII. 3. ed. Nova Odessa/SP: **Instituto Plantarum**, 2012. 768p.
- STRNAD, M. The aromatic cytokinins. **Physiologia Plantarum**, 101:674-688, 1997.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Citocininas: reguladores da divisão celular. *Fisiologia Vegetal*. **Artmed**, p.493 – 517, 2004.
- União da Indústria da Cana-de-açúcar (**UNICA**). Disponível em: www.unica.br – acesso em: 27/04/2012.
- VALERO-ARACAMA, C.; KANE, M.E.; WILSON, S.B.; PHILMAN, N.L. Substitution of benzyladenine with meta-topolin during shoot multiplication increases acclimatization of difficult- and easy-to-acclimatize sea oats (*Uniola paniculata* L.) genotypes. **Plant Growth Regul.**, v.60, p.43–49, 2010.
- VASCONCELOS, A. G. V.; LIRA, M. A.; CAVALCANTI, V. L. B.; SANTOS, M. V. F.; WILLADINO, L. Seleção de clones de palma forrageira resistentes à cochonilha-do-carmim (*Dactylopius* sp). **R. Bras. Zootec.**, v.38, n.5, p.827-831, 2009.
- VASCONCELOS, A. G. V.; TOMAS, L. F.; CAMARA, T. R.; WILLADINO, L. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42: 837-844, 2012.
- VIDAL, M. F. Produção e área colhida de cana-de-açúcar no Nordeste. Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste - ETENE, (Informe Rural ETENE, 20) Ano 4, 12p. 2010.
- WATT, M. P. The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. **African Journal of Biotechnology** Vol. 11(76): 14025-14035, 2012.

SOUZA, L. M. Uso de citocininas não convencionais (*meta-topolinas*) no controle de anomalias...

WERBROUCK, S. P. O.; VAN DER, J. B.; DEWITTE, W.; PRINSEN, E.; VAN ONCKELEN, H. A.; DEBERGH, P. C. The metabolism of benzyladenine in *Spathiphyllum floribundum* "Schott Petite" in relation to acclimatisation problems. **Plant Cell Rep** v. 14, p. 662–665, 1995.

CAPÍTULO II

META-TOPOLINA: UMA ALTERNATIVA AO USO DO BAP NA MICROPROPAGAÇÃO DA CANA-DE-AÇÚCAR.

Lindomar Maria de Souza¹, Terezinha Rangel Camara²

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Departamento de Agronomia.

²Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Departamento de Química.

Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, 52171-900, Recife, PE – Brasil.

Resumo

A micropropagação de variedades de cana-de-açúcar permite reduzir o tempo e o custo entre o processo de seleção até as mudas serem distribuídas aos agricultores. No experimento foram utilizadas plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), variedade RB98710. Foram inoculadas três plantas em frascos contendo 20 mL de meio MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e diferentes tipos e concentrações de citocininas, 6- Benzilaminopurina (BAP) nas concentrações de 6,66 ou 5 µmol L⁻¹ e 6 - (3-Hidroxybenzylamino) purine (*mT*) na concentração de 5 µmol L⁻¹. O experimento foi conduzido em sala de crescimento a 25±2°C, sob luz branca fria (40 µmol m⁻² s⁻¹) e fotoperíodo de 16 horas durante um período de 40 dias. Foram avaliadas a taxa de multiplicação, matéria fresca e altura das plantas, atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT), mensuração dos níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e malondialdeído (MDA). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três tratamentos e oito repetições. O tratamento com *mT* promoveu a maior taxa de multiplicação e aumento no comprimento de plantas e perfilhos (7,12 cm) em relação aos tratamentos contendo 6,66 e 5 µmol L⁻¹ de BAP (5,25 e 4,37cm respectivamente). O excesso de BAP resultou em redução na biomassa fresca de perfilhos o que pode estar relacionado ao estresse oxidativo confirmado pelos níveis de MDA. A variedade de cana-de-açúcar RB98710 respondeu de forma favorável à adição de *m-T* no meio de multiplicação. O H₂O₂ não atuou como marcador de estresse, mas esteve relacionado com o processo de crescimento.

Abstract

The micropropagation of sugarcane varieties can reduce the time and cost from the selection process until distribution to the farmers. In the experiment sugarcane (*Saccharum* spp.) plants, RB98710 variety were used. Three plants were inoculated in bottles containing 20 mL of MS medium supplemented with 30 g L⁻¹ of saccharose and different kinds and concentrations of cytokinins, 6-benzylaminopurine (BAP) in concentrations of 6,66 or 5 µmol L⁻¹ and 6 - (3-Hidroxybenzylamine) purine (*mT*) in concentration of 5 µmol L⁻¹. The experiment was conducted in a growth room at 25±2°C, under cold white light (40 µmol m⁻² s⁻¹) and photoperiod of 16 hours for a period of 40 days. Analysis were realized for multiplication ratio, fresh matter, height, analysis for enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT), as well as quantification in hydrogen peroxidase (H₂O₂) and malondialdehyde (MDA). The experimental delimitation was completely randomized with three treatments and eight repetitions. The treatment with *mT* provided the highest multiplication rate and increase in plants' and tillers' length (7,12 cm) in comparison to the treatments containing 6,66 and 5 µmol L⁻¹ of BAP (5,25 and 4,37cm respectively). The BAP excess resulted in reduction in tillers' fresh biomass, which may be related to oxidative stress confirmed by MDA levels. The sugarcane variety RB98710 responded positively to *mT* addition in the multiplication medium. The H₂O₂ didn't act as stress marker, but has been related with the growth process.

Introdução

A micropropagação é uma importante técnica da cultura de tecidos que tem como um dos objetivos principais acelerar a propagação de mudas para produção comercial em qualquer época do ano (ALADELE, et al. 2012; ABDU et al. 2012). A utilização da micropropagação para produção comercial de mudas já é realidade no setor agroindustrial da cana-de-açúcar bem como de outras espécies de plantas, que além de proporcionar aumento na produção de mudas, permite a obtenção de plantas geneticamente idênticas à planta inicial (GERALD & LEE 2011).

As citocininas são uma classe de reguladores de crescimento que estão relacionadas a regulação de diversos processos, em especial, com o crescimento de novos brotos por meio da inibição da dominância apical, promovendo dessa forma o surgimento de gemas laterais, (JONES e LJUNG, 2011; CID, 2005).

O tipo e a concentração de citocinina a ser utilizada na micropropagação em diferentes espécies, determinam o sucesso na etapa de multiplicação e aclimatização das mudas (LATA et al. 2013). A efetividade da 6- benzilaminopurine (BAP) na multiplicação *in vitro* tem sido descrito em diferentes espécies de plantas (HAQ et al. 2013; PHULWARIA et al. 2012). Entretanto, a aplicação de altas concentrações de citocininas afim de obter altas taxas de multiplicação limitam a produção devido o alto custo e pela produção de mudas inviáveis à aclimatização (AREMU et al. 2012). A ocorrência de distúrbios morfofisiológicos em plantas micropropagadas têm sido relacionada a reguladores de crescimento, em especial as citocininas, que quando utilizadas em altas concentrações ou por período de exposição prolongado, pode ocasionar o surgimento de anomalias morfofisiológicas (AREMU et al. 2012). Um novo grupo de citocininas aromáticas, *meta*-Topolinas, (*mT*) têm mostrado resultados promissores quanto a redução no índice de anormalidades em plantas micropropagadas (AMOO et al. 2010).

A utilização da micropropagação para produção de mudas de variedades de cana-de-açúcar é uma excelente alternativa para os programas de melhoramento, tendo em vista a redução no tempo entre a obtenção de variedades promissoras e a disponibilidade desse material para os produtores (VIEIRA et al. 2009). A cana-de-açúcar é uma cultura que tem tido destaque na produção industrial na produção de bioetanol e açúcar, sendo responsável por cerca de 80 % da produção mundial de açúcar (SMIULLAH et al. 2013). A variedade de cana-de-açúcar RB98710 apresenta alto teor de sacarose e elevada produção agrícola em diversos estágios de cultivo, tais como baixo teor de fibra e apresenta maturação precoce (RIDESA, 2010).

A presente pesquisa objetivou avaliar o efeito de diferentes tipos e concentrações de citocininas sobre a taxa de multiplicação, sobre o desenvolvimento e qualidade dos brotos em *Saccharum* spp. variedade RB98710.

Material e Métodos

O experimento e as análises bioquímicas foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCVT) na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710 foram obtidas na Biofábrica Governador Miguel Arraes do Centro de Tecnologias estratégicas do Nordeste (CETENE), localizado em Recife/Pernambuco. As plantas foram provenientes do cultivo *in vitro* em biorreatores de imersão temporária (BIT) e estavam sendo cultivadas em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 6,66 μmol L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP), 0,1 g L⁻¹ de inositol, 0,05 g L⁻¹ de ácido cítrico e 0,05 g L⁻¹ de ácido ascórbico. No LCTV as plantas foram cultivadas durante 60 dias em meio MS, suplementado com com 30 g L⁻¹ de sacarose sem adição de regulador de crescimento. Após esse período foram testados diferentes tipos e concentrações de citocininas na multiplicação de cana-de-açúcar variedade RB98710 caracterizando período de multiplicação *in vitro*, o que

SOUZA, L. M. Uso de citocininas não convencionais (*meta*-topolinas) no controle de anomalias... resultou em três tratamentos: 6,66 ou 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BAP ou 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de *mT*. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. As plantas foram inoculadas em frascos de vidro com capacidade para 200 mL, contendo 20 mL de meio líquido indutor de multiplicação. No momento da inoculação com o auxílio de régua e balança analítica de precisão, foram obtidos o comprimento inicial e o peso fresco inicial das plantas.

As plantas foram mantidas em sala de crescimento a $25\pm 2^\circ\text{C}$, sob luz branca fria ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e fotoperíodo de 16 horas durante um período de 40 dias.

As avaliações biométricas foram feitas a partir de uma amostragem de 10 plantas ou perfilhos por meio da frequência dos dados obtidos em cada tratamento.

Para as análises enzimáticas foram utilizados 0,1 g de amostra vegetal, sendo em seguida maceradas em nitrogênio líquido, onde foram adicionados aproximadamente 0,01g de pvpp e em seguida homogeneizadas em 1mL de tampão extrator contendo fosfato de potássio pH 7,0. Posteriormente o macerado foi centrifugado à 10.000 g a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi utilizado como extrato vegetal para as análises bioquímicas. Para a mensuração dos níveis de H_2O_2 e MDA 0,2 g de amostra vegetal foram maceradas em nitrogênio líquido e em seguida foram adicionados aproximadamente 0,02 g de pvpp e 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1%. O material foi homogeneizado e centrifugado a 10.000g a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi utilizado como extrato vegetal para realização das análises de H_2O_2 e MDA.

O teor de proteína solúvel foi realizado pelo método descrito por Bradford (1976). A atividade da SOD foi analisada segundo Giannopolitis e Reis (1977). A atividade da APX foi verificada de acordo com Nakano & Assada (1981). A análise da CAT foi feita de acordo com Havir et al (1987). Os níveis de H_2O_2 foram verificados de acordo com metodologia proposta por Alexieva et al., (2001). A mensuração dos níveis de MDA foi realizada segundo Heath & Packer (1968).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado consistindo em três tratamentos e oito repetições. A unidade experimental consistiu em um frasco contendo três plantas. As análises foram realizadas separadamente em plantas e perfilhos. As variáveis analisadas foram taxa de multiplicação, comprimento, matéria fresca, atividade enzimática de SOD, APX, CAT, mensuração dos níveis de H₂O₂ e MDA. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico ASSISTAT versão 7.6 beta (2012) sendo as médias comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Resultados e discussão

O tratamento com *meta*-topolina (*mT*) promoveu maior taxa de brotação e crescimento das plantas do que os tratamentos com BAP, sem prejuízo da produção de biomassa fresca das plantas (Tabela 1 e Figura 1).

Na micropropagação de sete cultivares de *Pelargonium*, maiores taxas de multiplicação foram obtidas quando os explantes foram submetidos a tratamento com 2 μmol ou 4 μmol L⁻¹ de *mT* quando comparado com concentrações equimolares de BAP (WOJTANIA, 2010).

A menor taxa de multiplicação das plantas de cana-de-açúcar tratadas com BAP pode ter sido decorrente do maior tempo de exposição uma vez que essas plantas foram cultivadas previamente em biorreatores contendo meio nutritivo acrescido de BAP. O efeito inibitório na regeneração *in vitro* causado pelo excesso ou pela prolongada exposição à citocinina já foi relatado em outras culturas (SOUSA & MIRANDA, 2006). A resposta inibitória pode ser causada pelo aumento na atividade da citocinina oxidase que modula os níveis de citocininas nos tecidos vegetais e provoca uma resposta negativa na emissão de brotações (AREMU et al. 2012; CID, 2005).

Estudos visando a multiplicação *in vitro* de *Barleria greenii* mostraram que o aumento na concentração de BAP (5 e 7 μmol L⁻¹) provocou efeito inibitório no desenvolvimento,

SOUZA, L. M. Uso de citocininas não convencionais (*meta*-topolinas) no controle de anomalias... reduzindo o número de brotações adventícias e aumentou a taxa de ocorrência de brotos anormais, em relação aos tratamentos testados (AMOO et al. 2010).

Estudos recentes têm mostrado que o metabolismo das citocininas aplicadas exogenamente pode gerar diferentes metabólitos, alguns dos quais tóxicos. O perfil das citocininas endógenas em tecidos de *Harpagophytum procumbens* cultivados *in vitro* mostrou o acúmulo excessivo de um derivado do BAP, o N⁶-benziladenina-9-glucosídeo (BA9G), um produto de desativação, fitotóxico encontrado nos tecidos necróticos ou tratados com BAP quando comparado àqueles normais ou tratados com *m*-T (BAIRU et al 2011).

As plantas submetidas ao tratamento com *m*T apresentaram 7,1 cm em altura enquanto que nos demais tratamentos essa média foi inferior (4,4 e 1,1 cm para 6,66 e 5 µmol L⁻¹ de BAP respectivamente) (Tabela 1). Resultado similar foi observado com relação à altura dos perfilhos formados em plantas tratadas com *m*T que foram maiores do que os perfilhos das plantas tratadas com BAP.

Os efeitos positivos de *m*-T na multiplicação e no desenvolvimento de plantas cultivadas *in vitro* têm sido relatados por outros autores. Bairu et al. (2008) observaram que *m*T favoreceu a formação de brotos significativamente mais longos quando comparado com concentração equimolar de BAP (1,33 µmol. L⁻¹) na multiplicação *in vitro* de duas cultivares de banana (*Musa* spp.).

O efeito positivo de *m*T na multiplicação e desenvolvimento vegetal pode ser justificado pela rápida degradação do metabólito *meta*-topolin 9 – glucoside (*m*T 9G), enquanto que o BA9G gerado pela metabolização do BAP é degradado mais lentamente, causando efeito tóxico (STRNAD, 1997; VALERO-ARACAMA et al. 2010).

A massa fresca de perfilhos foi menor no tratamento com 6,66 µmol L⁻¹ (Tabela 1). Isso pode estar relacionado com o aumento nos níveis de peroxidação lipídica. O aumento nos níveis de ROS pode estar associado a inibição do crescimento, levando à formação de plantas de qualidade inferior (GUPTA, 2011). As respostas produzidas pelas plantas em relação à

SOUZA, L. M. Uso de citocininas não convencionais (*meta*-topolinas) no controle de anomalias... altura e massa fresca podem estar relacionadas ao estresse que tais concentrações de reguladores podem causar, alterando o equilíbrio das reações de óxido-redução.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi maior nas plantas tratadas com 5 μM de BAP e coincidiu com a mais alta concentração de H_2O_2 em relação aos demais tratamentos, que não diferiam entre si. A SOD é a enzima responsável pela dismutação do superóxido formando H_2O_2 , que logo é metabolizado por peroxidases, como a APX, e pela CAT (KARUPPANAPANDIAN et al 2011), apesar do elevado teor de H_2O_2 nas plantas tratadas com 5 μM de BAP, a atividade das enzimas APX e CAT não diferiu das plantas dos tratamentos com concentração equimolar de *mT*, que apresentaram a mais baixa atividade de SOD (Tabela 2). Esses resultados mostram que, embora tenha havido uma baixa produção de H_2O_2 pela SOD nas plantas tratadas com *mT*, o sistema enzimático antioxidativo atuou, por meio da APX e da CAT, evitando o acúmulo dessa ROS. Os perfilhos das plantas submetidas ao tratamento com *mT* também apresentaram a menor atividade de SOD e a atividade da CAT foi superior a daqueles formados nos demais tratamentos (Tabela 3).

A análise de correlação entre as variáveis dependentes analisadas no trabalho mostram que, nos perfilhos, a atividade da SOD e o teor de H_2O_2 apresentaram uma correlação negativa altamente significativa ($r = -0,7783^{**}$), demonstrando que a dismutação do radical superóxido ($\cdot\text{O}_2$) não é a principal fonte de H_2O_2 nos perfilhos das plantas cultivadas em meio com *mT*. A geração de H_2O_2 pela SOD ocorre pelo excesso de energia nas cadeias transportadoras de elétrons em cloroplastos e mitocôndrias que geram o $\cdot\text{O}_2$ e, simultaneamente, uma rede de agentes antioxidantes atua para evitar o acúmulo dessa ROS (PETROV e BREUSEGEM, 2012).

O teor de H_2O_2 nos perfilhos apresentou correlação positiva altamente significativa ($0,7763^{**}$) com a altura. A ativa produção de H_2O_2 no apoplasto, catalizada pelas oxidases dependente de NADPH (PETROV & BREUSEGEM, 2012) e peroxidases da parede celular (NEILL et al 2002), é um pré-requisito para o desenvolvimento e o crescimento normal das

SOUZA, L. M. Uso de citocininas não convencionais (*meta*-topolinas) no controle de anomalias... plantas (PETROV & BREUSEGEM, 2012). A origem apoplástica do H₂O₂ pode explicar o maior teor dessa ROS nos perfilhos formados em meio de cultura com *mT*, os quais apresentaram maior altura do que os perfilhos dos tratamentos com BAP.

Quando quantidades relativamente grandes de H₂O₂ são gerados no apoplasto, que tem limitada capacidade antioxidante, a molécula de H₂O₂ é metabolizada dentro da célula (NEILL et al 2002), o que pode explicar, em parte, o aumento da atividade da CAT nos perfilhos de plantas tratadas com *mT*.

No que se refere à peroxidação lipídica, representada pela concentração de MDA, os valores mais altos foram encontrados nas plantas cultivadas com *mT* do que nos tratamentos com BAP. A peroxidação dos lipídios de membrana ocorre mediante dois tipos de reação não enzimática: iniciadas por radicais livres (FRs) de elevado potencial redox, como os radicais hidroxila ([•]OH) ou radicais orgânicos tipo oxil e peroxil; ou iniciadas por reações resultantes da ação do oxigênio singlete ¹O₂. Já foi demonstrado que em folhas o ¹O₂ é o principal responsável pela peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados, constituintes dos lipídios de membrana (TRANTAPHYLIDÈS et al. 2008). Nos perfilhos, confirmou-se que a peroxidação não foi resultado direto do acúmulo de H₂O₂, haja vista que no tratamento com *mT* a concentração de MDA foi a mais baixa a despeito dos perfilhos exibirem o maior teor de H₂O₂, em relação aos demais tratamentos. Durante muitos anos o H₂O₂ era visto apenas como uma ROS capaz de causar danos a proteínas, lipídios, ácidos nucléicos (BIENERT et al. 2006) e a estruturas supramoleculares (PETROV & BREUSEGEM, 2012). Na última década, entretanto, demonstrou-se que o H₂O₂ pode atuar como uma molécula sinalizadora, envolvida em uma infinidade de funções fisiológicas (MITLLER et al 2011).

Conclusão

A variedade de cana de cana-de-açúcar RB98710 respondeu de forma favorável à adição de *mT*. O H₂O₂ não atuou como um marcador de estresse, mas, esteve relacionado com o processo de crescimento comprovado através de um conjunto de análises bioquímicas que

forneceu informações suficientes para comprovar a relação dessa ROS com o crescimento e desenvolvimento vegetal.

Tabela 1 – Avaliações em plantas e perfilhos quanto à matéria fresca, altura e número de perfilhos por planta na variedade RB98710 de cana-de-açúcar, cultivadas *in vitro* com diferentes tipos e concentrações de citocininas, durante 40 dias.

Concentração/tipo de citocinina ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Matéria fresca (g)		Altura de planta (cm)		Nº de perfilhos/planta
	Planta	Perfilho	Planta	Perfilho	
BAP / 6,66	0,30 a	0,04 c	4,43 b	5,25 b	1,08 b
BAP / 5	0,27 a	0,10 a	1,15 c	4,37 c	1,33 b
<i>mT</i> / 5	0,35 a	0,07 b	7,12 a	6,31 a	2,00 a

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Tabela 2 - Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) e teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e malondialdeído (MDA) em plantas de cana-de-açúcar, variedade RB98710 cultivadas *in vitro* com diferentes tipos e concentrações de citocininas, durante 40 dias.

Concentração/tipo de citocinina ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	SOD (U SOD g^{-1} MF)	APX ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg proteína}/\text{min}^{-1}$)	CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg proteína}/\text{min}^{-1}$)	H_2O_2 (nmol/gMF)	MDA (nmol/gMF)
BAP / 6,66	21.541,75 b	6.721,5 a	79,75 b	6,75 b	2,87 b
BAP / 5	36.238,00 a	5.179,5 b	158,75 a	7,52 a	3,30 b
<i>mT</i> / 5	11.291,00 c	5.495,2 b	135,00 a	6,90 b	4,05 a

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Tabela 3 - Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) e teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e malondialdeído (MDA) em perfilhos de plantas de cana-de-açúcar, variedade RB98710, cultivadas *in vitro* com diferentes tipos e concentrações de citocininas, durante 40 dias.

Concentração/tipo de citocinina ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	SOD (U SOD g^{-1} MF)	APX ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg proteína}/\text{min}^{-1}$)	CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg proteína}/\text{min}^{-1}$)	H_2O_2 (nmol/gMF)	MDA (nmol/gMF)
BAP / 6,66	38.801,75 b	7.459,25 a	73,75 b	6,85 b	2,95 a
BAP / 5	75.232,75 a	4.565,25 b	90,00 b	6,50 b	1,45 b
<i>mT</i> / 5	12.229,75 c	4.821,25 b	128,5 a	8,075 a	1,40 b

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.



Figura 1. Plantas e perfilhos de cana-de-açúcar variedade RB98710 cultivadas *in vitro* com diferentes concentrações de citocininas, durante 40 dias.

Referências

ALADELE, S. E.; OKERE, A.U.; JAMALDINNE, E.; LYAM, P.T. ; FAJIMI, O.; ADEGEYE, A.; ZAYAS, C.M. 2012. The Science of Plant Tissue Culture as a Catalyst for Agricultural and Industrial Development in an Emerging Economy. p.41-62.

ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I., MAPELLI, S., KARANOV, E. 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. - Plant, Cell and Environment. v. 24:1337-1344.

AMOO, S. O.; FINNIE, J. F.; STADEN, J. 2010. The role of meta-topolins in alleviating micropropagation problems. Plant Growth Regulation. v. 63 (2) : 197–206.

BAIRU, M. W.; NOVÁK, O.; DOLEZAL, K.; STADEN, J. V. 2011. Changes in endogenous cytokinin profiles in micropropagated *Harpagophytum procumbens* in relation to shoot-tip necrosis and cytokinin treatments. Plant Growth Regul. v.63:105–114.

.BAIRU, M.W.; STIRK, W.A.; DOLEZAL, K.; VAN STADEN, J. 2007. Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin? Plant Cell Tiss Organ Cult, v.90:15–23.

BAIRU, M.W.; STIRK, W.A.; DOLEZAL, K.; VAN STADEN, J. 2008. The role of topolins in micropropagation and somaclonal variation of banana cultivars ‘Williams’ and ‘Grand Naine’ (*Musa* spp. AAA). Plant Cell Tiss Organ Cult, v.95, p. 373–379.

BIENERT, G. P.; SCHJOERRING, J. K.; JAHN, T. P. 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. Biochimica et Biophysica Acta. 1758 :994–1003.

BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. V. 72:248-254.

CHRISTIAN TRIANTAPHYLIDÉS, C.; KRISCHKE, M.; HOEBERICHTS, F. A.; KSAS, B.; GRESSER, G.; HAVAUX, M.; BREUSEGEM, F. V.; MUELLER, M. J. 2008. Singlet Oxygen Is the Major Reactive Oxygen Species Involved in Photooxidative Damage to Plants 1[W]. Plant Physiology. vol. 148:960–968.

CID, L. P. B. 2005. Citocininas em plantas superiores: Síntese e propriedades fisiológicas. p. 58-79. In: CID, L. P. B. Hormônios vegetais em plantas superiores. Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brasil.

ESCALONA, M.; CEJAS, I.; GONZÁLEZ-OLMEDO, J.; CAPOTE, I.; ROELS, S.; CAÑAL, M. J.; RODRÍGUEZ, R.; SANDOVAL, J.; DEBERGH, P. 2003. The effect of meta-topolin on plantain propagation using a temporary immersion bioreactor. **InfoMusa**. v. 12 (2) 28-30.

GERALD, L. T. S.; LEE, L. L. 2011. Biofábrica de Plantas: Por Que Biorreator?. In: Biofábrica de Plantas: Produção industrial de plantas *in vitro*. 1 ed. Antiqua

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. 1977. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, v. 59(2) : 309-314.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, A. M. 1998. Micropropagação.p. 183-260. *In*: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia , Brasília, Brasil.

GUPTA, S. D. 2010. Role of free radicals and antioxidants in *in vitro* morphogenes. p. 229-247. *In*: Gupta, S. Dutta. *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*. Science Publishers, Enfield, USA.

HAVIR, E. A. MCHALE, N. A. 1987. Biochemical and development characterization of multiples forms of catalase in Tobacco-leaves. *Plant Physiology*. v. 84:450 – 455.

HEATH, R. L.; PACKER L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. - *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125:189-198.

JONES, B.; LJUNG, K. 2011. Auxin and cytokinin regulate each other's levels via a metabolic feedback loop. *Plant Signaling & Behavior*. v.6 (6) 901-904.

KARUPPANAPANDIAN, T.; MOON, J.; KIM, C.; MANOHARAN, K.; KIM, W. 2011. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging Mechanisms. *Australian Journal of Crop Science*. 5 (6) : 709-725.

LATA, H.; CHANDRA, S.; WANG, Y.; RAMAN, V.; KHAN, I. A. 2013. TDZ-Induced High Frequency Plant Regeneration through Direct Shoot Organogenesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni: An Important Medicinal Plant and a Natural Sweetener. *American Journal of Plant Sciences*. v. 4: 117-128.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; SUZUKI, N.; MILLER, G.; TOGNETTI, V. B.; VANDEPOELE, K.; GOLLERY, M.; SHULAEV, V.; VAN BREUSEGEM, F. 2011. ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science* 16: 300 – 309

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, p. 473-497.

NAKANO, Y.; ASADA, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*. v. 22:1068-1072.

NEILL, S.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. Hydrogen peroxide signaling. Elsevier Science. v. 5:388–395

PETROV, V. D.; BREUSEGEM, F. V. 2012. Hydrogen peroxide—a central hub for information flow in plant cells. *AoB PLANTS*. pls. 014: 1-13.

PHULWARIA, M.; RAI, M. K.; PATEL, A. K.; KATARIA, V.; SHEKHAWAT, N. S. 2012. A genetically stable rooting protocol for propagating a threatened medicinal plant—*Celastrus paniculatus*. *AoB PLANTS* 5: pls054.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. 2012. Assistat 7.6 beta. DEAG-CTRN-UFCG, Campina Grande.

SMIULLAH; KHAN, F. A.; AFZAL, A.; ABDULLAH; JAVED, A.; IQBAL, Z.; IJAZ, U.; IFTIKHAR, R. 2013. In vitro micro-propagation and comparative responses of different accessions of *Saccharum officinarum* L. to callogenesis and organogenesis. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*.v. 5(1):1-6.

SOUZA, C. M.; MIRANDA, R. M. 2006. Otimização do balanço entre auxina e citocinina para Multiplicação in vitro de gerbera jamesonii var. 'ornela'. *Agronomia*. v. 40 (1):66 – 72.

VIEIRA, R. A.; SILVA, C. M.; SOUTO, E. R.; HATA, F. T.; MACHADO, M. F. P. S.; MARCUZ, F. S. 2009. Diferentes concentrações de 6- Benzilaminopurina e cinetina na Micropropagação in vitro das variedades Rb867515 e rb855156 de cana-de-açúcar. *Campo Digital*. v.4 (1) :122-126.

WULFETANGE, K.; LOMIN, S. N.; ROMANOV, G. A. ; STOLZ, A.; HEYL, A.; SCHMULLING, T. 2011. The cytokinin receptors of *Arabidopsis* are located mainly to the endoplasmic reticulum 1[W][OA]. *Plant Physiology*. Vol. 156, pp. 1808–1818.

CAPÍTULO III

USO DE CITOCININA NÃO CONVENCIONAL NA MICROPROPAÇÃO DA PALMA FORRAGEIRA *Opuntia stricta* Haw.

Lindomar Maria de Souza¹, Terezinha Rangel Camara²

Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Departamento de Agronomia.

Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Departamento de Química.

Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, 52171-900, Recife, PE – Brasil.

Resumo

A palma forrageira (*Opuntia stricta* Haw) é uma importante alternativa utilizada na alimentação de ruminantes em períodos de estiagem prolongados. Brotações de palma forrageira cultivar Orelha de Elefante Mexicana cultivadas *in vitro* foram obtidas na Biofábrica Governador Miguel Arraes do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) e foram utilizadas como fonte de explantes no experimento. Foram inoculados dois explantes em potes contendo 20 mL de meio MS líquido ou sólido suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e diferentes tipo e concentrações de citocininas, 2,22 ou 1,11 µmol L⁻¹ de 6-Benzilaminopurina (BAP) ou 1,11 µmol L⁻¹ 6 - (3-Hidroxybenzilamino) purine (*mT*). Os potes contendo os explantes permaneceram em sala de crescimento a 25±2°C, sob luz branca fria (40 µmol m⁻² s⁻¹), e fotoperíodo de 16 horas durante um período de 45 dias. Foi avaliada a taxa de multiplicação, índices de formação de brotos, enraizamento e formação de calos, valores de biomassa fresca, altura, atividade enzimática da ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT), mensuração dos níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e malondialdeído (MDA). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado consistindo em seis tratamentos e doze repetições. A consistência do meio exerceu influência sobre o desenvolvimento de brotações e na emissão de raízes. Foi observado que o aumento nas concentrações de BAP resultou em redução no comprimento e biomassa fresca dos brotos além de sistema radicular pouco desenvolvido. Houve ocorrência de hiperidricidade em brotações provenientes do meio sólido, no entanto no tratamento com *mT* esse distúrbio foi menos frequente e as plantas apresentaram aspecto saudável. As brotações hiperídricas apresentaram coloração púrpura, principalmente nas podárias. A atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidativo e o conteúdo de H₂O₂ e MDA apontaram para maior estresse nas brotações provenientes do cultivo com BAP.

Abstract

The cactus pear (*Opuntia stricta* Haw) is an important alternative used in ruminants' feeding in long drought periods. Cactus pear buddings from variety Orelha de Elefante Mexicana grown in vitro were obtained in the Biofábrica Governador Miguel Arraes do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) and were used in the experiment. Two propagative segments were inoculated in a bottle containing 20 mL of MS medium in liquid or solid supplemented with 30 g L⁻¹ of saccharose and various kinds and concentrations of cytokinins, 2,22 or 1,11 µmol L⁻¹ of 6-benzylaminopurine (BAP) or 1,11 µmol L⁻¹ 6 - (3-Hidroxybenzylamine) purine (*mT*). The bottles remained in growth room at 25±2°C, under white cold light (40 µmol m⁻² s⁻¹), and photoperiod of 16 hours during a period of 45 days. Analysis were realized for multiplication ratio, bud formation index, calluses' rooting and formation, fresh matter values, height, enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT), as well as quantification in hydrogen peroxidase (H₂O₂) and malondialdehyde (MDA). The experimental delimitation was completely randomized with six treatments and twelve repetitions. The medium's consistency influenced the buddings' development and root's emission. It was observed that the increase in BAP concentrations resulted in reduction of buds' length and fresh biomass aside from a poorly developed root system. There was hyperhydricity occurrence in buddings from the solid medium; however, in the *mT* treatment this occurrence was less frequent and the plants displayed healthy appearance. The hyperhydric buddings displayed a purple coloring, primarily in the podaries. The activity of the enzymes of the antioxidative defense system and the contents of the H₂O₂ and MDA points to higher stress in buddings from cultivation with BAP.

Introdução

A micropropagação é uma importante técnica para produção de plantas de interesse em larga escala e em curto período de tempo, onde a qualidade do material é um fator essencial (JAIN et al. 2012; SAKTHI e MOHAN, 2012).

As citocininas são um grupo de reguladores vegetais utilizados na micropropagação de plantas e desempenham importante papel na regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal por induzir a divisão celular e regular os processos de emissão de novos brotos (ANATH, B. D. 2012; CHENG et al. 2013; HEYL et al. 2012). O tipo e a concentração de citocininas utilizados no meio de cultivo são de grande importância para a regeneração e multiplicação durante a micropropagação (AREMU, et al. 2012). Muitos sistemas de micropropagação utilizam a citocinina BAP devido esta ser mais eficiente e economicamente mais viável (BAIRU et al. 2007; WERBROUCK et al. 1995), contudo vários distúrbios morfofisiológicos tais como a hiperidricidade, têm sido atribuídos ao uso desse regulador.

A hiperidricidade é caracterizada como sendo o estado fisiológico em que a planta apresenta acúmulo anormal de água no interior das células ou tecidos, o que resulta em aspecto translúcido (VASCONCELOS et al. 2012).

A descoberta de um novo grupo de citocininas aromáticas vem sendo estudada como alternativa ao uso do BAP a fim de reduzir distúrbios fisiológicos causados pelo uso excessivo ou prolongado de BAP (AREMU, et al. 2012; AMOO, et al. 2010; BAIRU et al. 2009). A palma forrageira (*Opuntia strict* Haw) é uma forragem de extrema importância para a região do semiárido brasileiro pelo fato de ser resistente à períodos de seca prolongado, sendo uma alternativa para produtores de animais nas épocas de seca prolongada.

Este trabalho teve como objetivos avaliar o efeito de diferentes tipo e concentrações de citocininas sobre a taxa de multiplicação e ocorrência de hiperidricidade em *Opuntia stricta* Haw.

Material e Métodos

O experimento e as análises bioquímicas foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCVT) na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Brotos de palma forrageira cv. Orelha de Elefante Mexicana foram obtidos na Biofábrica Governador Miguel Arraes do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), em Recife, Pernambuco. Brotações de palma forrageira, no 2º sub cultivo, provenientes de sistema estático em meio sólido cultivadas em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 0,5 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurine (BAP) e 0,1 mg L⁻¹ de Ácido 3 - indolacético (AIA), foram transferidas para meio MS sólido sem adição de BAP onde foram cultivadas durante 60 dias. Seguimentos de aproximadamente 1,5 cm foram obtidos após a excisão na região apical e radicular de brotos de palma, os quais foram utilizados como explante.

Os meios de cultivo para a indução da multiplicação foram compostos pelo meio MS líquido ou sólido suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 2,22 ou 1,11 µmol L⁻¹ de BAP + 0,57 µmol L⁻¹ de AIA ou 1,11 µmol L⁻¹ de *mT* + 0,57 µmol L⁻¹ de AIA. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem para meio líquido e antes da adição do ágar para o meio sólido.

Foram inoculados dois explantes por pote, contendo 20 mL de meio de multiplicação. No momento da inoculação com o auxílio de uma balança analítica de precisão foi obtido o peso fresco inicial dos explantes para posterior obtenção da biomassa fresca dos brotos. Os potes foram mantidos em sala de crescimento a 25±2°C, sob luz branca fria (40 µmol m⁻² s⁻¹), e fotoperíodo de 16 horas durante um período de 45 dias.

As análises enzimáticas foram realizadas utilizando 0,1 g de amostra vegetal por repetição as quais foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em tampão extrator contendo fosfato de potássio pH 7,0, centrifugadas à 14.000 g a 4° C por 10 minutos.

O sobrenadante foi utilizado como extrato vegetal para as análises. Na mensuração dos níveis de H₂O₂ e MDA foram utilizados 0,2 g de amostra vegetal por repetição, sendo maceradas em nitrogênio líquido, em seguida foram adicionados aproximadamente 0,02 g de pvpp e 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1%. O material foi homogeneizado e centrifugado a 14.000g a 4° C por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado como extrato vegetal para realização das análises.

O teor de proteína solúvel nos extratos vegetais foi realizado pelo método descrito por Bradford (1976). A atividade da APX foi analisada de acordo com Nakano e Assada (1981). A análise da CAT foi de acordo com proposto por Havir et al. (1987). Os níveis de H₂O₂ foram verificados de acordo com metodologia proposta por Alexieva et al. (2001). A mensuração dos níveis de MDA foi realizada segundo Heath e Packer (1968).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado consistindo em seis tratamentos e doze repetições. A unidade experimental foi de um frasco contendo dois explantes. As variáveis analisadas foram taxa de multiplicação, comprimento, biomassa fresca, atividade enzimática de APX e CAT, mensuração dos níveis de H₂O₂ e MDA. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico ASSISTAT 7.6 beta (2012) sendo as médias comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As variáveis não paramétricas foram avaliadas pelo Teste Exato de Fisher utilizando doze repetições.

Resultados e discussão

Os tratamentos com diferentes tipo e concentração de citocininas aplicados na micropropagação da palma forrageira não diferiram entre si quanto ao efeito sobre a taxa de multiplicação em meio sólido. Os brotos formados em meio com *m*-T, entretanto, tinham maior biomassa fresca e maior comprimento (2,3 cm) do que aqueles formados nos

SOUZA, L. M. Uso de citocininas não convencionais (*meta-topolinas*) no controle de anomalias... tratamentos com BAP (Tabela 1). Os resultados de matéria fresca apresentaram correlação positiva significativa (0,5950*) com a altura dos brotos (Tabela 1).

Nos tratamentos com BAP, o tamanho dos brotos foi inversamente proporcional à concentração da citocinina e a biomassa fresca também tendeu a diminuir no tratamento com a concentração de 2,22 μM de BAP (Tabela 2). Erig et al. (2002) também observaram redução na altura de brotos de *Rubus idaeus* L. e a redução de matéria fresca em decorrência do aumento nas concentrações de BAP já foi descrita por Ramage e Williams (2004).

A escolha da citocinina a ser utilizada na micropropagação de plantas é determinada por sua eficiência na indução da multiplicação, formação de brotos saudáveis e enraizamento, que favoreçam a aclimatização das mudas (BAIRU et al. 2007). O aumento no comprimento de brotos cultivados em meio contendo *m-T* já foi descrito por outros autores (BAIRU et al. 2008; ESCALONA, et al. 2003).

No presente trabalho foi observado que a mais elevada concentração de BAP ocasionou inibição do enraizamento das brotações. Em todos os tratamentos, a maioria das raízes formaram-se dos explantes, entretanto, nos tratamento contendo *mT* verificou-se a formação de raízes nas brotações mais desenvolvidas (Figura 1). O efeito tóxico do BAP nas plantas pode ser decorrente do acúmulo e da lenta liberação para outras partes da planta ocasionando inibição do crescimento e do enraizamento (BAIRU et al. 2007; WERBROUCK et al. 1995). Outra hipótese para a inibição do enraizamento em plantas cultivadas em presença de BAP é o aumento nos níveis do metabólito estável 6-benzil-amino-9-b-D-glucopiranosilpurine (BAP9G) cujo acúmulo pode ocasionar inibição no crescimento de raízes e provocar problemas na aclimatização de plantas (AMOO et al 2010; MALÁ et al. 2009). Estudos tem demonstrado a eficácia da *m-T* em promover o enraizamento e favorecer a taxa de aclimatização de plantas ao ambiente *ex vitro* (AREMU et al. 2012; VALERO - ARACAMA et al. 2010). Quando as taxas de alongamento e enraizamento são satisfatórias, é possível

SOUZA, L. M. Uso de citocininas não convencionais (*meta-topolinas*) no controle de anomalias... dispensar a etapa de alongamento antes da aclimatização ao ambiente *ex vitro* (CSABAI et al. 2011).

Em todos os tratamentos foi observada a ocorrência de explantes que não brotaram e que apresentaram podárias deformadas. Muitas podárias caíram durante o período de multiplicação e no local surgiram calos principalmente nos tratamentos em meio líquido (Tabela 3).

A consistência do meio exerceu influência sobre o desenvolvimento de brotações e na emissão de raízes, de acordo com o teste de Fisher aplicado para avaliações não paramétricas. Os explantes cultivados no meio líquido em presença de *m-T* apresentaram formação de brotos, mesmo que em número reduzido quando comparado com meio sólido (Tabela 3). Em todos os tratamentos tanto em meio líquido quanto no meio sólido foi observada a ocorrência de explantes com hiperidricidade e com início de formação de calo, sendo que nos explantes cultivados em meio líquido esses eventos ocorreram com maior frequência (Tabela 3).

Apesar das muitas vantagens apontadas para o emprego de meio líquido na micropropagação de plantas (KÄMÄRÄINEN-KARPPINEN et al. 2010; PATI et al. 2011) vários trabalhos têm registrado maior frequência de hiperidricidade em materiais vegetais cultivados *in vitro* em meio líquido (TASCAN et al. 2010). Entre os fatores que favorecem a formação de brotos hiperídricos destaca-se a alta umidade e a elevada concentração de reguladores de crescimento (ZIV, 2005). Plantas cultivadas em sistema líquido estático estão mais propensas a desenvolver hiperidricidade visto que ficam imersas no meio de cultivo (ADELBERG et al. 2012), e esta condição dificulta as trocas gasosas, podendo ser fatal às células vegetais (JACKSON, 2003).

Os explantes cultivados em meio líquido com BAP tornaram-se hiperídricos e recalcitrantes. O excesso de citocinina pode favorecer a ocorrência de hiperidricidade principalmente em cultivo com meio líquido em presença de BAP (CRUZ et al. 2009). No meio sólido com BAP, embora tenham surgido muitas brotações a frequência de

SOUZA, L. M. Uso de citocininas não convencionais (*meta-topolinas*) no controle de anomalias... hiperidricidade foi muito alta. No meio com *mT* a hiperidricidade foi menos frequente e as brotações tinham aspecto saudável (Figura 1). Na micropropagação de *Telekia speciosa* com 5 μ M de BAP ou *mT* registrou-se, respectivamente, 50% e 5% de hiperidricidade nos brotos formados (CSABAI et al. 2011).

Amoo et al. (2010) relatam os efeitos de diferentes tipos e concentrações de citocininas na micropropagação de *Barleria greenii* e enfatizam a natureza menos tóxica de *m-T* em relação a concentrações equimolares de BAP, apontando sua superioridade em produzir maior número de brotações com redução ou ausência total de anormalidades. Outros autores também observaram inibição na formação de brotos e maior índice de brotos anormais com o aumento na concentração de BAP, enquanto que os tratamentos contendo *m-T*, mesmo em concentrações elevadas, tiveram índices de anormalidade inferior. Essas pesquisas sugerem que a diferença estrutural entre BAP e *m-T* pode ter profundo impacto em plantas micropropagadas (BAIRU et al. 2007).

A ocorrência de características anormais em brotações cultivadas em *m-T* no presente trabalho pode ter sido consequência de efeitos de transição entre BAP e *m-T* (AMOO, et al. 2010), visto que os explantes foram retirados de plantas que haviam sido expostas ao BAP. A hiperidricidade é afetada pela fonte e pela concentração de citocinina, mas a frequência com que o fenômeno ocorre está relacionada à espécie micropropagada (KADOTA e NIIMI, 2003).

As brotações hiperídricas apresentaram intensa coloração púrpura, principalmente nas podárias. Um grupo de pigmentos não fotossintéticos, as betalaínas, se subdivide em betacianinas (pigmentos roxo-violeta) e betaxantinas (pigmentos amarelos) (SORIANO-SANTOS et al. 2007). A beterraba vermelha (*Beta vulgaris*) e o gênero *Opuntia* são as principais fontes desses pigmentos que são usados como corantes naturais (GEORGIEV et al. 2008). Além disso, as betalaínas têm atraído interesse adicional por causa de suas propriedades antioxidantes e recentemente tem sido explorada a viabilidade técnica e

SOUZA, L. M. Uso de citocininas não convencionais (*meta*-topolinas) no controle de anomalias... comercial de vários sistemas *in vitro* para produção comercial desses pigmentos. (GEORGIEV et al. 2008; PAVOKOVI e KRSNIK-RASOL, 2011). Os trabalhos indicam a ação dos reguladores de crescimento sobre a produção de betacianinas. De acordo com Pavokovi e Krsnik-Rasol (2011), o BAP é um dos componentes do meio de cultura que favorece a produção de betacianinas. Os resultados apresentados neste trabalho corroboram com a hipótese de que o BAP favorece a síntese de betacianinas.

Alguns pesquisadores afirmam que as betacianinas podem atuar no sequestro de ROS, evitando seu acúmulo e protegendo os tecidos das plantas dos danos causados pelas ROS (SEPÚLVEDA-JIMÉNEZ et al. 2004). A maior intensidade de coloração típica das betacianinas nas brotações e explantes de palma hiperídricos, nos tratamentos com BAP, parece indicar a condição de estresse a que esse material estava exposto.

O estresse oxidativo caracteriza-se pelo desequilíbrio entre a geração de ROS e a ação do sistema antioxidante. A atividade da CAT não diferiu entre os tratamentos e a da APX foi menor no tratamento com 1,11 μM de BAP. Por outro lado, os maiores teores de H_2O_2 e de MDA (Tabela 4), que traduz a ocorrência de peroxidação lipídica, coincidiram com a maior incidência de hiperidricidade e possível presença de betacianina nos tratamentos com BAP, em especial na dose mais alta (2,22 μM).

O conteúdo de MDA tem servido como parâmetro na avaliação do nível de danos causados por estresse em algumas espécies ou cultivares (GÜLEN et al. 2008; RUBIO-WILHELMI et al. 2011; WANG e HANH, 2003). Essa avaliação permite determinar o nível de dano aos lipídios da membrana celular e de membranas subcelulares. As principais consequências da peroxidação lipídica às células são a diminuição da fluidez, redução da seletividade membranar, danos a proteínas de membrana, inativação de receptores, enzimas e canais iônicos. Plantas expostas a estresses exibem um aumento nos níveis de peroxidação lipídica devido à geração de ROS (GIL e TUTEJA, 2010).

A recalitrância dos explantes hiperídricos corrobora com a ideia de que as ROS podem ser uma possível ligação entre o estresse oxidativo e a regeneração de plantas em cultura de tecidos (GUPTA e DATTA 2003/4). A correlação do fenômeno com o acúmulo de ROS já foi demonstrada por outros autores e as pesquisas sugerem a existência de um estresse oxidativo atrelado à condição de hiperidricidade. A hiperidricidade compromete a qualidade e prejudica a aclimação das plantas micropropagadas. Na micropropagação comercial, cerca de 60% das plantas podem apresentar sintomas de hiperidricidade (WU et al. 2009).

De acordo com Amoo et al. (2010), a maioria dos problemas na micropropagação para produção em larga escala, tais como baixa taxa de multiplicação, anormalidades morfológicas, enraizamento inadequado podem ser minimizados utilizando o tipo e a concentração adequada de regulador de crescimento, em especial as citocininas.

Conclusão

Os resultados deste trabalho apontam para o uso da *mT* na micropropagação da palma forrageira em meio MS sólido. O teor de MDA e a ocorrência de hiperidricidade com o surgimento de uma coloração que remete à presença de betalaínas são indicativos de estresse que pode acarretar em recalitrância do material vegetal.

Tabela 1 – Número de brotações por explante, altura e matéria fresca de brotos de palma forrageira (*Opuntia stricta* Haw) cultivadas *in vitro* com diferentes tipos e concentrações de citocininas, durante 45 dias.

Concentração/tipo de citocinina ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Nº de brotos/explante	Altura dos brotos (cm)	Matéria fresca dos brotos (g)
BAP / 2,22	14 a	1,0 c	0,35 b
BAP / 1,11	12,875 a	1,4 b	0,50 ab
<i>mT</i> / 1,11	10,625 a	2,267 a	0,525 a

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Tabela 2 – Índices de formação de brotos (IFB), formação de calo (IFC), enraizamento (IE) e hiperidricidade (IH) em brotos palma forrageira (*Opuntia stricta* Haw) cultivadas *in vitro* em meio líquido ou sólido com diferentes tipos e concentrações de citocininas, durante 45 dias.

Concentração/tipo de citocinina ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	IFB	IFC	IE	IH
BAP / 2,22	0	1	0	1
BAP / 1,11	0	1	0	1
<i>mT</i> / 1,11	0,58	0,42	0,58	1
Meio sólido				
BAP / 2,22	0,66	0,42	0,33	1
BAP / 1,11	0,91	0,083	0,91	1
<i>mT</i> / 1,11	0,91	0,25	0,83	1

Tabela 3 - Atividade das enzimas ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) e teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e malondialdeído (MDA) brotos de palma forrageira (*Opuntia stricta* Haw) cultivadas *in vitro* em meio líquido ou sólido com diferentes tipos e concentrações de citocininas, durante 45 dias.

Concentração/tipo de citocinina ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	APX $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg}$ proteína/ min^{-1}	CAT $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg}$ proteína/ min^{-1}	H_2O_2 (nmol/gMF)	MDA (nmol/gMF)
BAP / 2,22	5.901,0 a	160,25 a	4,75 a	2,9 a
BAP / 1,11	4.246,0 b	150,00 a	3,30 b	1,2 b
<i>mT</i> / 1,11	5.359,5 a	150,50 a	3,97 ab	1,725 b

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.



Figura 1. Aspectos de hiperidricidade em brotos de palma forrageira (*Opuntia stricta* Haw) cultivadas *in vitro* com diferentes tipos e concentrações de citocininas, durante 45 dias. (a) brotos cultivados em meio líquido; (b) brotos cultivados em meio sólido.

Referências

ADELBERG, J.; NAYLOR-ADELBERG, J. 2012. Effects of cytokinin on multiplication and rooting of *Aloe barbadensis* during micropropagation on agar and liquid medium. *Journal of Medicinally Active Plants*.v1: 1-5.

ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I., MAPELLI, S., KARANOV, E. 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. - *Plant, Cell and Environment*. v. 24:1337-1344.

AMOO, S. O.; FINNIE, J. F.; STADEN, J. 2010. The role of meta-topolins in alleviating micropropagation problems.. *Plant Growth Regulation*. v. 63: 197–206.

ANATH, B. D. 2012. Plant tissue culture techniques for global food production. *Science horizon*. v. 2: 35-41.

AREMU, A. O.; BAIRU, M. W.; DOLEZAL, K.; FINNIE, J. F.; STADEN, J. V. 2012. Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges? *Plant Cell Tiss Organ Cult*. v.108:1–16.

BAIRU, M. W.; JAIN, N.; STIRK, W.A.; DOLEŽAL, K.; STADEN, J. VAN. 2009. Solving the problem of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens* by changing the cytokinin types, calcium and boron concentrations in the medium. *South African Journal of Botany* v.75: 122–127.

BAIRU, M.W.; STIRK, W.A.; DOLEZAL, K.; VAN STADEN, J. 2007. Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin? *Plant Cell Tiss Organ Cult*. v.90: 15–23.

BAIRU, M.W.; STIRK, W.A.; DOLEZAL, K.; VAN STADEN, J. 2008. The role of topolins in micropropagation and somaclonal variation of banana cultivars ‘Williams’ and ‘Grand Naine’ (*Musa* spp. AAA). *Plant Cell Tiss Organ Cult*. v.95:373–379.

BARTOSZ, G. Oxidative stress in plants. 1997. *Acta physiologia e plantarum*. vol. 19. n.1:47-64.

BATKOVÁ, P.; POSPÍŠILOVÁ, J.; SYNKOVÁ, H. 2008. Production of reactive oxygen species and development of antioxidative systems during in vitro growth and ex vitro transfer. *Biologia plantarum* 52 (3): 413-422.

BELL, E.; TAKEDA, S.; DOLAN, L. 2009. Reactive Oxygen Species in Growth and Development. *In*: DEL RÍO, A.; PUPPO, A. *Reactive Oxygen Species in Plant Signaling*. Springer. 43-54.

BHATTACHARJEE, S. 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current science*, vol. 89 (7) : 1113- 1121.

BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. V. 72:248-254.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. 1998. Meios nutritivos. *Inp.* 87-132. *In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília, DF: EMBRAPA/CNPq, v. 2.*

CHENG, Z. J.; WANG, L.; SUN, W.; ZHANG, Y.; ZHOU, C.; SU, Y. H.; LI, W.; SUN, T. T.; ZHAO, X. Y.; LI, X. G.; CHENG, Y.; ZHAO, Y.; XIE, Q.; ZHANG, X. S. 2013. Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by auxin response factor31[w][oa]. *Plant Physiology*. vol. 161:240–251.

CRUZ, M. A. L.; SILVA, A. D. C.; VEIGA, C. F. M.; SILVEIRA, V. 2009. Biofábricas para produção de mudas por micropropagação: estratégia para o aumento da produtividade de cana-de-açúcar no rio de janeiro. *Revista Científica Internacional* ano 2 - N° 05.

CSABAI, J.; NAGY, Z.; MÁNDY, A. T. 2011. *In vitro* shoot proliferation of telekia speciosa (schreb.) Baumg. Induced by different cytokinins. *Acta biologica hungarica*. v. 62(4) :453–462.

ERIG, A. C.; ROSSI, A.; FORTES, G. R. L. 2002. 6-benzilaminopurina e ácido indolbutírico na multiplicação *in vitro* da amoreira – preta (*Rubus idaeus* L.), cv. tupy. *Ciência Rural, Santa Maria*. v.32 :765-770.

ESCALONA, M.; CEJAS, I.; GONZÁLEZ-OLMEDO, J.; CAPOTE, I.; ROELS, S.; CAÑAL, M. J.; RODRÍGUEZ, R.; SANDOVAL, J.; DEBERGH, P. 2003. The effect of meta-topolin on plantain propagation using a temporary immersion bioreactor. *Info Musa - Vol. 12:28-30*.

GEORGIEV, V.; ILIEVA, M.; BLEY, T.; PAVLOV, A. 2008. Betalain production in plant in vitro systems. *Acta Physiol Plant*. v.30:581–593

GILL, S. S.; TUTEJA, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. v. 48:909 – 930.

GÜLEN, H.; ÇETINKAYA, C.; KADIOĞLU, M.; KESICI, M.; CANSEV, A.; ERIŞ, A.E. 2008. Peroxidase Activity and Lipid Peroxidation in Strawberry (*Fragaria X ananassa*) Plants Under Low Temperature *J. Biol. Environ. Sci.*v. 2(6), 95-100.

HAVIR, E. A. MCHALE, N. A. 1987. Biochemical and development characterization of multiples forms of catalase in Tobacco-leaves. *Plant Physiology*. v. 84:450 – 455.

HAZARIKA, B. N. 2006. Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. *Scientia Horticulturae* v. 108: 105–120.

HEATH, R. L.; PACKER L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. - *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125:189-198.

HEYL, A.; RIEFLER, M.; ROMANOV, G. A.; SCHMULLING, T. 2012. Properties, functions and evolution of cytokinin receptors. *European Journal of Cell Biology* 91: 246–256.

J.

JAIN, M.; JOHNSON, T. S.; KRISHNAN, P. 2012. Biotechnological approaches to conserve the wealth of nature: endangered and rare medicinal plant species, a review. *Journal of Natural Remedies*. vol. 94 12/2: 93-102.

KADOTA, M. e NIIMI, Y. 2003. Effects of cytokinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity in vitro pear cultivar shoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72:261–265.

KÄMÄRÄINEN-KARPPINEN, T.; VIRTANEN, E.; ROKKA, V. M.; PIRTTILÄ, A. M. 2010. Novel bioreactor technology for mass propagation of potato microtubers. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. v.101:245–249.

KIM, Y. H.; KWAK, S. S. 2011. The Role of Antioxidant Enzymes during Leaf Development. In: Gupta, S. Dutta. *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*. 129-149 Science Publishers.

JACKSON, M. B. 2003. Aeration stress in plant tissue cultures. *Bulg. J. Plant physiol. Special Issue*: 96–109.

MALÁ, J.; MÁCHOVÁ, P.; CVRCKOVÁ, H.; KARADY, M.; NOVÁK, O.; MIKULÍK, J.; HAUSEROVÁ, E.; GREPLOVÁ, J.; STRNAD, M.; DOLEZAL, K. 2009. Micropropagation of Wild Service Tree (*Sorbus torminalis* [L.] Crantz): The Regulative Role of Different Aromatic Cytokinins During Organogenesis. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 28, n. 4, p. 341–348

NAKANO, Y.; ASADA, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*. v. 22:1068-1072.

PATI, P. K.; • JASPREET KAUR• PRITIKA SINGH. 2011. A liquid culture system for shoot proliferation and analysis of pharmaceutically active constituents of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. v.105:299–307.

PAVOKOVI, D. E KRSNIK-RASOL, M. 2011. Complex Biochemistry and Biotechnological Production of Betalains. *Biotechnological Production of Betalains, Food Technol. Biotechnol.* v.49 (2) 145–155.

PEREIRA, F. J.; MAGALHÃES, P. C.; SOUZA, T. C.; CASTRO, E. M.; ALVES, J. D. 2010. Atividade do sistema antioxidante e desenvolvimento de aerênquima em raízes de milho 'Saracura'. *Pesq. agropec. bras.* v.45(5):450-456.

RAJESWARI, V.; PALIWAL, K. 2008. Peroxidase and catalase changes during in vitro adventitious shoot organogenesis from hypocotyls of *Albizia odoratissima* L.f. (Benth) *Acta Physiol Plant*. v. 30:825–832.

RAMAGE, C. M.; WILLIAMS, R. R. 2004. Cytokinin-induced abnormal shoot organogenesis is associated with elevated Knotted1-type homeobox gene expression in tobacco. *Plant Cell Rep*. v. 22:919–924.

RUBIO-WILHELMI, M. M.; SANCHEZ-RODRIGUEZ, E.; ROSALES, M. A.; BEGOÑA, B.; RIOS, J. J.; ROMERO, L.; BLUMWALD, E.; RUIZ, J. M. 2011. Effect of cytokinins on oxidative stress in tobacco plant under nitrogen deficiency. *Environmental and Experimental Botany*.

SAKTHI, R.; MOHAN, N. 2012. Micropropagation and plant regeneration from leaf and node explants of *Scoparia dulcis*. *J. Acad. Indus. Res.* vol. 1(3): 144-147.

SEPÚLVEDA-JIMÉNEZ, G.; RUEDA-BENÍTEZ, P.; PORTA, H.; ROCHA-SOSA, M. 2005. A red beet (*Beta vulgaris*) UDP-glucosyltransferase gene induced by wounding, bacterial infiltration and oxidative stress. *Journal of experimental botany*. vol. 56 (412) : 605–611.

SORIANO-SANTOS, J.; FRANCO-ZAVALA, M.E.; PELAYO-ZALDÍVAR, C.; ARMELLA-VILLALPANDO, M.A.; YÁÑEZ-LÓPEZ, M.L.; GUERRERO-LEGARRETA, I. 2007. Caracterización parcial del pigmento rojo del fruto de la “jiotilla” (*escholzia chiotilla* [weber] britton e rose). *Revista Mexicana de ingeniería química*. v. 6, n.1, p. 19-25.

VALERO-ARACAMA, C.; KANE, M.E.; WILSON, S.B.; PHILMAN, N.L. 2010. Substitution of benzyladenine with meta-topolin during shoot multiplication increases acclimatization of difficult- and easy-to-acclimatize sea oats (*Uniola paniculata* L.) genotypes. *Plant Growth Regul.* v.60:43–49.

VASCONCELOS, A. G. V.; TOMAS, L. F.; CAMARA, T. R.; WILLADINO, L. 2012. Hiperhidricidade: uma desordem metabólica. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.42: 837-844.

TASCAN, A.; ADELBERG, J.; TASCAN, M.; RIMANDO, A.; JOSHEE, N.; YADAV, A. K. 2010. Hyperhydricity and flavonoid content of *scutellaria* species in vitro on polyester-supported liquid culture systems. *Hortscience*. v.45(11):1723–1728.

WANG, Z.; POTE, J.; HUANG, B. 2003. Responses of cytokinins, antioxidant enzymes, and lipid peroxidation in shoots of creeping bentgrass to high root-zone temperatures. *Amer. Soc. Hort. Sci.* v.128 (5): 648-655

WERBROUCK, S. P. O.; VAN DER, J. B.; DEWITTE, W.; PRINSEN, E.; VAN ONCKELEN, H. A.; DEBERGH, P. C. 1995. The metabolism of benzyladenine in *Spathiphyllum floribundum* “Schott Petite” in relation to acclimatization problems. *Plant Cell Reports*. v. 14: 662–665.

WU, Z.; CHEN, L. J.; LONG, Y. J. 2009. Analysis of ultrastructure and reactive oxygen species of hyperhydric garlic (*Allium sativum* L.) shoots. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*. v. 45:483–490.

ZAVALA-MANCERA, H. A.; LÓPEZ-DELGADO, H.; LOZA-TAVERA, H.; MORA-HERRERA, M.; TREVILLA-GARCÍA, C.; VARGAS-SUÁREZ, M.; OUGHAM, H. 2007. Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence. *Journal of Plant Physiology*.v.164: 1572—1582.

ZIV, M. 2005. Simple bioreactors for mass propagation of plants, p. 79–95. In: Hvoslef-Edie, A.K. and W. Preil (eds.). *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

ANEXO

INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO DE ARTIGO A REVISTA
SCIENTIA AGRICOLA

Objetivos e política editorial

Scientia Agricola é uma publicação da Universidade de São Paulo, Campus "Luiz de Queiroz", Piracicaba, uma cidade situada na região sudeste do Brasil no estado de São Paulo. *Scientia Agricola* tem por objetivo publicar artigos originais que contribuam para o desenvolvimento científico das Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas.

A revista possui amplo espectro, abrangendo Produção Vegetal, Produção Animal, Engenharia Agrícola, Tecnologia Agroindustrial, Ciências Florestais e aplicações da ciência básica nas Ciências Agrárias, Ambientais, do Solo e Biológicas.

Três tipos de manuscritos podem ser submetidos: artigos de pesquisa originais, revisões e avanços técnicos. Submissões de avanços técnicos devem ter um impacto amplo na comunidade científica e não serem restritos a poucos laboratórios.

Artigos originais, revisões ou avanços técnicos são agrupados por assunto nas seguintes categorias: Engenharia Agrícola; Microbiologia Agrícola; Agrometeorologia; Ciência Animal e Pastagens; Biometria, Modelagem e Estatística; Fitotecnia; Ecologia; Entomologia; Ciência e Tecnologia de Alimentos; Ciência Florestal; Genética e Melhoramento de Plantas; Fitopatologia; Fisiologia Vegetal e Bioquímica; Solos e Nutrição de Plantas; Zoologia.

Encontra-se indexada no Current Contents®/Agriculture, Biology, and Environmental Sciences, Science Citation Index Expanded (SciSearch®), CAB Abstracts, SciELO, AGRIS, AGROBASE, Chemical Abstracts, INIS, e Tropag & Rural.

Artigos originais avaliados pela Comissão Editorial podem ser submetidos para avaliação por revisores especialistas no tema ou rejeitados sem revisão pelos pares.

Instruções gerais

SUBMISSÃO DO MANUSCRITO

- Comece a submissão revendo na íntegra as Instruções aos Autores para garantir que o artigo esteja de acordo com as normas da *Scientia Agricola*. Estas páginas são atualizadas periodicamente, portanto, recomenda-se fortemente que o autor leia as normas antes da submissão, mesmo que já tenha feito isso anteriormente.
- Os autores devem submeter os manuscritos pelo sistema eletrônico, acessando o site <http://www.scielo.br/sa>, clicando em "submissão online".
- Manuscritos deverão ser organizados em MS Word para Windows ou software compatível. Evite o uso de recursos de processamento de texto automatizados, tais como listas e numeração, cabeça e formatação subtítulo, links internos, ou estilos.

- Palavras-chave só deverão ser adicionadas nos casos em que os autores acreditem que uma palavra que não está no título ou no resumo ajudaria na indexação do manuscrito.

PREPARAÇÃO DO MANUSCRITO

- Texto e ilustrações dos originais submetidos à apreciação pelo corpo editorial devem ser escritos em língua inglesa, segundo as regras de ortografia e gramática norte-americana.
- Manuscritos devem ser organizados em um arquivo denominado documento principal e em arquivos separados contendo tabelas e figuras. MS Word ou software compatível, fonte Times New Roman 12, 3.0 cm de margens e duplo espaço devem ser utilizados para preparar o documento principal. Organize o documento principal na seguinte ordem: Página de rosto, Resumo (máximo de 250 palavras), Introdução (normalmente 20-30 linhas), Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos (opcional), Referências, e Legendas das Figuras.
- O item Conclusão é opcional e, quando utilizado deverá vir após a seção de discussão. O item Resultados e Discussão podem ser combinados e, a conclusão pode ser incorporada à discussão.
- O manuscrito deve ter um máximo de 30 páginas (papel A4); linhas e páginas devem ser numeradas sequencialmente, ilustrações e tabelas inclusive.
- Tabelas e Figuras devem ser carregadas no sistema em arquivos separados, somente uma tabela ou figura por arquivo.

Página de rosto:

- O manuscrito deve ter uma página de rosto com o título (máximo de 15 palavras), nomes dos autores e afiliações completas.
- Deverá ser fornecido um título abreviado de 40 caracteres ou menos (além do título do trabalho completo).
- Os autores devem selecionar uma categoria: Engenharia Agrícola; Microbiologia Agrícola; Agrometeorologia; Ciência Animal e Pastagens; Biometria, Modelagem e Estatística; Fitotecnia; Ecologia; Entomologia; Ciência e Tecnologia de Alimentos; Ciências Florestais; Genética e Melhoramento de Plantas; Fitopatologia; Fisiologia Vegetal e Bioquímica; Solos e Nutrição de Plantas; Zoologia.
- O autor correspondente deve ser identificado (a) por um asterisco e um endereço eletrônico institucional do autor(a) correspondente deve ser informado.
- A afiliação/endereço funcional dos autores (as) deve ser informado da maneira mais detalhada possível.

- O autor correspondente deverá assumir a responsabilidade plena e igualitária para o manuscrito, incluindo o cumprimento das políticas do periódico, e será o contato prioritário com a revista.
- Por favor, forneça afiliação institucional de cada autor no momento que a pesquisa foi realizada.
- Se um autor se mudou para uma instituição diferente, o novo local pode ser indicado em nota de rodapé. Números sobrescritos separados por vírgulas (sem espaços) são utilizados para filiações dos autores. Símbolos sobrescritos separados por vírgulas (sem espaços) são utilizados para notas de rodapé do autor. Use na ordem §, ¶, §§, ¶¶.

Tabelas e Figuras

Tabelas:

- Devem ser numeradas sequencialmente com algarismos arábicos, e geradas com a ferramenta "Tabela" do MS Word ou MS Excel (manuscritos contendo tabelas coladas como figuras serão devolvidos aos autores).
- Os títulos devem aparecer imediatamente acima do corpo das tabelas.
- Numere figuras e gráficos sequencialmente usando algarismos arábicos.

Figuras/Gráficos:

- Gráficos devem ser gerados em MS Excel.
- Fotografias devem ser apresentadas como arquivo "tagged image format [TIFF]", 300 DPI.
- Numere figuras e gráficos sequencialmente segundo a ordem em que aparecem no texto.
- As figuras devem fornecer informações suficientes para que o leitor possa compreendê-las sem uma contribuição significativa do texto.
- Para as figuras que contêm mais de um painel, designar os painéis com letras maiúsculas (sem parênteses e sem pontos após as letras) no canto superior esquerdo de cada painel, se possível.
- As palavras utilizadas nas figuras devem ser iguais as utilizadas no manuscrito no que diz respeito a capitalização, itálico e símbolos.

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

- Manuscritos envolvendo avaliação da bioatividade de produtos químicos e/ou biológicos, incluindo reguladores do crescimento, em insetos, ácaros, fungos, bactérias, nematóides e plantas daninhas, não serão objeto de análise para publicação na *Scientia Agricola*.
- Manuscritos que reportarem a avaliação de melhorias ou protocolos de cultura de tecidos baseados no teste de aditivos, explantes ou condições de crescimento, ou ainda que falhem em mostrar uma melhoria substancial que não poderia ser deduzida da literatura existente, não serão considerados para publicação na *Scientia Agricola*.

- Os manuscritos devem obedecer aos critérios estabelecidos nos Códigos Internacionais de cada área.
- Os conceitos e opiniões contidos nos artigos são de exclusiva responsabilidade dos (as) autores(as).

Referências Bibliográficas

As referências e citações para artigos da *Scientia Agricola* serão organizadas utilizando o estilo de formato mínimo 'autor, ano' ou 'nome (ano)'. Checar se todas as citações no texto constam da lista de referências bibliográficas. Os exemplos:

1. Apenas um autor: Reichardt (2000) ou (Reichardt, 2000).
2. Dois autores: Fiorio and Demattê (2009) ou (Fiorio and Demattê, 2009).
3. Três ou mais autores: Rosso et al. (2009) ou (Rosso et al., 2009).
4. Organizar as referências em ordem alfabética e cronologicamente dentro de parênteses, e use (;) ponto e vírgula para separar citações múltiplas dentro de parênteses, por exemplo: (Boleli, 2003; Boerjan, 2006; Muraroli and Mendes, 2003).
5. Identificar múltiplas citações 'mesmo autor, mesma data' com a ajuda de letras minúsculas, por exemplo: (Cyrino, 2004a, b).
6. Usar o estilo "autor-ano" para ordenar a lista de referências, e: (i) abreviar os primeiros e segundos nomes dos autores, mas nenhuma outra palavra; (ii) usar letras maiúsculas para todos os acrônimos, isto é, quando o autor for uma organização; (iii) utilizar letras maiúsculas para a 1ª letra do sobrenome e demais iniciais dos autores, que deverão ser separados por um ponto (.); (iv) separar autores por ponto-e-vírgula; (v) não usar "e comercial" (&) nas citações, nem na lista de referência; (vi) não usar caracteres grifados ou negritados para destacar qualquer parte da referência; (vii) usar letras maiúsculas na 1ª letra dos títulos de livros e de periódicos; (viii) não usar vírgula (,) para separar o título do periódico e o volume; (ix) separar os números de volume do periódico das páginas por dois pontos (:); (x) usar os números completos das páginas; (xi) separar os números de página por um traço (-); (xii) separar os grupos de páginas por uma vírgula se o artigo foi publicado em páginas descontínuas; (xiii) discriminar o número da edição de um livro ou manual como "2ed", por exemplo; (xiv) sobre livros e manuais, nomear os editores ou a editora antes de discriminar a localidade sede dos editores ou da editora; (xv) separar os editores ou a editora da localidade por meio de uma vírgula (,); e (xvi) nestes casos, declarar os nomes da cidade, do estado e do país.

6.1 Revistas/Periódicos Científicos

Guillard, R.R.L.; Wangersky, P. 1958. The production of extracellular carbohydrates by some marine flagellates. *Limnology and Oceanography* 3: 449-454.

6.2 Livros

6.2.1 Livros com autores

Pais, I.; Jones Jr., J.R. 1998. *The Handbook of Trace Elements*. St. Lucie Press, Boca Ratón, FL, USA.

6.2.2 Livros com editores /organizadores

Day, W.; Atkin, R.K., eds. 1985. *Wheat Growth and Modelling*. Plenum Press, New York, NY, USA.

6.2.3 Livros (e manuais) com organização/instituição como autor ou editora/organizadora

Association of Official Analytical Chemists - International [AOAC]. 2005. *Official Methods of Analysis*. 18ed. AOAC, Gaithersburg, MD, USA.

6.3 Capítulo de Livro

Sharpley, A.N.; Rekolainen, S. 1997. Phosphorus in agriculture and its environmental implications. p. 1-53. *In*: Tunney, H.; Carton, O.T.; Brookes, P.C.; Johnston, A.E., eds. *Phosphorus loss from soil to water*. CAB International, New York, NY, USA.

6.4 Fontes eletrônicas

6.4.1 Elementos necessários para listar citações de sites da rede mundial de computadores:

A autoria, autor ou fonte. Ano. O título do documento da web ou página da web (isto é, título principal da página). [meio] (data de atualização). Disponível em: endereço completo para localizar o recurso (URL / endereço) [Accessed Sep. 19, 1992]

6.4.2 Elementos necessários para listar publicações disponíveis na rede mundial de computadores:

A autoria, autor ou fonte. Ano. O título do documento ou página da web. [meio] Produtor/Editor. Disponível em: endereço completo para localizar o recurso [Accessed Sep. 19, 1992]

6.5 Listagem de referências não escritas em inglês

A *Scientia Agricola* não incentiva os autores a usarem referências que não podem ser facilmente acessadas e compreensíveis por leitores do exterior. No entanto, se essas referências forem essenciais para interpretação dos resultados, relatados no texto, forneça o título em inglês, informando adicionalmente a linguagem do artigo original no final da referência, como exemplificado a seguir:

Baretta, D.; Santos, J.C.P.; Figueiredo, S.R.; Klauberg-Filho, O. 2005. Effects of native pasture burning and Pinus monoculture on changes in soil biological attributes on the Southern Plateau - Brazil of Santa Catarina *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 29: 715-724 (in Portuguese, with abstract in English).