

EMMANUEL CABRAL MEDEIROS

ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DA PALMA FORRAGEIRA *Opuntia stricta*
Haw SOB DISTINTOS SISTEMAS DE CULTIVO IN VITRO

RECIFE

FEVEREIRO/2011

EMMANUEL CABRAL MEDEIROS

ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DA PALMA FORRAGEIRA *Opuntia stricta*
Haw SOB DISTINTOS SISTEMAS DE CULTIVO IN VITRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ), na área de Química e linha de pesquisa em Agrobioquímica da Universidade Federal Rural de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Dra. Terezinha Rangel Camara

Co-orientadora: Dra. Cláudia Ulisses

RECIFE

FEVEREIRO/2011

Ficha Catalográfica

M488a Medeiros, Emmanuel Cabral
Aspectos bioquímicos e fisiológicos da palma forrageira
Opuntia stricta Haw sob distintos sistemas de cultivo in vitro /
Emmanuel Cabral Medeiros. -- 2011.
80 f. : il.

Orientadora: Terezinha Rangel Camara.
Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Química,
Recife, 2011.

Inclui anexo e referências.

1. Morfogênese 2. Estresse oxidativo 3. Biorreator
4. Hiperidricidade I. Camara, Terezinha Rangel, Orientadora
II. Título

CDD 574.192

ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DA PALMA FORRAGEIRA *Opuntia stricta*
Haw SOB DISTINTOS SISTEMAS DE CULTIVO IN VITRO

Por: Emmanuel Cabral Medeiros

Esta dissertação foi julgada para a obtenção do título de **Mestre em Química** e aprovada em
16/02/2011 pelo Programa de Pós-Graduação em Química, em sua forma final.

ORIENTADORA:

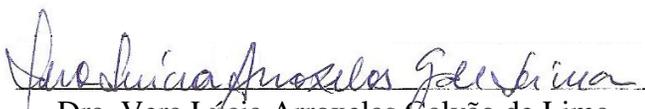


Dra. Terezinha Rangel Camara
Professora do Departamento de Química – UFRPE

EXAMINADORES:



Dra. Lilia Gomes Willadino
Professora do Departamento de Biologia – UFRPE



Dra. Vera Lúcia Arroxelas Galvão de Lima
Professora do Departamento de Ciências Domésticas – UFRPE



Dra. Josabete Salgueiro Bezerra Carvalho
Professora do Departamento de Agronomia – UAG/UFRPE

RECIFE
FEVEREIRO/2011

DEDICO.....

.....A TODOS OS QUE ME FORTALECERAM DURANTE ESTA
CAMINHADA.

AGRADECIMENTOS

A DEUS em primeiro lugar, sempre;

A minha família, sem ela não seria nada;

Aos amigos que sempre me apoiaram, em suas diferentes formas;

Aos professores e, em especial, à minha professora e mãe científica da UFRPE;

A todos os que fazem ou fizeram parte do CETENE;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de recursos financeiros indispensáveis à realização deste trabalho de pesquisa.

Em fim, a todos aqueles implícitos acima, que fiz questão de não citar os nomes, pois não queria cometer a indelicadeza do esquecimento de nenhum destes que me ensinaram grande parte do que sei e me fizeram ser a pessoa que sou hoje.

Um muito obrigado de coração.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Semiárido brasileiro: realidades e desafios.....	15
2.2 Palma forrageira: aspectos gerais.....	17
2.3 Cultura de tecidos vegetais.....	20
2.4 Cultivo estático <i>x</i> sistema de imersão temporária.....	22
2.5 Estresse oxidativo.....	24
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
MANUSCRITO: ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DA PALMA FORRAGEIRA <i>Opuntia stricta</i> Haw SOB DISTINTOS SISTEMAS DE CULTIVO IN VITRO.....	38
RESUMO.....	40
ABSTRACT.....	40
INTRODUÇÃO.....	41
MATERIAL E MÉTODOS.....	42
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
CONCLUSÕES.....	60
PERPECTIVAS FUTURAS.....	60
AGRADECIMENTOS.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
ANEXO: INTRUÇÕES PARA OS AUTORES SUBMETEREM MANUSCRITOS NO JORNAL PLANT CELL, TISSUE & ORGAN CULTURE.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AB - Altura de brotos
AIB – Ácido indolbutírico
ANA – Ácido naftalenoacético
APX - Peroxidase do ascorbato
BAP - 6-benzilaminopurina
BIT - Biorreator de Imersão Temporária
CAT - Catalase
EL – Sistema estático líquido
ERO - Espécies Reativas de Oxigênio
ES – Sistema estático sólido
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
HO*⁻ - Radical hidroxila
MFB - Massa fresca de brotos
MFR - Massa fresca de raiz
MS – Murashige e Skoog
NB - Número de brotos
O₂*⁻ - Radical superóxido
PB – Proteína bruta
POD - Peroxidase
PPO - Polifenoloxidase
SA - Sistemas de imersão temporária de alta frequência
SB - Sistemas de imersão temporária de baixa frequência
SIT - Sistema de Imersão Temporária
SOD - Superóxidodismutase
UB - Umidade dos brotos

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Fig 1. Esquema de reação da formação da betanidina por tirosina via Dopa. 1A - tirosinase hisroxilase (TOH); 1B – Dopa oxidase (DO); 2 – Dopa 4,5-dioxigenase. Fonte: Steiner et al 1999..... 27

MANUSCRITO

Fig 1. Palma forrageira (*Opuntia stricta* Haw cv. Orelha de Elefante Mexicana) submetida a distintos sistemas de cultivo in vitro. Plantas matrizes mantidas em telado (A); cladódios jovens com destaque de algumas aréolas (quadros negros) (B); brotos, provenientes das aréolas, 30 dias após introdução in vitro em meio de estabelecimento semi-sólido (C); explantes submetidos a sistemas estáticos líquido (D) e semi-sólido (E) e em sistema de imersão temporária (F)..... 42

Fig 2. Número médio de brotos (NB) formados na multiplicação in vitro de *Opuntia stricta* Haw cv Orelha de Elefante Mexicana em meio MS em sistema de imersão temporária de baixa (SB) e alta (SA) frequência e em sistema estático em meio sólido (ES) e líquido (EL), sob distintas concentrações de BAP. Equação referente ao polinômio da média..... 46

Fig 3. Altura média de brotos (AB) formados na multiplicação in vitro de *Opuntia stricta* Haw cv Orelha de Elefante Mexicana em meio MS em sistema de imersão temporária de baixa (SB) e alta (SA) frequência e em sistema estático em meio sólido (ES) e líquido (EL), sob distintas concentrações de BAP. Equação referente ao polinômio da média..... 48

Fig 4. Massa fresca média por broto (MFB) formado na multiplicação in vitro de *Opuntia stricta* Haw cv Orelha de Elefante Mexicana em meio MS em sistema de imersão temporária de baixa (SB) e alta (SA) frequência e em sistema estático em meio sólido (ES) e líquido (EL), sob distintas concentrações de BAP. Equação referente ao polinômio da média..... 49

Fig 5. Massa fresca de raízes (MFR) formadas na multiplicação in vitro de *Opuntia stricta* Haw cv Orelha de Elefante Mexicana em meio MS em sistema de imersão temporária de baixa (SB) e alta (SA) frequência e em sistema estático em meio sólido (ES) e líquido (EL), sob distintas concentrações de BAP. Equação referente ao polinômio da média..... 50

Fig 6. Formação de raízes em brotos de <i>Opuntia stricta</i> Haw cv. Orelha de Elefante Mexicana regenerados a partir de gemas axilares pré-existentes em explantes cultivados em sistemas de imersão temporária (A, B) e estáticos (C – meio líquido; D – meio sólido) aos 15 dias após o início do cultivo em meio MS sem BAP.....	50
Fig 7. Teor de umidade de brotos (UB) formados na multiplicação in vitro de <i>Opuntia stricta</i> Haw cv Orelha de Elefante Mexicana em meio MS em sistema de imersão temporária de baixa (SB) e alta (SA) frequência e em sistema estático em meio sólido (ES) e líquido (EL), sob distintas concentrações de BAP. Equação referente ao polinômio da média.....	51
Fig 8. Micropropagação da palma forrageira <i>Opuntia stricta</i> Haw cv. Orelha de Elefante Mexicana: aspecto visual de brotações, após 90 dias de cultivo, submetidas a diferentes sistemas de cultivo e concentrações de BAP no meio.....	53
Fig 9. Betacianinas: separação de fases entre as betacianinas (coloração violeta) hidrossolúveis e os pigmentos lipossolúveis (A); testes para comprovação da presença de betacianinas com a descoloração da cor padrão no teste 1 e alteração na coloração para o amarelo no teste 2 (B); no teste 3, com o detalhe da estrutura geral da betacianina, é possível visualizar o pico no ponto 2, com absorvância de 0,652 no comprimento de onda de 539,50 nm.....	54
Fig 10. Teor de proteínas solúveis (PS) e comportamento das atividades enzimáticas da catalase (CAT), peroxidase (POD), peroxidase do ascorbato (APX) e polifenoloxidase (PPO), na multiplicação in vitro da palma forrageira <i>Opuntia stricta</i> Haw cv Orelha de Elefante Mexicana, com diferentes níveis de BAP no meio de cultura e em sistemas de cultivo de imersões temporárias de baixa (SB) e alta frequência (SA) e estáticos sólidos (ES) e líquidos (EL). Equações referentes aos polinômios das médias.....	57
Fig 11. Micropropagação da palma forrageira <i>Opuntia stricta</i> Haw cv. Orelha de Elefante Mexicana. Tratamentos que proporcionaram brotos com melhores percentuais de sobrevivência (acima de 95%) na aclimatização: SB 0,25 (A), SA 0,0 (B), ES 0,25 (C) e EL 0,0 (D), nas fases de início de cultivo in vitro (1), 90 dias de cultivo (2) e 90 dias da aclimatização (3).....	59

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

- Tabela 1.** Composição dos tratamentos a que foram submetidos os explantes de *Opuntia stricta* Haw cv. Orelha de Elefante Mexicana, quanto ao sistema de cultivo e a concentração de BAP no meio de cultura..... 43
- Tabela 2.** Número médio de brotos (NB) formados na multiplicação in vitro de *Opuntia stricta* Haw cv Orelha de Elefante Mexicana em meio MS em sistema de imersão temporária de baixa (SB) e alta (SA) frequência e em sistema estático em meio sólido (ES) e líquido (EL), sob distintas concentrações de BAP..... 47
- Tabela 3.** Altura (mm) média de brotos (AB) formados na multiplicação in vitro de *Opuntia stricta* Haw cv Orelha de Elefante Mexicana em meio MS em sistema de imersão temporária de baixa (SB) e alta (SA) frequência e em sistema estático em meio sólido (ES) e líquido (EL), sob distintas concentrações de BAP..... 48
- Tabela 4.** Massa fresca média por broto (MFB) formado na multiplicação in vitro de *Opuntia stricta* Haw cv Orelha de Elefante Mexicana em meio MS em sistema de imersão temporária de baixa (SB) e alta (SA) frequência e em sistema estático em meio sólido (ES) e líquido (EL), sob distintas concentrações de BAP..... 49
- Tabela 5.** Massa fresca de raízes (MFR) formadas na multiplicação in vitro de *Opuntia stricta* Haw cv Orelha de Elefante Mexicana em meio MS em sistema de imersão temporária de baixa (SB) e alta (SA) frequência e em sistema estático em meio sólido (ES) e líquido (EL) e distintas concentrações de BAP..... 51
- Tabela 6.** Teor de umidade de brotos (UB) formados na multiplicação in vitro de *Opuntia stricta* Haw cv Orelha de Elefante Mexicana em meio MS em sistema de imersão temporária de baixa (SB) e alta (SA) frequência e em sistema estático em meio sólido (ES) e líquido (EL), sob distintas concentrações de BAP..... 52
- Tabela 7.** Valores médios do teor de proteínas (mg.g^{-1} massa fresca) e das atividades específicas (U.mg^{-1} de proteína) da catalase (CAT), peroxidase (POD), peroxidase do ascorbato (APX) e polifenoloxidase (PPO) em explantes da palma forrageira *Opuntia stricta* Haw cv Orelha de Elefante Mexicana antes da inoculação e aos 90 dias de cultivo em sistemas de cultivo de imersões temporárias de baixa (SB) e alta frequência (SA) e estáticos sólidos (ES) e líquidos (EL) e com diferentes níveis de BAP no meio de cultura.. 56
- Tabela 8.** Percentual de sobrevivência ex vitro, altura e biomassa fresca por muda de palma forrageira *Opuntia stricta* Haw cv. Orelha de Elefante Mexicana micropropagada, 90 dias após a aclimatização..... 58

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Nordeste brasileiro ocupa 1.600.000 km² do território nacional e a área de maior incidência das secas estende-se por 980.000 km²; é o semiárido propriamente dito com 22 milhões de habitantes. Em função das condições ambientais, a pecuária tem se constituído ao longo do tempo em uma das principais atividades econômicas e desempenha um papel importantíssimo no sistema agropecuário da região. Segundo dados do IBGE (2008), o Nordeste apresenta um rebanho de 28.851.880 cabeças de bovinos, 9.378.514 cabeças de ovinos e 8.521.688 cabeças de caprinos, representando, respectivamente, 14,3%, 56,4% e 91% do rebanho brasileiro. Um dos maiores entraves tecnológicos para o êxito da pecuária é a produção de forragens para os rebanhos. O uso de algumas espécies vegetais já adaptadas ao semiárido, certamente pode minimizar a escassez de forragens na estação seca.

Nos últimos anos, a palma forrageira voltou a ser cultivada em larga escala, principalmente nas bacias leiteiras, constituindo-se numa das principais forrageiras para o gado na época seca (Santos et al 2002). Estima-se que o Brasil tem a maior área plantada do mundo, em torno de 500 a 600 mil hectares, com Pernambuco respondendo por cerca de 30% desse total (Ferreira 2005; Santos et al 2006). Nos últimos anos, no entanto, vem ocorrendo o aumento de danos causados por pragas e doenças e ainda são muito escassas as pesquisas para controle, o que resulta em sérios efeitos negativos sobre a produção de forragens. Atualmente, a principal praga é a cochonilha do carmim (*Dactylopius opuntia*), um pequeno inseto parasita, específico das espécies de cactáceas *Opuntia* spp. e *Nopalea* (Flores-Flores e Tekelenburg 2001). Uma área estimada de 150 mil hectares já está infestada e presume-se que a alternativa para combater o problema na região Nordeste seja a utilização de novas espécies ou cultivares resistentes (Pimienta-Barrios e Muñoz-Urías 2001).

Neste cenário, a cultivar Orelha de Elefante Mexicana (*Opuntia stricta* Haw.) tem se destacado como resistente e produtiva e vem sendo plantada em alguns estados do Nordeste do Brasil pelos agricultores (Santos et al 2002; Lopes 2007). Esse cultivar teve sua resistência evidenciada por institutos de pesquisa dos estados da Paraíba (EMEPA) e de Pernambuco (IPA e UFRPE), mas o maior entrave para adotar essa alternativa, mais eficiente e ecologicamente correta do que a utilização de agroquímicos, reside na limitada disponibilidade de material de cultivo, pois para plantio comercial em espaçamento adensado, são necessárias 40.000 mudas por hectare e o sistema convencional de propagação da palma é lento, dificultando também o

lançamento de novas cultivares (Vasconcelos et al 2007). Por essas razões, técnicas de cultura de tecidos vegetais *in vitro* têm sido aplicadas com êxito em várias espécies de opuntias (Frota et al 2004), para obtenção de um sistema eficiente de multiplicação da palma forrageira.

A utilização de biorreatores, por exemplo, é uma técnica da micropropagação que tem trazido grandes vantagens em culturas como cana-de-açúcar, bananeira e abacaxizeiro em relação à micropropagação convencional (Lemos 2009a). O emprego de biorreatores em substituição a outros tipos de frascos de cultura é uma alternativa que permite, principalmente, reduzir o custo das mudas *in vitro* e acelerar a produção. Neste sentido, a utilização de mão de obra é bem menor com o sistema de imersão temporária (SIT), pois para a mesma quantidade de plantas são necessários, aproximadamente, 25 vezes mais frascos para inoculação no sistema convencional. Além do que no SIT, os multibrotos resultantes ao final da fase de multiplicação não precisam ser subdivididos antes de serem transferidos para a fase de alongamento/enraizamento, resultando em economia de mão de obra, que no sistema convencional chega a 70% do custo de produção da muda (Teixeira 2006). Além disso, o SIT possibilita que uma maior superfície dos tecidos vegetais tenha contato com o meio de cultura, potencializando seu crescimento e desenvolvimento e uma vez que o contato não é permanente, reduz o problema freqüente de hiperidricidade dos tecidos, evidenciado em cultivos estáticos em meio líquido.

A hiperidricidade é uma anomalia fisiológica que ocorre apenas em tecidos vegetais cultivados *in vitro* e tem sido associada a vários distúrbios metabólicos. Flutuações metabólicas que geram anomalias fisiológicas são resultantes de alterações no equilíbrio em consequência de uma condição estressante. Os tecidos hiperídricos normalmente apresentam uma ampla série de efeitos paralelos, tais como hipoxia e estresse oxidativo (Piqueras et al 2002; Saheret al 2005).

O estresse oxidativo é caracterizado pela quebra da homeostase redox, ou seja, quando a concentração de espécies reativas de oxigênio (ERO), supera a capacidade antioxidativa das células. Sob condições estressantes, as células sofrem um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), tais como o radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As ERO causam danos oxidativos aos lipídios de membrana, proteínas e ácidos nucleicos. O sistema de defesa antioxidativo das plantas é constituído por várias enzimas além de compostos não enzimáticos que funcionam como removedores de ERO. As peroxidases (POD) e catalases (CAT) estão entre as enzimas que atuam na prevenção e diminuição dos efeitos do excesso de ERO, por meio da redução do H_2O_2 a água (Sreedharet al 2009). A desintoxicação de

ERO previne os danos celulares que podem causar interrupção de funções celulares, acarretando perda da capacidade morfogênica e finalmente morte celular (Hirt e Shinozaki 2003). O metabolismo antioxidante tem se mostrado importante na determinação da capacidade das plantas para sobreviver ao estresse in vitro (Dewir et al 2006).

A micropropagação de plantas em biorreatores depende do melhor entendimento das respostas bioquímicas e fisiológicas dos vegetais aos sinais do microambiente de cultivo, além da otimização das condições físicas e químicas de cultura para controlar a morfogênese de plantas em sistemas de cultivo líquido (Mehrotra et al 2007). Os mecanismos que regulam o balanço redox e mantêm a homeostase nas células das plantas incluem as respostas celulares para ERO em função do seu papel na sinalização de processos fisiológicos e bioquímicos do desenvolvimento (Hirt e Shinozaki 2003), nos quais as ERO podem participar inclusive como marcadores do estresse apontando os fatores que limitam ou alteram a morfogênese in vitro.

Esta pesquisa visa caracterizar respostas metabólicas e morfofisiológicas da cultivar Orelha de Elefante Mexicana de *Opuntia stricta* Haw, submetida a diferentes formas de cultivo in vitro, por meio de mensurações bioquímicas e fisiológicas, contribuindo para a propagação deste gênero e, conseqüentemente, para uma melhoria significativa no potencial agropecuário e econômico das zonas áridas e semiáridas, principalmente, do Nordeste brasileiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Semiárido brasileiro: realidades e desafios

Em termos geográficos, o semiárido brasileiro está situado, principalmente, na porção central da região Nordeste e é um dos maiores e mais populosos do mundo, com 21 milhões de habitantes distribuídos no todo ou em parte de 1.133 municípios, em nove estados numa área de aproximadamente 969.589,4 km². O Estado de Pernambuco, com quase 100 mil km², possui mais de 85% dessa área caracterizada como semiárido, o que torna a maior parte dos 310.000 estabelecimentos agrícolas do Estado passíveis dos fatores bióticos impostos por este tipo de ambiente (IBGE, 2008).

Do ponto de vista hídrico, o semiárido brasileiro possui média pluviométrica de 800mm por ano, além de uma pequena parcela com média anual inferior a 400mm. O déficit hídrico da região é explicado por fatores como: elevado potencial de perda de água por evapotranspiração; má distribuição das chuvas no tempo e no espaço; carência de rios perenes que possam garantir a qualidade e a quantidade da água, sequer minimamente necessárias para as populações locais; baixo nível de aproveitamento das águas de chuva; opção pela tecnologia de grandes açudes, com grandes espelhos de água que facilitam a evaporação (Cavalcanti et al 2007). Segundo Batista et al (2001), considerando somente as precipitações pluviais e a distribuição destas no decorrer do ano, destacam-se no Brasil as regiões semiáridas com período de seca igual ou superior a seis meses por ano e precipitações médias anuais menores que 800 mm. Nesta classe, situa-se 50% da área do Nordeste brasileiro.

A reduzida disponibilidade hídrica assim como a estacionalidade da produção são fatores que limitam a capacidade produtiva nos agroecossistemas da região semiárida, onde a pecuária apresenta-se como a atividade principal da população rural, associada à produção de alimentos em sistema familiar (Nascimento 2008). Em razão das incertezas climáticas e do fenômeno das secas periódicas no Nordeste do Brasil, as cactáceas, graças às suas características fisiológicas de economia no uso da água, representam uma fonte de suprimento de água e uma alternativa de alimento para os rebanhos do semiárido.

As cactáceas do gênero *Opuntia* (as opuntias), conhecidas principalmente como palma forrageira, satisfazem várias das exigências climáticas e ambientais descritas acima (Hoffmann 2001). Elas desempenham um papel importante no Nordeste brasileiro na produção de forragem para o gado, além de um grande potencial, já explorado em outros países, em projetos de

preservação do solo para zonas áridas, produção de frutas e hortaliças para consumo humano, biomassa para fins energéticos (combustível ou biogás), cochonilha para a produção de carmin e inúmeros subprodutos como queijo vegetariano, bebidas, remédios e cosméticos (Sáenz et al 2006; Chiacchio et al 2006).

A palma forrageira é importante para a economia de zonas áridas, não só para a subsistência, mas também para uma agricultura orientada para o mercado. É possível que sua importância aumente com as alterações climáticas esperadas. Vários testes de simulação para detectar áreas potenciais de cultivo e para prever os possíveis efeitos em termos de produtividade, com o aumento da concentração de CO₂ na atmosfera, mostraram que a palma forrageira pode desempenhar uma função muito mais importante no futuro dos sistemas agrícolas de regiões áridas e semiáridas. O efeito estufa (devido principalmente a uma maior concentração de CO₂ na atmosfera) levará a uma maior expansão e produtividade da espécie, pois estudos apontam que se a concentração de CO₂ fosse duas vezes maior, haveria um aumento na eficiência do uso da água, associado a uma maior produção de biomassa em até 55% (Barbera 2001). A FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) reconhece este potencial das opuntias e sua importância para contribuir no desenvolvimento das zonas áridas e semiáridas, sobretudo nos países em desenvolvimento, por meio da exploração econômica de várias de suas espécies, com resultados benéficos para a conservação do meio ambiente e a segurança alimentar. Se considerar a porção de superfície terrestre árida e semiárida apta para cultivar estas espécies que requerem pouco aporte de água, pode-se compreender sua importância agrônômica (Sáenz et al 2006).

O futuro das zonas áridas e semiáridas do mundo depende do desenvolvimento sustentável de sistemas agrícolas baseados numa seleção adequada de cultivos. Desta forma, os cultivos mais apropriados são os de fácil manejo, que podem suportar condições de escassez de água, altas temperaturas, solos pobres que exijam poucos insumos para que proporcionem alimento e/ou forragem para a pecuária, além do mais é importante que o produto ou seus subprodutos sejam apreciados e tenham valor no mercado (Barbera 2001).

Finalmente, a exploração de várias espécies de *Opuntia* spp. para forragem pode perfeitamente responder às necessidades econômicas e ambientais de regiões áridas e semiáridas, assim como de países pobres face às esperadas mudanças climáticas globais. Apesar das diferenças maiores ou menores de condições ambientais e sociais, bem como das características do gado de cada localidade, as opuntias são um produto muito relevante, tanto para atender as

necessidades nutritivas dos animais, como para a colheita e a armazenagem de água. Assim, poderiam ser amplamente utilizadas, não só por razões econômicas e ecológicas, mas também poderiam salvar grandes áreas da desertificação, graças às suas qualidades multifuncionais. Com certeza a erosão da terra, a super utilização dos pastos e a salinização poderiam ser reduzidas com sua disseminação (Barbera 2001). A história da palma forrageira e seus efeitos na estrutura social de vários grupos étnicos da América e de outros continentes ainda não terminaram. O aumento da falta de água em muitas regiões do planeta significa que essas plantas podem ter um futuro muito importante para a humanidade, devido à sua habilidade de produzir forragem sob condições de recursos hídricos limitados (Hoffmann 2001)

2.2. Palma forrageira: aspectos gerais

As opuntias são nativas de diversos ambientes, desde abaixo do nível do mar nos desertos da Califórnia até elevações de mais de 4.700m nas montanhas do Peru. Essa diversidade ecológica sugere que há uma grande variabilidade do gênero, segundo maior na família Cactaceae, com mais de 170 espécies (Nobel 2001). De todas as cactáceas em sua distribuição original, as espécies forrageiras são mais difundidas no continente americano, enquanto que nos outros continentes só é comum encontrá-la de maneira cultivada. Todavia, em nenhum outro país a palma desempenha um papel tão importante como no México, onde está ligada de modo particular à sua história e da Mesoamérica, seu centro de origem genética, de modo que no escudo do México figura uma águia pousada sobre uma palma, significando *sítio de palma que cresce sobre a pedra* (Sáenzet al 2006). No Chile, a modernização da agricultura tornou possível a produção comercial da fruta de palma forrageira, e nas áreas centrais irrigadas se produz essa fruta com qualidade de exportação (Hoffmann 2001).

No Brasil, a presença relevante da palma forrageira no polígono das secas no Nordeste já era relatada em meados da década de 60 (Metral 1965). Há relatos de que as espécies existentes no Brasil vieram para o Nordeste no começo do século passado pelas mãos de dois empresários da indústria têxtil: Delmiro Gouveia e Herman Lundgren. Isso por que, inicialmente, a palma serviria para alimentar uma cochonilha produtora de um corante para tingimento de tecidos. Como a cultura da cochonilha do carmim (*Dactylopius coccus* Costa) não teve êxito no Brasil, a cactácea importada com ela passou a ser planta ornamental nos parques e jardins, até quando foi descoberta sua utilização como forrageira. Delmiro Gouveia, ao que tudo indica, foi o

responsável pela sua disseminação em Alagoas, depois de ter sido instalada na Fazenda Cobra, no município de Pedra, em Pernambuco (Santos et al 2002).

No Nordeste brasileiro encontra-se a maior área de palma cultivada do mundo, com 500 a 600 mil hectares, distribuída nos Estados de Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Ceará, Rio Grande do Norte, Sergipe e Bahia possibilitando, no período das secas, a alimentação de um rebanho de 28.851.880 cabeças de bovinos, 9.378.514 cabeças de ovinos e 8.521.688 cabeças de caprinos, representando, respectivamente, 14,3%, 56,4% e 91% do rebanho brasileiro (IBGE 2008). Pernambuco responde por cerca de 30% do total desta área cultivada com palma (Ferreira 2005). Segundo Nascimento (2008), a disseminação da palma forrageira em Pernambuco teve como fator decisivo um decreto de um interventor pernambucano, mandando conferir prêmios aos plantadores de palma que obedecessem a certos requisitos estabelecidos. Apesar das diferenças maiores ou menores de condições ambientais e sociais, bem como das características do gado de cada localidade, as opuntias são um produto relevante, tanto para as necessidades nutritivas dos animais, como para a colheita e a armazenagem de água (Barbera 2001).

A evolução das espécies do subgênero *Opuntia* em ambientes áridos e semiáridos, onde diferentes situações ambientais impõem limitações à sobrevivência e à produtividade das plantas, provocou o desenvolvimento de características adaptativas em sua anatomia, morfologia e fisiologia. As raízes da *Opuntia ficus-indica* diferem de outras plantas pelo fato de desenvolverem características xeromórficas que lhes permite sobreviver períodos prolongados de seca. Para evitar a perda de água em solo seco, as raízes finas se cobrem com uma camada relativamente impermeável à água ou, então, as raízes caem, formando uma camada de cicatrização. As Cactáceas se caracterizam pela presença de aréolas, que são as gemas axilares, geralmente com pêlos e espinhos, e a falta de folhas copadas. Sob condições ambientais adequadas aparecerão novos cladódios, flores e raízes a partir do tecido meristemático das aréolas. Quando o cladódio é jovem, a aréola se forma na base de podárias que apresentam uma estrutura verde subulada de vida curta que logo seca e cai, essa estrutura efêmera corresponde à folha. Os órgãos tipo caule com uma casca verde, conhecidos como cladódios, são suculentos e sua forma é tipicamente de oblonga a espatulada-oblonga. Enquanto a parte verde (clorênquima) contém os cloroplastos que têm a função principal da fotossíntese, a parte branca (parênquima) é mais do que um simples saco de armazenagem de água, já que é a fábrica química onde são produzidos os hormônios, alcalóides e outros compostos formados durante o metabolismo da planta (Hills 2001).

A palma, em condições de estresse hídrico, utiliza a via fotossintética CAM (em inglês, *crassulacean acid metabolism*), a qual se caracteriza pela eficiência de uso da água. Estudos têm constatado valores de 50:1, ou seja, 50 kg de água para cada quilograma de matéria seca produzida, enquanto as plantas C₃ e C₄ apresentam eficiências por volta de 1000:1 e 500:1, respectivamente (Nascimento 2008). A chave para a conservação da água pela palma é a abertura noturna dos estômatos, resultando numa menor perda por transpiração durante a captação atmosférica do CO₂. A transpiração envolve a evaporação da água que se encontra dentro dos órgãos fotossintéticos (cladódios e caules), cujos espaços internos de ar se saturam de vapor de água. A troca gasosa se dá pelos poros dos estômatos, no caso de *O. ficus-indica* eles ocupam apenas 0,5% da superfície da planta, mesmo quando estão completamente abertos, enquanto que os estômatos das folhas de plantas altamente produtivas do tipo C₃ ou C₄ ocupam duas ou três vezes mais em sua área foliar (Hills 2001).

Diante das mudanças climáticas globais, a palma forrageira será, num futuro próximo, uma planta valiosa, uma vez que seu mecanismo fotossintético especializado a torna mais eficiente que qualquer gramínea ou leguminosa na utilização de água para produção de matéria seca (Pimienta-Barrios e Muñoz-Urías 2001).

A propagação da palma forrageira pode ser realizada por sementes ou estaquia. A reprodução por sementes, porém, além de apresentar baixo potencial de germinação, resulta em segregação genética, longa fase juvenil e diminuição da velocidade de crescimento das plantas (Llamoca-Zárate et al 1999). Já a propagação por estacas de cladódios demanda um grande número de propágulos, o que acarreta um sério problema por exigir grandes áreas para cultivo, gerando insuficiência de propágulos. Essa insuficiência favorece também o uso de cladódios doentes, desuniformes e fisiologicamente inadequados (Frota et al 2004). Este método apresenta baixo rendimento de mudas e pode disseminar pragas e doenças responsáveis por perdas de produtividade no campo.

Neste sentido, a produção de mudas de opuntia livres de patógenos em larga escala tem sido um dos principais fatores limitantes ao desenvolvimento eficiente da cultura, visto que a propagação por métodos convencionais não é suficientemente adequada para atender às necessidades de quantidade e qualidade da cultura, dificultando também o lançamento de novas cultivares (Vasconcelos et al 2007), uma vez que no plantio comercial de palma forrageira, em espaçamento adensado, são necessários 40.000 cladódios por hectare.

A propagação em massa através da cultura de tecidos é uma ferramenta importante nestes casos (Aliyu e Mustapha 2007). Por ser uma alternativa para a produção de mudas saudáveis em tempo e espaço reduzidos (Villalobos 2001).

2.3. Cultura de tecidos vegetais

A cultura de tecidos de plantas, ou cultivo *in vitro* de plantas, é um conjunto de técnicas que consiste no cultivo de células, tecidos ou órgãos (chamados de explantes) que são retirados de uma planta matriz e cultivados em laboratório sob condições físicas, químicas e nutricionais controladas. A micropropagação, também denominada de propagação vegetal *in vitro*, é a técnica de cultivo *in vitro* de aplicação mais rotineira e de maior impacto na agricultura. Com sua utilização, centenas de plantas podem ser formadas a partir de uma única matriz. Essa rápida multiplicação permite que os melhoristas possam introduzir novas cultivares mais rapidamente do que mediante a utilização da propagação convencional (Silva et al 2005).

Inicialmente, a técnica de micropropagação para produção de plantas em larga escala foi explorada quase exclusivamente para plantas ornamentais mas, recentemente, ela tem sido estendida para várias espécies de expressão agrícola, florestal ou ecológica, tais como batata, banana, abacaxi, cana-de-açúcar, palmeiras e árvores, como o açazeiro, o barbatimão e o eucalipto (França et al 1995; Oliveira e Silva 1997; Floriano 2004; Junghans e Souza 2009; Lemos 2009b).

A morfogênese nas plantas é consequência da integração dos processos de divisão e diferenciação celular, os quais conduzem a uma estrutura organizada e característica (Handro e Floh 1990). Tais processos são controlados por uma variedade de sinais internos ou do ambiente, tais como os hormônios, capazes de modificar o crescimento e o desenvolvimento. A manipulação de nutrientes e reguladores de crescimento no meio de cultivo, permite estimular o desenvolvimento e crescimento de múltiplas gemas axilares. A formação de três a quatro brotos de bananeira ou abacaxizeiro, por exemplo, pode ser obtido a cada quatro semanas de cultivo, o qual resulta numa produção de milhares de plantas de cada broto meristemático (Teixeira 2006). Experimentos feitos com cana-de-açúcar, bananeira e abacaxizeiro mostraram respostas no crescimento e desenvolvimento quando comparados diferentes sistemas de cultivo, onde houveram aumentos em torno de três a quatro vezes na biomassa total das microplantas, além da formação de novos brotos (taxa de multiplicação), variável em função da cultura, ter sido sempre

superior quando os explantes foram cultivados em sistemas de imersão temporária, quando comparados ao cultivo estático (Lemos 2009a).

A primeira tentativa de propagação das cactáceas *in vitro* foi realizada por King em 1957 e desde então os métodos de cultivo de tecidos têm sido aplicados para várias finalidades, como biossíntese de alcalóides, estudos morfogênicos e fisiológicos de micropropagação (Villalobos 2001). Escobar et al (1986) desenvolveram um método de micropropagação muito eficiente para *Opuntia amyclaea*, que de acordo com o qual, desconsiderando prováveis perdas durante o processo, em 100 dias é possível obter 25.000 plantas provenientes de um cladódio de cerca de 5cm. Para a obtenção dessa alta taxa de multiplicação, foram testadas diferentes concentrações de benziladenina (BA) em plantas resultantes dos cladódios com brotos diferenciados. Frota et al (2004), verificaram que o meio de cultura desprovido de BA proporcionou pouca ou nenhuma brotação, enquanto que em presença de BA foi possível o desenvolvimento de brotos em aproximadamente 25 dias depois de iniciado o cultivo. As seções longitudinais dos novos brotos foram expostas a concentrações maiores de BA, o que possibilitou o desenvolvimento de brotos a partir de gemas axilares pré-existentes. Levando em consideração possíveis perdas por contaminação e oxidação do material *in vitro*, Vasconcelos et al (2007) relataram ser possível a obtenção de 8.910 plantas enraizadas em seis meses de cultivo, considerando uma contaminação de 10% e uma indução de 60% dos explantes inoculados e 60% dos brotos obtidos.

A despeito das muitas vantagens, a micropropagação tem algumas limitações no seu uso industrial. A maior limitação é o alto custo de produção das plantas. A adoção de cultivo em meio líquido é uma das mais importantes medidas para a redução de custos no processo de micropropagação, tanto por dispensar a aquisição de agentes gelificantes como por promover um contato mais próximo dos tecidos com o meio de cultura, que facilita a absorção de nutrientes e fitormônios e estimula a formação e o desenvolvimento de brotos e raízes (Mehrotra et al 2007).

O cultivo em meio líquido, apesar das vantagens apontadas, favorece a ocorrência de uma desordem fisiológica, típica do cultivo *in vitro* de plantas, e que é conhecida como síndrome da hiperhidricidade, ou vitrificação. Esse fenômeno pode levar à perda irreversível da capacidade morfogênica e, conseqüentemente, do potencial regenerativo. Usualmente, tanto a atmosfera do recipiente quanto o meio de cultivo acumulam compostos que podem causar estresse e embora a maioria das culturas se adapte às mudanças das condições ambientais, algumas se tornam

anormais com um aspecto túrgido, translúcido, menos verde, aquoso, hipolignificado, enrugado e de aparência frágil e coloração verde clara, sintomas típicos de hiperhidricidade (Sreedhar et al 2009). A reduzida troca gasosa é um dos fatores que acarreta o excesso de umidade relativa e acúmulo de etileno, entre outros gases.

Neste contexto, a utilização de sistemas de micropropagação em meio líquido com imersão temporária tem sido testado e utilizado em várias culturas e se mostrado vantajoso na prevenção da hiperhidricidade de brotos e de folhas e redução dos custos de produção (Mehrotra et al 2007).

2.4. Cultivo estático x sistema de imersão temporária (SIT)

A micropropagação convencional é caracterizada pelo cultivo em recipientes geralmente pequenos contendo meio de cultura. A consistência do meio pode ser líquida ou semissólida. No cultivo em meio líquido há necessidade de aeração do meio que muitas vezes se faz mediante a utilização de mesas agitadoras que suportam os recipientes de cultivo. Esses sistemas impõem sérias limitações para a aplicação comercial. O emprego de biorreatores em substituição a outros tipos de frascos de cultura e a atividade de automação, baseada principalmente no cultivo vegetal via imersão temporária em meio de cultura líquido, podem reduzir os requerimentos laboratoriais e possibilitar o cultivo em larga escala. No sistema de imersão temporária, o tecido vegetal é banhado periodicamente com o meio nutritivo que é bombeado para o recipiente que contém os explantes e ao retornar para o recipiente que o armazena, promove a troca periódica da atmosfera do frasco de cultivo. Tudo isto resulta em melhor crescimento e multiplicação das plantas, além da formação de plantas com anatomia, morfologia e metabolismo adequados, capazes de sobreviver melhor às condições *ex vitro*, sem a necessidade de longo período de aclimatização (Fogaça et al 2006). Essas inovações não só podem reduzir a quantidade de mão-de-obra e reagentes, mas também possibilitar uma melhor morfogênese do material vegetal.

A propagação em larga escala em SIT já foi relatada com sucesso para várias espécies, como bananeira (Alvard et al 1993), cana-de-açúcar (Lorenzo et al 1998), orquídea (Paek et al 2001) e abacaxizeiro (Escalona et al 1999), com taxa de multiplicação sempre superior à micropropagação convencional.

Neste sentido, vários trabalhos de pesquisa têm sido divulgados quanto à utilização dos diferentes sistemas de cultivo, buscando comparar o desenvolvimento e o crescimento vegetal. Segundo Teixeira (2002), já em 1952, Steward e colaboradores demonstraram que raízes de

cenoura imersas em meio líquido não apresentavam crescimento satisfatório e concluíram que se devia a deficiência de oxigenação do meio de cultura. Visando contornar esse problema, eles desenvolveram um equipamento que promoveu uma imersão temporária dos segmentos de raiz via movimentação rotacional dos frascos, de tal forma que os segmentos de raiz eram expostos ao ar e, no momento seguinte, submersos no meio líquido, possibilitando um aumento da matéria fresca de 38,1mg em meio gelificado para 98,6mg em meio líquido. A partir daí, novos equipamentos de cultivo em imersão temporária foram desenvolvidos, com o RITA[®]-Recipiente de Imersão Temporária Automatizado (Alvard et al 1993) e o BIT- Biorreator de imersão temporária (Lorenzo et al 1998), sendo o segundo o mais utilizado atualmente.

Desde então, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas comparando os sistemas de cultivo e suas variantes, avaliando a morfogênese vegetal. Fogaça (2006) comparou a eficiência do meio gelificado e do biorreator de imersão temporária (BIT) visando à propagação em massa de *Agapanthus umbellatus* var minor. Apesar dos resultados semelhantes obtidos quanto a taxa de multiplicação, a utilização do BIT tendeu a ser superior em relação à qualidade e homogeneidade das partes aéreas produzidas, refletindo no melhor desempenho durante a aclimatização. Já Rodrigues (2006), em experimento realizado com *Heliconia champneiana* Griggs cv. Splash, pesquisou intervalos de uma, quatro, seis e oito horas entre imersões de cultivo e os comparou com o método convencional, concluindo que intervalos menores, uma e quatro horas, entre imersões geraram respostas morfológicas superiores, demonstrando melhor eficiência da imersão temporária na produção de brotos. Os maiores intervalos, no entanto, não promoveram o mesmo desempenho, o que indica que o sucesso não depende só do tipo de sistema adotado, mas também da metodologia e protocolo aplicados. Silva et al (2007) pesquisaram a micropropagação in vitro de abacaxizeiro em larga escala e compararam a micropropagação convencional estática em meio sólido e líquido com a micropropagação em biorreator com frequências entre imersões de cultivo de zero (imersão permanente), duas, quatro e oito horas, além de diferentes frequências na aeração. Os dados mostraram que a imersão das plantas a cada duas horas (maior frequência de imersões testada) proporcionou maior número, altura e massa de matéria seca dos brotos de abacaxizeiro, concluindo em suas condições, que o SIT é o método mais eficiente na micropropagação de abacaxizeiro em larga escala. Assim como Lemos et al (2001) obtiveram melhor resultado em micropropagação de bananeiras cv. Terra com o ciclo de imersão a cada 4 horas (maior frequência de imersões testada), observando que as microplantas apresentaram

produção de biomassa de 2,86 vezes maior e 2,20 vezes mais brotos do que no sistema convencional.

Recentemente, a micropropagação de cana-de-açúcar, uma espécie C_4 , tem sido estudada em biorreatores no sistema de imersão temporária, focando no metabolismo do carbono, com ênfase no estresse oxidativo associado a esta técnica de micropropagação. Onde tem sido evidenciado o melhor preparo das mudas provenientes do SIT para lidar com o estresse da aclimatização (Aragón et al 2009).

A utilização do SIT, no entanto, não tem sido mais abrangente devido à ausência de protocolos estabelecidos. Até o momento é inexistente na literatura protocolos ou mesmo pesquisas envolvendo o cultivo de plantas do gênero *Opuntia* em sistema de imersão temporária. No ajuste de protocolo é importante garantir bons índices de multiplicação e reduzida ocorrência de desordens fisiológicas, como o estiolamento, o albinismo e as alterações morfogenéticas. As principais desvantagens na utilização de biorreatores, em sistema de imersão temporária, têm sido a variação no tamanho das mudas formadas gerando desuniformidade na aclimatização, a contaminação microbiana que pode afetar milhares de plantas em um único recipiente, a recalcitrância e a hiperidricidade dos explantes.

2.5. Estresse oxidativo

Nos cultivos desenvolvidos até a década de oitenta não se faz nenhuma referência ao controle ambiental no desenvolvimento das plantas *in vitro* (Majada e Sánchez-Tamés 2004). Desde a inoculação *in vitro* e ao longo dos sucessivos subcultivos, as plantas, ou mais frequentemente os explantes, são submetidos sucessivamente e/ou simultaneamente a condições de cultivo incomuns quando comparadas com os ambientes em casa de vegetação e no campo (Gaspar et al 2002). As taxas de crescimento, desenvolvimento e muitas das características fisiológicas e morfológicas das plantas formadas *in vitro* são influenciadas pelo ambiente físico, químico e gasoso dos recipientes (Kozai et al 1997). De acordo com Keevers et al (1995), muitas aberrações na cultura de tecidos de plantas são causadas por estresse oxidativo.

O modelo de biorreator que utiliza o sistema de imersão temporária, além de usar meio líquido, no qual o material vegetal tem uma maior superfície de contato com o meio de cultura, faz com que o tecido vegetal não permaneça em contato permanente com o mesmo, assegurando a aeração do sistema e reduzindo a frequência de ocorrência de hiperidricidade (George 1996; Teixeira 2006; Silva et al 2007). Por outro lado, Ziv (2005) afirma que a hiperidricidade é

principal problema relacionado ao uso de biorreatores. Fatores como o tempo e a frequência de imersão, que variam de acordo com a espécie, influenciam no desempenho do material vegetal no SIT. Um tempo muito longo de imersão para determinada espécie pode proporcionar hiperidricidade ou até mesmo falta de oxigenação das plantas (Ettienne e Berthouly 2002).

A síndrome da hiperidricidade, também conhecida como vitrificação pelos aspectos vítreos dos tecidos vegetais em cultivo *in vitro*, pode ser decorrente ou estar relacionada a danos causados por estresse oxidativo imposto ao tecido vegetal durante a preparação do explante, e ao longo do cultivo *in vitro*, devido à composição dos meios de cultura e dos fatores ambientais (Camara e Willadino 2005).

A hiperidricidade designa más formações afetando frequentemente brotos de plantas durante sua propagação vegetativa, sendo responsável pelo inibido crescimento e atraso substancial durante e depois do cultivo *in vitro* (Kevers et al 2004; Ettienne et al 2006). A hiperidricidade tem sido um problema genérico também em cultivos contínuos ou em larga escala de plantas *in vitro* e parece estar associada aos vários distúrbios metabólicos, mudança na matriz de proteinase e, principalmente, alterações nas vias de resposta ao estresse (Sreedhar et al 2009).

O estresse oxidativo origina-se de um desbalanço na geração e remoção de espécies reativas de oxigênio (ERO) dentro das células. Os estresses ambientais bióticos e abióticos não apenas promovem a geração de ERO, mas também iniciam mecanismos de sinalização de defesa que, se tiverem sucesso, começam com a indução da geração de ERO, continuam com a indução de respostas de defesa e terminam com a remoção de ERO para restabelecer o balanço redox e promover a sobrevivência das células (Hirt e Shinozaki 2003).

As plantas, quando sujeitas a estresses ambientais, têm o balanço entre a produção de ERO e a atividade de antioxidantes aumentada, resultando em prejuízos oxidativos. Plantas com elevados níveis de antioxidantes, constitutivos e induzidos, têm mostrado maior resistência ao estresse oxidativo. Mais recentemente, alguns experimentos têm sido realizados com o objetivo de esclarecer o papel do estresse oxidativo na morfogênese vegetal (Konieczny et al 2008; Meratan et al 2009; Blazquez et al 2009).

Sob condições estressantes, as células sofrem um aumento da geração das espécies reativas de oxigênio, tais como o radical aniônico superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A geração de ERO tem sido associada com oxidases na membrana plasmática e com o transporte de elétrons do cloroplasto e mitocôndria, além da fixação e transferência de energia

por pigmentos fotossintéticos, afetando membranas e a estrutura celular (Laloi et al 2004; Ye et al 2006; Xu et al 2008). O aumento da concentração de ERO intracelular cria condições citotóxicas, incluindo dano oxidativo a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos e perturbações das funções celulares, levando finalmente a célula à morte (Dat et al 2000; Hirt e Shinozaki 2003).

As células possuem uma série de mecanismos antioxidantes para remover as ERO, que incluem a via enzimática e a não enzimática. Antioxidantes não enzimáticos incluem ascorbato (a vitamina C), glutathione, α -tocoferol (vitamina E), flavonóides, alcalóides e carotenóides (Hirt e Shinozaki 2003).

Algumas enzimas atuam em rotas determinantes na resposta antioxidativa ao estresse. As peroxidases (POD - EC 1.11.1.7) fazem parte da Classe III da superfamília de heme-peroxidases que são as peroxidases secretórias encontradas nos vegetais (De Gara 2004). As POD apresentam um número muito grande de formas isoenzimáticas e são responsáveis por uma infinidade de funções fisiológicas, dentre as quais: rigidez da parede celular através da imobilização de extensina e ligações cruzadas da matriz de polissacarídeos (Iiyama et al 1994); deposição de lignina e suberina (Quiroga et al 2000; Pomaret al 2002); defesa contra a penetração de patógeno, ferimentos e outros estresses abióticos (Mcluskly et al 1999; Bolwell et al 2002; Ros Barcelò et al 2003); catabolismo da auxina (Gazaryan et al 1996); biossíntese de metabólitos secundários (Sottomayor e Ros Barceló 2003).

As POD são continuamente encontradas em plantas superiores funcionando como desintoxicadoras rápidas do estresse induzido por H_2O_2 , mediante a oxidação de compostos de natureza fenólica. As catalases (CAT) são hemoproteínas tetraméricas que estão entre as principais formas de defesa nas plantas e que iniciam uma rota fundamental na defesa antioxidante, reduzindo duas moléculas de peróxido de hidrogênio a água (H_2O) e oxigênio (O_2) (Sreedhar et al 2009). No desproporcionamento catalisado pela enzima, uma molécula de H_2O_2 é ligada ao grupo heme da enzima, onde ele é rapidamente convertido em oxigênio atômico e água, suportado por resíduos de aminoácidos da proteína da enzima. O átomo de oxigênio é temporariamente ligado ao átomo de ferro central do grupo heme, e depois transferido de lá para a segunda molécula de H_2O_2 (Koolman e Roehm 2005). As catalases são enzimas de alta eficiência catalítica embora de baixa afinidade com o H_2O_2 . Presentes em peroxissomos e glioxissomos, ainda não tiveram sua existência comprovada em cloroplastos e mitocôndrias (Noctor et al 2007).

Já as polifenoloxidasas (PPO, EC 1.10.3.1) são proteínas que contêm cobre que catalisam a hidroxilação e a degradação oxidativa de compostos fenólicos. Além do papel estrutural na parede celular, essas enzimas exercem uma função protetora contra a ação das ERO (Ali et al 2006). A polifenoloxidase geralmente é elevada em tecidos infectados e tem grande importância para as plantas, com envolvimento nos mecanismos de defesa ou na senescência (Agrios 1997). Entre as polifenoloxidasas encontra-se a tirosinase clássica uma enzima que não só exibe atividade monofenoloxigenase (EC 1.14.18.1), mas também exibe atividade o-difenol oxidase (EC 1.10.3.1.). Uma enzima hidroxilante da tirosina foi parcialmente purificada a partir de calos de *Portulaca grandiflora* produtores de betacianina e caracterizada como uma tirosinase (EC 1.14.18.1 e EC 1.10.3.1). Essa tirosinase catalisou a formação de L-(3,4-di-idroxifenil)-alanine (Dopa) e *ciclo*-Dopa, que são precursores centrais da biosíntese de betalaína (Fig 1) (Steiner et al 1999).

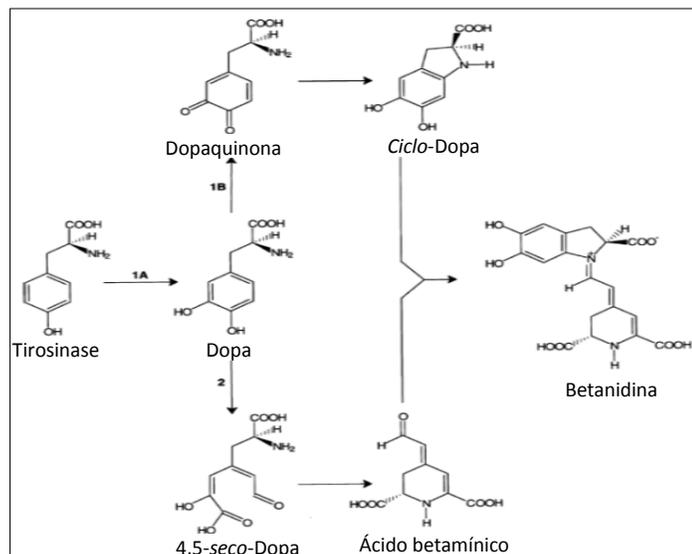


Fig 1. Esquema de reação da formação da betanidina por tirosina via Dopa. 1A - tirosinase hidroxilase (TOH); 1B – Dopa oxidase (DO); 2 – Dopa 4,5-dioxigenase. Fonte: Steiner et al 1999.

Recentemente as betacianinas, pigmentos do grupo das betalaínas têm sido apontados como sequestradores de ERO, limitando danos causados por ferimentos e infiltração por patógeno em tecidos de plantas. As principais fontes de betacianinas são a beterraba vermelha (*Beta vulgaris*) e a palma forrageira (*Opuntia* spp) e nos últimos anos a biotecnologia tem sido utilizada para ativar o metabolismo secundário e aumentar os níveis de produção de metabólitos

do grupo das betalaínas com vistas a alcançar a viabilidade comercial da produção in vitro de betacianinas (pigmentos roxo-violeta) e betaxantinas (pigmentos amarelos) (Soriano-Santos et al 2007). Os concentrados de betalaínas são utilizados como corantes naturais e a presença de ambos foi relatada em espécies do gênero *Opuntia* (*O. ficus-indica* e *O. stricta*) e outros gêneros, tendo sido explorados os processos de produção in vitro desses compostos (Georgiev et al 2008).

Este trabalho avaliou a expressão morfogênica e a capacidade propagativa da palma forrageira in vitro focalizando as respostas ao estresse oxidativo em diferentes sistemas de cultivo, utilizando como parâmetros componentes do sistema de defesa antioxidativo e o desenvolvimento biométrico do material vegetal.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrios GN (1997) Plant pathology. Academic Press, San Diego

Ali MB, Singh N, Shohael AM, Hahn EJ, Paek KY (2006) Phenolic metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress. *Plant Science* 171: 147-154

Aliyu BS, Mustapha Y (2007) Effect of different media on the in vitro growth of cactus (*Opuntia ficus-indica*) explants. *African Journal of Biotechnology* 6 (11): 1330-1331

Alvard D, Cote F, Teisson C (1993) Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 55-60

Aragon C, Carvalho LC, Gonzalez J, Escalona M, Amancio S (2009) Sugarcane (*Saccharum* sp. Hybrid) propagated in headspace renovating systems shows autotrophic characteristics and develop improved anti-oxidative response. *Tropical Plant Biology* 2: 38–50

Barbera G. (2001) História e importância econômica e agroecológica In: FAO/SEBRAE (eds). *Agroecologia, cultivo e usos da palma-forrageira*, SEBRAE-PB, pp. 1-11

Batista MJ, Novaes F, Santos DG, Suguino HH (2001) Drenagem como instrumento de dessalinização e prevenção da salinização de solos. Ministério do Meio Ambiente / Secretaria dos Recursos Hídricos (Série Informes Técnicos), Brasília

Blazquez S, Olmos E, Hernández JA, Fernández-García N, Fernández JA, Piqueras A (2009) Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 97: 49-57

Bollwell GP, Bindschedler LV, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C, Minibayeva F (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: A three-component system. *Journal of Experimental Botany* 53: 1367–1376

Camara TR, Willadino L (2005) Compreendendo o estresse abiótico in vitro. In: Nogueira RJM, Araújo ELA, Willadino L, Maaze U (Eds) Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas, 1ª ed. MXM Gráfica e Editora, Recife, v.1, pp. 325-333

Silva CUC, Albuquerque CC, Brito JZ (2005) Cultivo in vitro de vegetais: considerações básicas. Imprensa universitária, Recife

Cavalcanti ER, Coutinho SFS, Selva VSF (2007) Desertificação e desastres naturais na região do semiárido brasileiro. Revista Cadernos de Estudos Sociais 22:19-31

Chiacchio FPB, Mesquita AS, Santos JR (2006) Palma forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o semi-árido baiano. Bahia Agrícola 7:39-49

Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Van montagu M, Inzé D, Van Breusegem F (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Cellular and Molecular Life Sciences 57:779–795

De Gara L (2004) Class III peroxidases and ascorbate metabolism in plants. Phytochemistry Reviews 3:195–205

Dewir YH, Chakrabarty D, Ali MB, Hahna EJ, Paek KY (2006) Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia millii* hyperhydric shoots. Environmental and Experimental Botany 58:93–99.

Escalona M, Lorenzo JC, Gonzalez BL, Danquita M, Gonzales JL, Desjardins Y, Borroto CG (1999) Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) micropropagation in temporary immersion systems. Plant Cell Reports 18:743-748.

Escobar A, Villalobos A, Villegas MA (1986) *Opuntia* micropopagation by axillary proliferation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 7:269-277

Etienne H, Berthouly M (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69:215 - 231

- Etienne H, Dechamp E, Barry-Etienne D, Bertrand B (2006) Bioreactors in coffee micropropagation. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18 (1):45-54
- Ferreira MA (2005) Palma forrageira na alimentação de bovinos leiteiros. Imprensa Universitária UFRPE, Recife
- Flores-Flores V e Tekelenburg A (2001) Produção de corante dacti (*Dactylopius coccus* Costa). In: FAO/SEBRAE (eds). Agroecologia, cultivo e usos da palma-forrageira, SEBRAE-PB, pp. 169-186
- Floriano EP (2004) Produção de mudas florestais por via assexuada. Caderno didático nº 3, 1ª ed. Santa Rosa
- Fogaça LA, Dortzbach D, Alves AC, Pedrotti EL (2006) Morphological and physiological characteristics *Agapanthus umbellatus* var. minor of shoots propagated in bioreactor of temporary immersion. *Plant Cell Culture Micropropagation* 2:80-87
- França SC, Duarte IB, Cerdeira RMM, Pereira AMS (1995) Micropagation of *Stryphnoclendon polyphythum* (Barbatimão). *Plant Cell, Tissue e Organ Culture* 42:291- 293
- Frota HM, Carneiro MSS, Llamoca-zárate RM, Campos FAP, Peixoto MJA (2004) Efeitos do BAP e do AIA na indução e no crescimento in vitro de brotos de dez clones de palma forrageira. *Revista Ciência Agronômica* 35:279-283
- Gaspar T, Franck T, Bisbis B, Keevers C, Jouve L, Hausman JF, Dommes J (2002) Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* 37 263-285
- Gazaryan IG, Lagrimini LM, Ashby GA, and Thorneley RNF (1996) Mechanism of indole-3-acetic acid oxidation by plant peroxidases: anaerobic stopped flow spectrophotometric studies on horseradish and tobacco peroxidases. *Biochem. Journal* 313:841-847
- George EF (1996) Plant propagation by tissue culture. Part 2. The practice, 2nd edn. Exegetics Ltd., Edington, UK

- Georgiev V, Ilieva M, Bley T, Pavlov A (2008) Betalain production in plant in vitro systems. *Acta Physiology Plant* 30 581–593
- Handro W, Floh EIS (1990) Aspectos básicos do controle da morfogênese in vitro. In: Torres, AC, Caldas LS (Eds.). *Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas*, ABCTP/EMPRAPA-CNPH, Brasília, pp. 203-212
- Hills FS (2001) Anatomia e morfologia. In: FAO/SEBRAE (eds). *Agroecologia, cultivo e usos da palma-forrageira*, SEBRAE-PB, pp. 28-35
- Hirt H, Shinozaki K (2003) *Topics in Current Genetics: Plant Responses To Abiotic Stress*. v. 4, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
- Hoffmann W (2001) Etnobotânica. In: FAO/SEBRAE (eds). *Agroecologia, cultivo e usos da palma-forrageira*, SEBRAE-PB, pp. 12-19
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2008) *Produção Pecuária municipal*, v. 36, Rio de Janeiro, p.1-55
- Iiyama K, Lam TBT, Stone BA (1994) Covalent cross links in the cell wall. *Plant Physiology* 104:315–320
- Junghans TG e Souza AS (2009) *Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas*. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas
- Keevers C, Bisbis B, Le Dily F, Billard JP, Huault C, Gaspar TH (1995) Darkness improves growth and delays necrosis in a non chlorophyllous habituated sugarbeet callus. *In vitro Cellular e Developmental Biology* 31:122–126
- Kevers C, Franck T, Strasser RJ, 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
- King RM (1957) Studies in the tissue culture of cacti. *Cactus and Succulent Journal* 29 102-104

- Konieczny R, Libik M, Tuleja M, Niewiadomska M (2008) Oxidative events during in vitro regeneration of sunflower. *Acta Physiologiae Plantarum* 30 71- 79
- Koolman J, Roehm KH (2005) *Color Atlas of Biochemistry*, 2nd ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Kozai T, Kubota C, Jeong BR (1997) Enviromental control for the large-scale production of plants through in vitro techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 51 49-56
- Laloi C, Apel K, Danon A (2004) Reactive oxygen signalling: the latest news. *Current Opinion in Plant Biology* 7 323–328
- Lemos EEP, Ferreira MS, Alencar LMC, Oliveira JGL, Magalhães VS (2001) Micropropagação de clones de banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. *Revista Brasileira de Fruticultura* 23:482-487
- Lemos EEP (2009a) Micropropagação de plantas por Biorreatores. In: Junghans TG e Souza AS Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. pp. 83-119.
- Lemos EEP (2009b) Micropropagação da cana-de-açúcar. In: Junghans TG e Souza AS Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, pp. 257-286
- Llamoca-Zárate RM, Agujar LF, Landsmann J, Campos FAP (1999) Whole Plant regeneration from the shoot apical meristem of *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae). *Journal of Applied Botany-Angewandte Botanik* 73 83-85
- Lopes EB (2007) Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino. EMEPA/FAEPA, João Pessoa
- Lorenzo JC, Gonzalez BL, Escalona M, Teisson C, Espinosa P, Borroto C (1998) Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54 197-200

- Martínez GA, Civello PM, Chaves AR, Añon MC (2001) Characterization of peroxidases mediated chlorophyll bleaching in strawberry fruit. *Phytochemistry* 58 379–387
- Mclusky SR, Bennett MH, Beale MH, Lewis MJ, Gaskin P, Mansfield JW (1999) Cell wall alteration and localised accumulation of feruloyl-3'-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration by *Botrytis alii* are associated with actin polarisation, peroxidases activity and suppression of flavonoid biosynthesis. *Plant Journal* 17 523–534
- Mehrotra S, Goel MK, Kukreja AK and Mishra BN (2007) Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. *African Journal of Biotechnology* 6 (13) 1484-1492
- Meratan AA, Ghaffari SM, Niknam V (2009) In vitro organogenesis and antioxidant enzymes activity in *Acanthophyllum sordidum*. *Biologia Plantarum* 53: 5-10
- Metral JJ (1965) Les cactées fourragères dans le Nord-Est du Brésil plus particulièrement dans L'état du Ceará. *Agronomia Tropical* 20:248-261
- Nascimento JP (2008) Caracterização morfológica e estimativa da produção de *Opuntia ficus-indica* Mill. sob diferentes arranjos populacionais e doses de fósforo no semiárido da Paraíba, Brasil. Dissertação, Universidade Federal de Campina Grande
- Nobel PS (2001) Biologia ambiental. In: FAO/SEBRAE (eds). *Agroecologia, cultivo e usos da palma-forrageira*, SEBRAE-PB, pp. 36-48
- Noctor G, De Paepe R, Foyer CH (2007) Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends in Plant Science* 12:125-134
- Oliveira RP e Silva SO (1997) Micropopagação massal de bananeira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 32(4):415-420
- Paek KY, Hahan EJ, Son SH (2001) Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. *In vitro Cellular Developmental Biology Plant* 37:149-157

- Pimienta-Barrios E e Muñoz-Urías A (2001) Domesticação das opuntias e variedades cultivadas. In: FAO/SEBRAE (eds). Agroecologia, cultivo e usos da palma-forrageira, SEBRAE-PB, pp. 58-64
- Piqueras A, Cortina M, Serna MD, Casas JL (2002) Polyamines and hyperhydricity in micropropagated carnation plants. *Plant Science* 62:671-678
- Pomar F, Caballero N, Pedreño MA, Ros Barcelò A (2002) H₂O₂ generation during the auto-oxidation of coniferyl alcohol drives the oxidase activity of a highly conserved class III peroxidase involved in lignin biosynthesis. *FEBS Letters* 529:198-202
- Quiroga M, Guerrero C, Botella MA, Barceló A, Amaya I, Medina MI, Alonso FJ, Milrad de Forchetti S, Tigier H, Valpuesta V (2000) A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiology* 122:1119-112
- Rodrigues PHV, Teixeira FM, Lima AMLP, Ambrosano GMB (2006) Propagação de mudas de helicônia em biorreator de imersão temporária. *Bragantia* 65:29-35
- Ros Barcelò A, Pomar F, Lopez-Serrano M, Pedreño MA (2003) Peroxidase: a multifunctional enzyme in grapevines. *Functional Plant Biology* 30:577-591
- Sáenz C, Berger H, García JC, Galletti L, Cortázar VG, Higuera I, Mondragón C, Rodríguez-Félix A, Sepúlveda E, Varnero MT (2006) Utilización agroindustrial del nopal. *Boletín de servicios agrícolas de la fao* 162, Roma
- Saher S, Fernández-García N, Piqueras A, Hellin E, Olmos E (2005) Reducing properties, energy efficiency and carbohydrate metabolism in hyperhydric and normal carnation shoots cultured in vitro: a hypoxia stress? *Plant Physiology and Biochemistry* 43:573-582
- Santos DC, Farias I, Lira MA, Santos MVF, Arruda GP, Coelho RSB, Dias FM, Warumby JF, Melo JN (2002) Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) em Pernambuco: cultivo e utilização. Documentos IPA, Recife

Santos DC, Farias I, Lira MA, Santos MVF, Arruda GP, Coelho RSB, Dias FM, Melo JN (2006) Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia e Nopalea*) em Pernambuco. Documentos IPA, Recife

Silva AB, Pasqual M, Teixeira JB, Araújo AG (2007) Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira 42:1257-1260

Soriano-Santos J, Franco-Zavaleta ME, Pelayo-Zaldívar C, Armella-Villalpando MA, Yáñez-López ML, Guerrero-Legarreta I (2007) Caracterización parcial del pigmento rojo del fruto de la “jiotilla” (*escontria chiotilla* [weber] britton e rose). Revista Mexicana de ingeniería química 6:19-25

Sottomayor M, Ros Barcelò A (2003) Peroxidase from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don and the biosynthesis of alpha-3',4'-anhydrovinblastine: a specific role for a multifunctional enzyme. Protoplasma 222:97–105

Sreedhar RV, Venkatachalam L, Neelwarne B (2009) Hyperhydricity-Related Morphologic and Biochemical Changes in Vanilla (*Vanilla planifolia*). Journal Plant Growth Regulation 28:46–57

Steiner U, Schliemann W, Boëhm H, Strack D (1999) Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. Planta 208:114-124

Taiz L, Zeiger E (2004) Fisiologia vegetal. Artmed, Porto Alegre

Teixeira JB (2002) Biorreatores. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento 4:36-41

Teixeira JB (2006) Produção de mudas clonais em biofábricas e uso de biorreator. Documentos 180/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Vasconcelos AGV, Lira MA, Cavalcanti VALB, Santos MVF, Camara T, Willadino L (2007) Micropropagação de palma forrageira cv. Miúda (*Nopalea cochenillifera* - Salm Dyck). Revista Brasileira de Ciências Agrárias 2:28-31

Villalobos VM (2001) Aplicação do cultivo de tecidos para a micropropagação de *Opuntia* sp. In: FAO/SEBRAE (eds) Agroecologia, cultivo e usos da palma-forrageira, SEBRAE-PB, pp. 72-78

Xu PL, Guo YK, Bai JG, Shang L, Wang XJ (2008) Effects of longterm chilling on ultrastructure and antioxidant activity in leaves of two cucumber cultivars under low light. *Plant Physiology* 132:467–478

Ye B, Muller HH, Zhan J, Gressel J (1997) Constitutively elevated levels of putrescine and putrescine-generating enzymes correlated with oxidant stress resistance in *Conyza bonariensis* and wheat. *Plant Physiology* 115:1443–1451

Ziv M (2005) Simple bioreactors for mass propagation of plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81:277–285

MANUSCRITO

**ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DA PALMA FORRAGEIRA *Opuntia*
stricta Haw SOB DISTINTOS SISTEMAS DE CULTIVO IN VITRO**

ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DA PALMA FORRAGEIRA *Opuntia stricta*
Haw SOB DISTINTOS SISTEMAS DE CULTIVO IN VITRO

PHYSIOLOGIC AND BIOCHEMICAL ASPECTS OF THE CACTUS PEAR *Opuntia stricta*
Haw IN DIFFERENT IN VITRO CROPPING SYSTEMS

Emmanuel Cabral Medeiros ¹ *

Jackeline Marques Faria ²

Terezinha Rangel Camara ¹

Cláudia Ulisses de Carvalho Silva ³

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Departamento de Química, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, 52171-900, Recife, PE - Brasil.

² Universidade Federal de Goiás (UFG), Departamento de Agronomia, 74001-970, Goiânia, GO – Brasil.

³ UFRPE, Unidade Acadêmica de Garanhuns, 55296-190, Garanhuns, PE - Brasil.

* Autor correspondente <emmanuel.agro@gmail.com>

Resumo: A *Opuntia stricta* Haw, cactácea de grande importância econômica como forrageira na região Nordeste do Brasil, foi submetida a distintos sistemas de cultivo in vitro e seu desempenho foi avaliado mediante variáveis fisiológicas e bioquímicas. Foram estabelecidos quatro diferentes sistemas de cultivo: sistema de imersão temporária (SIT), com baixa frequência de imersões (imersão de um minuto a cada 48 horas); alta frequência (imersão de cinco minutos a cada três horas); cultivo estático em meio semi-sólido (6,0 g.L⁻¹ de ágar); cultivo estático em meio líquido. Os meios para indução de multiplicação in vitro constaram dos sais e vitaminas de Murashige e Skoog (1962) acrescidos de 30,0 g.L⁻¹ de sacarose e 0,0; 0,25; 0,5 ou 1,0 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP). As culturas foram mantidas em sala de crescimento com 25±2°C, sob luz branca fria (40 μmol.m⁻².s⁻¹), com 16 horas de fotoperíodo. O desenho experimental foi o inteiramente casualizado com arranjo fatorial 4 x 4 (sistemas de cultivo x concentrações de BAP no meio). Após o cultivo in vitro, brotações de cada tratamento foram aclimatizadas. Análises bioquímicas e biométricas foram realizadas no material in vitro e biométricas no material aclimatizado. O cultivo estático em meio sólido, proporcionou mais estabilidade desde a multiplicação até a aclimatização das mudas, enquanto os sistemas com meio líquido apresentaram limitações em alguma das fases da micropropagação. A hiperidricidade e a presença de betacianina podem ser usadas como indicadores da qualidade fisiológica das mudas micropropagadas da Orelha de Elefante Mexicana e do seu potencial para aclimatização.

Palavras-chave: morfogênese, estresse oxidativo, biorreator, hiperidricidade.

Abstract: The *Opuntia stricta* Haw, cactus of great economic importance as forage in northeastern Brazil, was subjected to different in vitro systems and their performance was assessed by physiological and biochemical variables. We established three different cropping systems: temporary immersion system (TIS), with low frequency of immersion (immersion of one minute every 48 hours) and high-frequency TIS (immersion for five minutes every three hours); static culture in semi-solid medium (6.0 g.L⁻¹ agar); static culture in liquid medium. The middle for inducing proliferation in vitro consisted of Murashige and Skoog (1962) salts and vitamins plus 30.0 g.L⁻¹ sucrose and 0.0, 0.25, 0.5 or 1.0 mg.L⁻¹ 6-benzilaminopurine (BAP). Cultures were maintained in a growth room with 25 ± 2 °C under cool white light (40 mol.m⁻².s⁻¹), with 16 hours photoperiod. The experimental design was completely randomized factorial arrangement with 4 x 4 (cropping systems x BAP concentrations in the middle). After cultivation in vitro shoots of each treatment were acclimatized. Biochemical and biometrics analysis were performed on the material in vitro and biometrics on the acclimatized material. The static culture on solid medium, provided more stability since the multiplication by the acclimatization of the seedlings, while the systems with liquid presented limitations in some stages of micropropagation. The vitrification and the presence of betacyanin can be used as quality indicators physiological of the Elephant Ear Mexicana and its potential for acclimatization.

Keywords: morphogenesis, oxidative stress, bioreactor, vitrification.

Introdução

Em função das condições ambientais, a pecuária tem se constituído ao longo do tempo em uma das principais atividades econômicas e desempenha um papel importantíssimo no sistema agropecuário nos 98 milhões de hectares semiáridos do Nordeste brasileiro. A palma forrageira adapta-se muito bem às condições climáticas e se constitui em destaque nesta região, onde nos últimos anos a cultura ocupava cerca de 600 mil hectares, colocando o Brasil como o país com maior área plantada com palma do mundo (Ferreira 2005; Santos et al 2006). Nos últimos anos, no entanto, vem ocorrendo o aumento de danos causados por pragas e doenças, o que resulta em sérios efeitos negativos sobre a produção desta forrageira. A alternativa encontrada para a convivência com o problema instalado na região é a utilização de novas espécies ou cultivares resistentes (Pimentia-Barrios e Muñoz-Urías 2001).

A disponibilização de mudas de novas cultivares melhoradas para plantio em campo pode ser acelerada mediante a multiplicação *in vitro*, uma vez que a propagação da palma é lenta (Vasconcelos et al 2007). Ademais, a propagação vegetativa convencional favorece a disseminação de patógenos, enquanto na cultura de tecidos as plantas micropropagadas estão livres de microrganismos patogênicos, são uniformes, apresentam excelente condição fisiológica e podem ser disponibilizadas durante todo o ano (Grattapaglia e Machado 1998).

A utilização de biorreatores de imersão temporária com meio líquido para micropropagação é vantajoso, entre outros motivos, por prevenir desordens fisiológicas de tecidos hiperídricos e reduzir os custos de produção (Mehrotra et al 2007).

Durante o cultivo *in vitro*, os explantes e as plantas são expostos a uma ampla gama de condições de estresse causado, principalmente, por fatores abióticos e podem acarretar um estresse oxidativo que levem as desordens e anomalias morfofisiológicas. Algumas enzimas e alguns metabólitos têm se mostrado determinantes na resposta antioxidativa ao estresse (Cassel e Cury 2001).

Esta pesquisa buscou caracterizar respostas metabólicas e fisiológicas da cultivar Orelha de Elefante Mexicana de *Opuntia stricta* Haw, submetida às diferentes formas de cultivo *in vitro* por meio de mensurações bioquímicas e fisiológicas. Essas variáveis permitem a identificação de sistemas estressantes para as vitroplantas contribuindo para o estabelecimento de um protocolo de propagação *in vitro* para esta espécie.

Material e métodos

O experimento foi conduzido na Biofábrica Governador Miguel Arraes do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE, em Recife, Pernambuco. Os explantes da cultivar Orelha de Elefante Mexicana da espécie de palma forrageira *Opuntia stricta* Haw foram provenientes de brotações induzidas in vitro a partir da coleta de cladódios jovens, com cerca de 15 cm de altura, formados em plantas matrizes mantidas em casa de vegetação (Fig 1). Os cladódios foram submetidos à desinfestação com álcool 70% por dois minutos, seguida da imersão em solução de hipoclorito de sódio 5% durante 15 minutos. A desinfestação foi finalizada com enxágues dos cladódios, duas vezes em água destilada e uma vez em solução de ácido cítrico 0,005%, ambas esterilizadas em autoclave a 121°C durante 20 minutos. Em seguida, os cladódios foram excisados em câmara de fluxo laminar para extração de segmentos com cerca de 2 x 2 cm contendo uma aréola (gema axilar) (Fig 1). As aréolas foram introduzidas in vitro em meio de estabelecimento composto pelos sais e vitaminas de MS (Murashige e Skoog 1962) suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de 6-Benzilaminopurina (BAP), 30 g.L⁻¹ de sacarose e 6,0 g.L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da esterilização do mesmo e dissolução do ágar. Os segmentos foram mantidos em sala de crescimento por 30 dias com irradiância de 40 μmol.m⁻².s⁻¹ fornecidos por luz branca fria, a 25±2°C e com 16 horas de fotoperíodo. Após esse tempo, os brotos provenientes das aréolas (Fig 1), com cerca de 2,0cm, foram excisados horizontalmente na base e no ápice, formando cilindros individualizados que foram utilizados nos experimentos constituindo os explantes. Estes foram incubados nos cultivos estáticos (CE) e no cultivo em biorreatores em sistema de imersão temporária (SIT) (Fig 1).

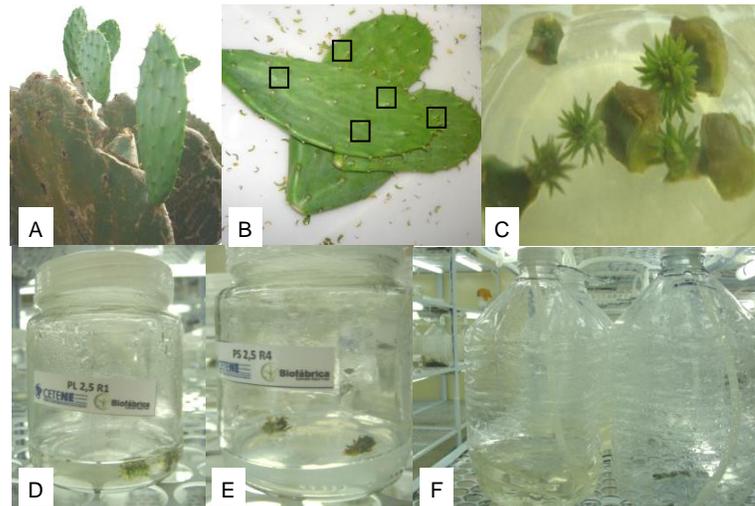


Fig 1. Palma forrageira (*Opuntia stricta* Haw cv. Orelha de Elefante Mexicana) submetida a distintos sistemas de cultivo in vitro. Plantas matrizes mantidas em telado (A); cladódios jovens com destaque de algumas aréolas (quadros negros) (B); brotos, provenientes das aréolas, 30 dias após introdução in vitro em meio de estabelecimento semi-sólido (C); explantes submetidos a sistemas estáticos líquido (D) e semi-sólido (E) e em sistema de imersão temporária (F).

Biorreator de imersão temporária

O sistema de imersão temporária é constituído por dois frascos conectados por tubos de silicone. Um dos frascos acondiciona o meio de cultura e no outro são incubados os explantes. Nesse sistema, o ar fornecido por um compressor é esterilizado ao passar por uma membrana de 0,22 μm (Millipore[®]), entra no frasco que contém o meio de cultura e essa pressão de ar bombeia o meio de cultura líquido fazendo com que chegue ao frasco que contém os explantes. O ar promove a renovação da atmosfera do frasco de cultivo. Após um tempo de imersão pré-estabelecido, ocorre reversão do processo: o meio nutritivo retorna ao frasco de armazenamento. A duração somada ao intervalo entre imersões (frequência) variaram conforme o tratamento. A frequência de imersões foi controlada por temporizadores eletrônicos e válvulas solenóides.

Condições de cultivo in vitro

Foram estabelecidos quatro diferentes sistemas de cultivo: micropropagação em sistema de imersão temporária – SIT, com baixa frequência de imersões (imersão de um minuto a cada 48 horas); SIT com alta frequência (imersão de cinco minutos a cada três horas); micropropagação convencional estática em meio semi-sólido (6,0 g.L^{-1} de ágar) (ES); micropropagação estática em meio líquido (EL) (Tabela 1). Os meios de cultivo para indução de multiplicação in vitro constaram dos sais e vitaminas MS acrescidos de 30,0 g.L^{-1} de sacarose e 0,0; 0,25; 0,5 ou 1,0 mg.L^{-1} de BAP conforme o tratamento (Tabela 1). O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8.

Tabela 1. Composição dos tratamentos a que foram submetidos os explantes de *Opuntia stricta* Haw cv. Orelha de Elefante Mexicana, quanto ao sistema de cultivo e a concentração de BAP no meio de cultura.

SISTEMA DE CULTIVO	BAP mg.L^{-1} (μM)			
	0 (0)	0,25 (1,1)	0,5 (2,2)	1,0 (4,4)
Imersão temporária de baixa frequência	SB 0	SB 0,25	SB 0,5	SB 1
Imersão temporária de alta frequência	SA 0	SA 0,25	SA 0,5	SA 1
Estático sólido	ES 0	ES 0,25	ES 0,5	ES 1
Estático líquido	EL 0	EL 0,25	EL 0,5	EL 1

Cada tratamento contou com quatro repetições, cada uma delas com 10 explantes, totalizando 40 explantes (brotos) por tratamento no início do experimento. No sistema estático (líquido ou sólido) foram colocados dois explantes por frasco de 250 mL, com 30 mL de meio de cultura e cada repetição foi constituída por cinco frascos. No cultivo em SIT, foram colocados 10 explantes por biorreator de 5.000 mL, contendo 1.000 mL de meio de cultura. Cada repetição constou de um biorreator. As culturas, em ambos os sistemas, foram mantidas em sala de crescimento durante 90 dias, sem realizar subcultivos, com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob luz branca fria ($40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e com 16 horas de fotoperíodo.

Coleta e preparo de amostras

Para as avaliações biométricas e bioquímicas foram realizadas amostragens de explantes, antes da submissão aos tratamentos indutores de multiplicação e de brotações tipo “clusters” (agregados de brotos) após 90 dias de cultivo. As amostras destinadas as análises bioquímicas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e conservadas em freezer a -20°C , até o momento das análises.

Material in vitro

Os explantes foram pesados no momento da inoculação junto com os recipientes, convencionais ou biorreatores. A massa dos recipientes era previamente conhecida e por diferença foi possível obter a massa fresca dos explantes no início dos tratamentos. Após 90 dias de cultivo, foram coletadas quatro brotações de cada repetição, aleatoriamente, e avaliaram-se os seguintes parâmetros biométricos com auxílio de paquímetro digital e balança analítica de precisão: número e altura (comprimento da base ao ápice) das brotações formadas iguais e superiores a 1 cm, massa fresca de parte aérea e das raízes e teor de umidade da parte aérea. A massa seca, para determinação do teor de umidade, foi obtida após a secagem da parte aérea em estufa, pelo método gravimétrico rápido, a 135°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$), deixando desidratar por uma hora, e esfriar em dessecador para posterior pesagem (Bezerra Neto e Barreto 2004).

Ao final dos 90 dias de cultivo, brotações com coloração avermelhada foram coletadas e submetidas a testes qualitativos para verificação de betacianinas. Para obtenção do extrato a ser utilizado nos testes para verificação das betacianinas, dois gramas de material vegetal foram macerados em almofariz com cerca de um a dois gramas de celite. Com a finalidade de remove a clorofila, após a maceração, cerca de 30 mL de acetona 70% foi adicionada e homogeneizada. Em seguida, esse material foi filtrado e transferido para um funil de separação ao qual foi adicionado clorofórmio na proporção 2:1 em relação ao volume do filtrado obtido. Após a separação das fases, a inferior (contendo pigmento verde) foi descartada e a superior (fase aquosa, contendo pigmento vermelho) foi utilizada nos testes para comprovar a presença de betacianinas de acordo com metodologia descrita por Harbone (1973). Os testes constaram de: teste 1- em um tubo de ensaio adicionar 2 mL do extrato da amostra e 2 mL de HCl 2 M, em seguida colocar o tubo em água fervente por 5 minutos; teste 2- em um tubo de ensaio adicionar 2 mL do extrato e em seguida gotear lentamente a solução de NaOH 2 M; teste 3- colocar o extrato obtido numa cubeta e proceder a varredura em espectrofotômetro na faixa de 350 a 700 nm (espectro visível).

Foram coletados explantes e brotações, no início e após 90 dias de cultivo, respectivamente. Os extratos proteicos de cada tratamento foram preparados utilizando 0,5 g de matéria fresca, que foram macerados em almofariz resfriado. As amostras foram meceradas em nitrogênio líquido, 0,05g de polivinilpirrolidona (PVP) e quatro mililitros de solução tampão fosfato pH 7,0. A determinação da atividade enzimática e a dosagem de proteína foram feitas utilizando o sobrenadante obtido após centrifugação do extrato bruto por 10 minutos a 10.000 RPM e 4°C . Os sobrenadantes foram conservados em freezer a -20°C . A leitura foi feita em espectrofotômetro, seguindo as metodologias ajustadas de Fatibello-Filho e Vieira (2002) para a determinação da peroxidase (POD), de Kar e

Mishra (1976) para a polifenoloxidase (PPO) e de Berris e Sizer (1952) para a catalase (CAT). A quantificação de proteínas solúveis do sobrenadante obtido foi determinada pelo método de Bradford (1976).

Estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em um fatorial 4 x 4 (quatro concentrações de BAP no meio de cultivo e quatro sistemas de cultivo) com quatro repetições por tratamento. Os dados da fase de multiplicação *in vitro* referentes ao número de brotos e a massa fresca média de brotos e raízes foram transformados por $X = \sqrt{X}$. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados dos tratamentos quantitativos (concentrações de BAP) foram analisados por meio de regressões polinomiais, gerando equações para os parâmetros avaliados. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico ASSISTAT 7.5 (Assis e Silva 2006).

Aclimatização

Após o período de cultivo *in vitro* foram coletadas, ao acaso, 24 brotações de cada tratamento para aclimatização em bandejas de isopor contendo células, com 30 mL de volume cada, foram preenchidas com substrato comercial do tipo Basaplant[®]. As mudas foram mantidas em telado com irrigação uma vez por dia e nebulização periódica de cinco minutos a cada seis horas, visando manter o substrato úmido e a umidade relativa do ar em 70%. Três meses após a transferência das plantas para casa de vegetação, foi contabilizado o percentual de sobrevivência e realizadas medições de altura e biomassa das mudas.

Resultados e discussão

Observou-se efeito significativo para o fator sistemas de cultivo e para sua interação com o fator concentrações de BAP sobre os parâmetros biométricos avaliados, após 90 dias de cultivo *in vitro* da palma forrageira cv Orelha de Elefante Mexicana. Para o fator concentrações de BAP, que tem tratamentos quantitativos, foram ajustadas equações de regressão para os parâmetros avaliados. O coeficiente de variação foi menor que 35 % em todas as variáveis.

Quinze dias após a inoculação observaram-se brotações provenientes de gemas axilares pré-existentes em explantes de todos os tratamentos. O número de brotos foi menor nos tratamentos sem BAP independente do sistema de cultivo (Fig 2 e Tabela 2), confirmando o papel das citocininas na regulação da divisão celular e morfogênese em tecidos de plantas, induzindo a formação de brotos e a proliferação de gemas laterais, uma vez que quebram a dominância apical (Mok et al 2000; Srivastava 2002; Diopan et al 2009). Resultados similares foram constatados em diferentes culturas (Lemos et al 2001; Oliveira et al 2007; Mata-Rosas et al 2010).

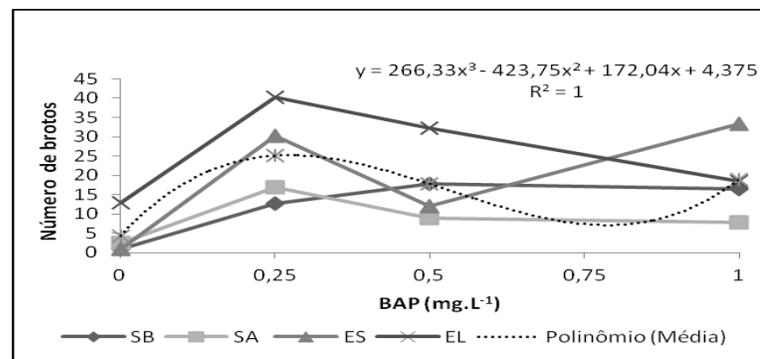


Fig 2. Número médio de brotos (NB) formados na multiplicação *in vitro* de *Opuntia stricta* Haw cv Orelha de Elefante Mexicana em meio MS em sistema de imersão temporária de baixa (SB) e alta (SA) frequência e em sistema estático em meio sólido (ES) e líquido (EL), sob distintas concentrações de BAP. Equação referente ao polinômio da média.

O estreito contato do tecido com o meio no sistema líquido facilita a absorção de nutrientes e fitormônios, levando a uma maior taxa de multiplicação. A supressão do agente gelificante do meio de cultura, a exemplo do ágar, além de favorecer a absorção dos componentes do meio contribui para a redução dos custos de produção das mudas micropropagadas em cerca de 70% (Junghans e Souza 2009) e este é um dos desafios na micropropagação de plantas em larga escala (Mehrotra et al 2007).

A adição de 0,25 mg.L⁻¹ de BAP ao meio de cultivo no sistema EL promoveu a maior média de formação de brotos (40,25), superando a dos demais tratamentos. Nesse sistema (EL) o aumento da concentração de BAP levou a uma diminuição no número de brotações, embora tenha se mantido superior a maioria dos demais tratamentos (Tabela 2). O número de brotos formados no sistema estático sólido (ES = 33,25) foi bastante superior aos resultados registrados por Escobar (1986) e Vasconcelos et al (2007), que obtiveram em *Opuntia amyloacea* e *Nopalea cochenillifera*, respectivamente, uma média 15 brotos por explante cultivado em meio sólido. Deve-se levar em

consideração que esses autores trabalharam com outras espécies de palma, realizaram corte longitudinal nos explantes e utilizaram meio de cultura de diferente composição.

Tabela 2. Número médio de brotos (NB) formados na multiplicação in vitro de *Opuntia stricta* Haw cv Orelha de Elefante Mexicana em meio MS em sistema de imersão temporária de baixa (SB) e alta (SA) frequência e em sistema estático em meio sólido (ES) e líquido (EL), sob diferentes níveis de BAP.

Sistemas de cultivo	BAP mg.L ⁻¹ (µM)				Média
	0 (0)	0,25 (1,1)	0,5 (2,2)	1,0 (4,4)	
SB	1,0 B*	12,75 C	17,75 AB	16,5 BC	12,00 C
SA	2,5 B	17,0 BC	9,0 B	7,75 C	9,06 C
ES	1,0 B	30,25 AB	12,0 B	33,25 A	19,12 B
EL	13,0 A	40,25 A	32,25 A	18,5 AB	26,00 A
Média	4,37	25,06	17,75	19,00	

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

A cultura de tecidos, como técnica de propagação vegetativa, necessita ser adaptada às necessidades das espécies e cultivares, pois estas diferem geneticamente entre si, podendo apresentar resultados diferentes sob as mesmas condições de cultivo (Fogaça et al 2006; Silva et al 2007). O uso de citocinina estimula a formação de parte aérea, entretanto seu excesso pode ser tóxico e resultar na inibição das brotações, conforme o sistema de cultivo e a disponibilidade de absorção pelo tecido vegetal. Esse efeito também foi observado por Fogaça et al (2006) em plântulas de *Agapanthus umbellatus* multiplicadas em concentrações acima de 17,8 µM de BAP, as quais apresentaram sintomas de fitotoxicidade e diminuíram severamente a emissão de brotações. O excesso de citocinina pode incrementar a ação da citocinina-oxidase, impedindo a atuação do fitormônio sobre a divisão celular e, conseqüentemente, inibindo a indução de brotações (Barrueto Cid 2000). Nos tratamentos em que foi maior a disponibilidade de BAP e o contato da citocinina com o tecido vegetal, como proporcionado pelos cultivos com alta frequência de imersão (SA) ou em sistema estático em meio líquido (EL), a queda na emissão de brotações, com o incremento da concentração de BAP, chegou aos 55%. Diminuindo a disponibilidade do BAP no meio, seja pelo acréscimo de ágar, como no tratamento ES, seja pela redução na frequência de imersão (SB), foi possível reduzir o efeito fitotóxico mesmo com o aumento da concentração de BAP no meio, como pode ser observado pela manutenção da taxa de emissão de brotos e pela menor ocorrência de hiperidricidade, como será discutido mais adiante.

A ausência do BAP favoreceu o aumento na altura dos brotos (AB) em todos os sistemas de cultivo (Fig 3). A altura média de 22,02 mm nos brotos cultivados sem BAP foi quase duas vezes superior aos valores obtidos quando os explantes foram mantidos em meio com as concentrações de 0,25 (12,77 mm); 0,50 (11,30 mm) e 1,0 mg.L⁻¹(12,45 mm) (Tabela 3). Aliyu e Mustapha (2007), trabalhando com *Opuntia ficus-indica*, registraram alturas de 12,2 e 12,3 mm nas concentrações de 1,0 e 1,25 mg.L⁻¹ de BAP, respectivamente. Em diversas espécies tem sido observado que a exposição de explantes a alta concentração de BAP pode levar ao acúmulo de citocinina, o que inibe o crescimento da parte aérea (Malik et al 2005; Villa et al 2005; Lemos et al 2001). No cultivo em sistema estático com meio líquido (EL) a redução na altura dos brotos em função do acréscimo de BAP no meio de cultura foi menos

acentuada do que nos demais tratamentos (Fig 3), enquanto que no SA a altura dos brotos caiu cerca de 60% no tratamento com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP em relação ao tratamento sem a citocinina neste sistema.

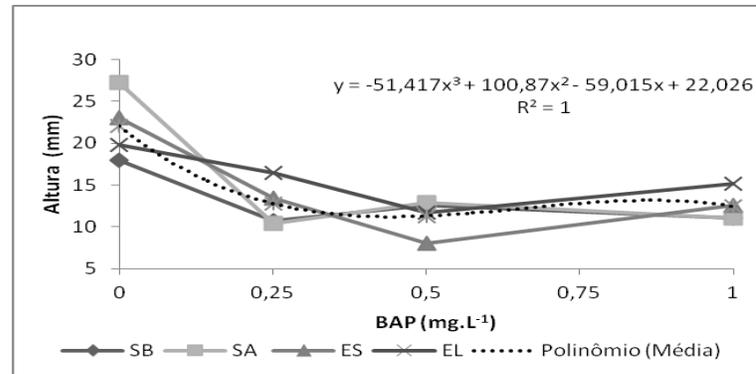


Fig 3. Altura média de brotos (AB) formados na multiplicação in vitro de *Opuntia stricta* Haw cv Orelha de Elefante Mexicana em meio MS em sistema de imersão temporária de baixa (SB) e alta (SA) frequência e em sistema estático em meio sólido (ES) e líquido (EL), sob distintas concentrações de BAP. Equação referente ao polinômio da média.

Vale salientar, entretanto, que no cultivo em SA sem BAP a altura dos brotos superou a de todos os demais tratamentos (Tabela 3). Ziv (2005) destacou a importância do cultivo líquido devido à disponibilidade de nutrientes e reguladores de crescimento, e salientou que o cultivo no biorreator pode ser mais eficaz no controle da proliferação e do potencial de regeneração devido ao contato direto das células da planta e agregados com o meio.

Tabela 3. Altura média de brotos (AB) formados na multiplicação in vitro de *Opuntia stricta* Haw cv Orelha de Elefante Mexicana em meio MS sob distintas concentrações de BAP e em sistemas de imersão temporária de baixa (SB) e alta (SA) frequência e em estático sólido (ES) e líquido (EL).

Sistemas de cultivo	BAP mg.L ⁻¹ (μM)				Média
	0(0)	0,25 (1,1)	0,5 (2,2)	1,0 (4,4)	
SB	17,94 C*	10,78 BC	12,54 A	11,07 B	13,08 C
SA	27,29 A	10,42 C	12,93 A	11,05 B	15,42 AB
ES	23,08 B	13,42 B	8,0 B	12,53 AB	14,26 BC
EL	19,78 C	16,45 A	11,74 A	15,16 A	15,78 A
Média	22,02	12,76	11,30	12,45	

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

O tamanho dos brotos deve ser levado em consideração porque brotos com tamanho reduzido dificultam a individualização durante a repicagem e requerem mais tempo de permanência in vitro durante a fase de enraizamento (Lima e Moraes 2006), além do que a produção de brotos maiores pode proporcionar maior sobrevivência das mudas durante o processo de aclimatização (Escalona et al 1999).

No cultivo em sistema de imersão temporária de alta frequência (SA) a produção de matéria fresca dos brotos (MFB) superou os demais tratamentos na maioria das concentrações de BAP (Fig 4). Considerando as médias de cada concentração de BAP, o maior valor de MFB (556 mg) foi obtido em brotos mantidos em meio sem BAP (Tabela 4).

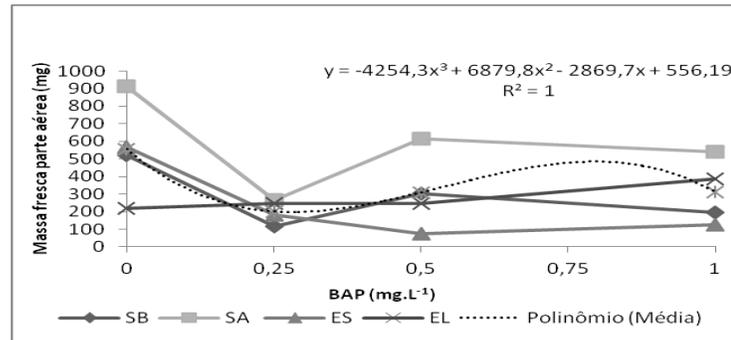


Fig 4. Massa fresca média por broto (MFB) formado na multiplicação in vitro de *Opuntia stricta* Haw cv Orelha de Elefante Mexicana em meio MS em sistema de imersão temporária de baixa (SB) e alta (SA) frequência e em sistema estático em meio sólido (ES) e líquido (EL), sob distintas concentrações de BAP. Equação referente ao polinômio da média.

Entre sistemas, o SA obteve a maior MFB em todas as concentrações de BAP no meio, com média geral de 583 mg, alcançando 913 e 615 mg nas concentrações de 0,0 e 0,5 mg.L⁻¹ de BAP no meio, ambos diferindo estatisticamente dos demais sistemas. Considerando que a massa fresca média dos explantes utilizados no início do experimento foi de 149 mg, o sistema SA proporcionou um aumento na massa fresca de até 6,13 vezes. Entre as médias de MFB dos sistemas de cultivo ES, EL e SB não houve diferença estatística significativa (Tabela 4). O sistema SA proporcionou incremento de até 542 mg (8,4 vezes maior) da variável MFB em relação ao sistema ES, na concentração de 0,5 mg.L⁻¹ de BAP no meio. Tal sistema, através da eliminação do ágar, além de promover maior incremento de massa fresca, pode reduzir os custos da micropropagação, como ocorrido com cana-de-açúcar em 46% (Lorenzo et al 1998) e com abacaxi em 20% (Escalona et al 1999).

Tabela 4. Massa fresca média por broto (MFB) formado na multiplicação in vitro de *Opuntia stricta* Haw cv Orelha de Elefante Mexicana em meio MS sob distintas concentrações de BAP e em sistemas de imersão temporária de baixa (SB) e alta (SA) frequência e em estático sólido (ES) e líquido (EL).

Sistemas de cultivo	BAP mg.L ⁻¹ (μM)				Média
	0 (0)	0,25 (1,1)	0,5 (2,2)	1,0 (4,4)	
SB	521 BC*	115 A	305 B	195 BC	284 B
SA	913 A	264 A	615 A	541 A	583 A
ES	570 B	182 A	73 C	124 C	237 B
EL	220 C	248 A	245 B	388 AB	275 B
Média	556	202	309	311	

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

Produções de biomassa mais elevadas em sistemas de imersão temporária têm sido descritas em várias culturas (Feuser et al 2001; Lemos et al 2001; Lemos 2009b), resultando em acréscimo de biomassa de 3 a 6 vezes em 3–4 semanas (Ziv, 2005). E altas frequências de imersão têm contribuído na elevação dos ganhos de matéria fresca como apresentado por Rodrigues et al (2006) em *Heliconia champneiana* Griggs cv. Splash, submetidas à frequência de imersão a cada hora. Os autores atribuem estes resultados ao fato do maior contato do meio líquido

com os explantes, proporcionando uma maior área de absorção e, conseqüentemente, melhor aproveitamento do meio de cultura. Diferentemente, do sistema tradicional, onde o meio de cultura utilizado é semisólido, limitando a área de contato com o meio à base da planta.

A adição de BAP ao meio de cultura inibiu o enraizamento dos brotos, independente do sistema de cultivo (Fig 5). As brotações mantidas no tratamento ES sem BAP apresentaram a maior biomassa fresca de raiz. Após 15 dias de tratamento, já havia presença de raízes nos explantes cultivados em meios isentos de BAP (Fig 6), ao passo que outros tratamentos em que houve formação de raiz elas surgiram aos 60 dias.

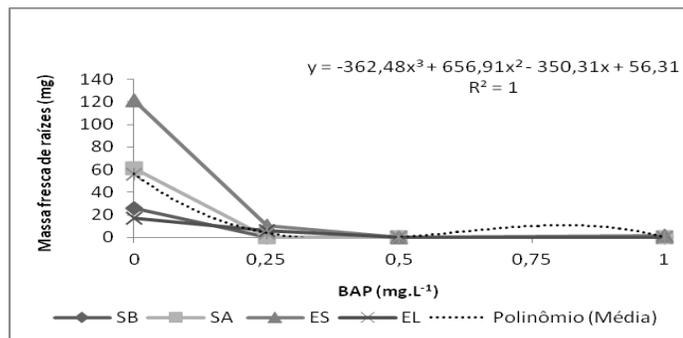


Fig 5. Massa fresca de raízes (MFR) formadas na multiplicação in vitro de *Opuntia stricta* Haw cv Orelha de Elefante Mexicana em meio MS em sistema de imersão temporária de baixa (SB) e alta (SA) frequência e em sistema estático em meio sólido (ES) e líquido (EL), sob distintas concentrações de BAP. Equação referente ao polinômio da média.

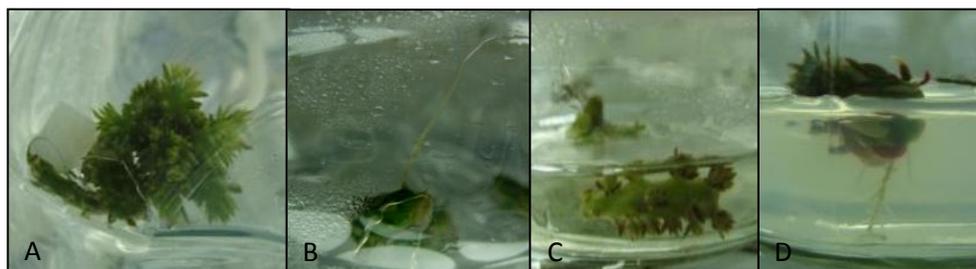


Fig 6. Formação de raízes em brotos de *Opuntia stricta* Haw cv. Orelha de Elefante Mexicana regenerados a partir de gemas axilares pré-existentes em explantes cultivados em sistemas de imersão temporária (A, B) e estáticos (C – meio líquido; D – meio sólido) aos 15 dias após o início do cultivo em meio MS sem BAP.

As brotações cultivadas em meio MS com 0,25 mg.L⁻¹BAPformaram raízes apenas quando mantidas no sistema estático. Quando o cultivo foi em meio sólido a biomassa fresca foi quase o dobro daquela das raízes das brotações em meio líquido. Nas demais concentrações de BAP não houve formação de raízes (Tabela 5).

Tabela 5. Massa fresca de raízes (MFR) formadas na multiplicação in vitro de *Opuntia stricta* Haw cv Orelha de Elefante Mexicana em meio MS sob distintas concentrações de BAP e em sistemas de imersão temporária de baixa (SB) e alta (SA) frequência e em estático sólido (ES) e líquido (EL).

Sistemas de cultivo	BAP mg.L ⁻¹ (μ M)				Média
	0(0)	0,25 (1,1)	0,5 (2,2)	1,0 (4,4)	
SB	26 C*	0 B	0 A	0 A	6 C
SA	61 B	0 B	0 A	0 A	15 B
ES	121 A	10 A	0 A	0 A	33 A
EL	17 C	6 A	0 A	0 A	6 C
Média	56	4	0	0	

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

O BAP ou seus metabólitos podem inibir o desenvolvimento radicular. Microestacas cultivadas em meio com BAP apresentaram elevada concentração de 6-Benzilaminopurina-9-glucosídeo (BAP9G), um metabólito do BAP apontado como provável responsável pela inibição de enraizamento e consequentes problemas de aclimatização (Malá et al 2009). A presença de citocininas é essencial para a indução da divisão celular no início da formação radicular (De Klerk et al 2001), mas em contraste com auxinas, níveis mais altos de citocininas inibem o enraizamento adventício (Bollmark et al 1988). Na cactácea *Nopalea cochenillifera* Salm Dyck a promoção do enraizamento dos explantes tem sido evidenciada em meio de cultura MS básico sem reguladores de crescimento (Vasconcelos et al 2007).

O teor de umidade nos brotos (UB) foi maior quando cultivados em sistema estático com meio líquido, independente da concentração de BAP (Fig 7). O meio líquido em biorreatores de imersão temporária combina a aeração dos tecidos, promovendo a renovação da atmosfera dos frascos de cultura, e o contato das plântulas com o meio de cultura líquido, com uma frequência e tempo de imersão pré-estabelecidos (Fogaça et al 2006).

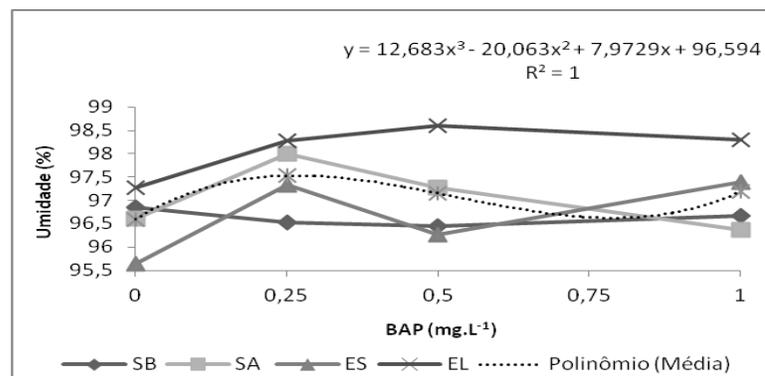


Fig 7. Teor de umidade de brotos (UB) formados na multiplicação in vitro de *Opuntia stricta* Haw cv Orelha de Elefante Mexicana em meio MS em sistema de imersão temporária de baixa (SB) e alta (SA) frequência e em sistema estático em meio sólido (ES) e líquido (EL), sob distintas concentrações de BAP. Equação referente ao polinômio da média.

Silva et al (2007) afirmaram que a absorção de água aumenta em função da disponibilidade no meio, entretanto, comparando o efeito isolado dos sistemas de cultivos nos tratamentos sem BAP, observa-se que os brotos cultivados em SIT com alta e baixa frequência apresentaram percentagem de umidade superior ao ES e inferior ao sistema EL, demonstrando que tanto a disponibilidade de água como a aeração do meio têm efeito direto no teor de umidade dos tecidos (Tabela 6). Os resultados obtidos indicam que no cultivo em meio líquido com sistema de imersão temporária, a troca gasosa existente a cada imersão deve proporcionar uma maior transpiração pelas brotações formadas e uma maior perda de água em relação aos brotos cultivados no sistema estático líquido.

Tabela 6. Teor de umidade de brotos (UB) formados na multiplicação in vitro de *Opuntia stricta* Haw cv Orelha de Elefante Mexicana em meio MS sob distintas concentrações de BAP e em sistemas de imersão temporária de baixa (SB) e alta (SA) frequência e em estático sólido (ES) e líquido (EL).

Sistemas de cultivo	BAP mg.L ⁻¹ (µM)				Média
	0 (0,0)	0,25 (1,1)	0,5 (2,2)	1,0 (4,4)	
SB	96,9 B*	96,5 C	96,5 C	96,7 C	96,6 C
SA	96,6 B	98,0 A	97,3 B	96,4 C	97,0 B
ES	95,7 C	97,3 B	96,3 C	97,4 B	96,6 C
EL	97,3 A	98,3 A	98,6 A	98,3 A	98,1 A
Média	96,5	97,5	97,1	97,1	

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

No sistema SA, no qual a frequência e a superfície de contato das brotações com o regulador de crescimento é maior, a hiperidricidade surgiu em brotos cultivados a partir da menor dose de BAP (0,25 mg.L⁻¹), enquanto que nos demais sistemas de cultivo só foram observados brotos hiperídricos na mais alta concentração de BAP (1,0 mg.L⁻¹). Estes brotos apresentaram formato arredondado, translúcidos, parcialmente cobertos com um padrão irregular de podárias (estruturas efêmeras que correspondem a folha, que logo seca e cai) suculentas, aquosos e cloróticos, como descrito por Balen et al (2009) para a cactácea *Mammillaria gracilis*. Sem a presença do BAP no meio de cultura os brotos tiveram aspecto normal (talo cilíndrico e podárias finas) (Fig 8). A hiperidricidade é apontada como uma resposta a fatores de estresse simultâneos (Kevers et al 2004) que parece estar correlacionada com a disponibilidade de água e é desencadeada pelo desequilíbrio dos componentes do meio de cultura, em especial dos reguladores de crescimento (Joyce et al 2003). O elevado conteúdo de citocininas é uma das alterações bioquímicas encontradas em tecidos hiperídricos (Kevers et al 2004). Bornman & Vogelmann (1984) há muito relataram que os efeitos indesejáveis de uma condição hiperídrica podem ser suavizados reduzindo a dose de citocininas.

Apesar de o BAP ser apontado como uma das citocininas que exerce menor efeito na indução da hiperidricidade quando comparado a citocininas sintéticas derivadas de feniluréia como o tidiazuron – TDZ (Kadota e Niimi 2003), o aumento da concentração no meio e a maior disponibilidade de absorção pelos tecidos em cultivo contribuíram para o desenvolvimento da desordem fisiológica. Outro destaque para o efeito do BAP refere-se ao fato de que entre os diferentes sistemas sem a citocinina no meio de cultivo, mesmo havendo um maior teor de água nos brotos (sistema EL), nenhuma brotação apresentou hiperidricidade. O elevado conteúdo de água nos tecidos

hiperídricos é descrito por alguns autores como responsável pelo aumento no espaço intercelular que acarreta uma hipertrofia e o aspecto vítreo que sugere excesso de água (Delarue et al 1997; Picoli et a. 2001).

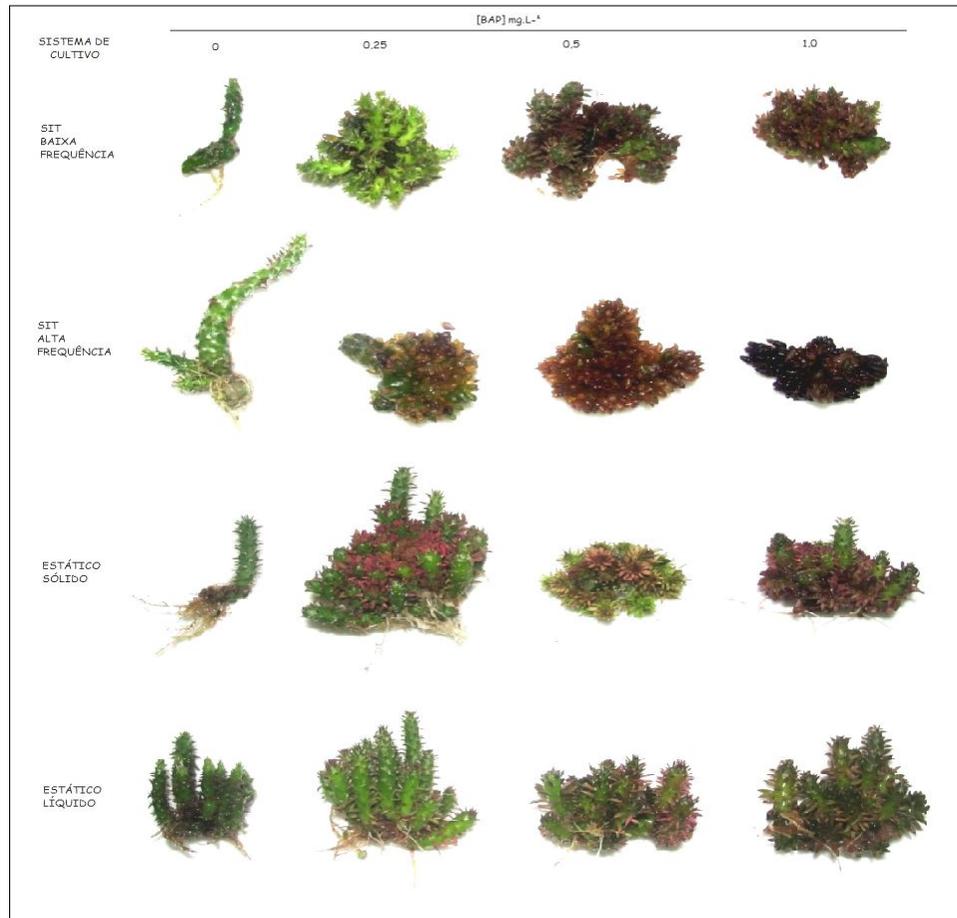


Fig 8. Micropropagação da palma forrageira *Opuntia stricta* Haw cv. Orelha de Elefante Mexicana: aspecto visual de brotações, após 90 dias de cultivo, submetidas a diferentes sistemas de cultivo e concentrações de BAP no meio.

Os sintomas visuais de hiperidricidade podem ser um importante indicativo da qualidade das mudas de palma forrageira *Opuntia stricta* Haw cv Orelha de Elefante Mexicana, pois os brotos identificados com características hiperídricas tiveram os menores percentuais de sobrevivência na aclimatização, como será discutido mais adiante (Tabela 8). A hiperidricidade é apontada como um dos maiores problemas na cultura de tecidos de plantas pelos efeitos negativos no vigor dos brotos e consequentes perdas impostas na transferência de plantas micropropagadas para as condições *ex vitro*. Na micropropagação comercial de plantas, existem relatos de que mais de 60 % dos brotos ou plantas cultivadas apresentaram hiperidricidade, o que reflete a intensidade deste problema (Wu et al 2009).

Os explantes que foram submetidos à presença de BAP, independente do sistema de cultivo, formaram brotos que exibiram pigmentação de cor violeta, principalmente nas podárias (Fig 8), que são normalmente verdes.

Os testes realizados com esses brotos confirmaram a presença de betacianinas nos tecidos da palma cultivada in vitro (Fig 9). As betacianinas são pigmentos violeta que pertencem a classe das betalainas (pigmentos vegetais nitrogenados, que compreendem também as betaxantinas, pigmentos amarelados ou alaranjados). Os brotos que exibiram coloração violeta foram submetidos a testes para confirmar a presença de betacianinas, conforme descritos por Harbone (1973). No primeiro teste a coloração avermelhada do extrato desapareceu após adição de HCl 2 M e aquecimento em banho Maria fervente por cinco minutos. No teste dois, a coloração mudou para o amarelo após ter sido acrescido NaOH 2M ao extrato, enquanto que, no teste três, após varredura em espectrofotômetro na faixa de comprimento de onda de 350 a 700 nm (espectro visível), o pico da absorbância foi de 0,652 no comprimento de 539,50nm (Fig 9). Segundo Harbone (1973), os três testes são necessários e devem apresentar como características determinantes para a presença de betacianinas o desaparecimento da coloração, a modificação para a cor amarela e o pico máximo de absorbância na faixa de 532 a 554nm, respectivamente.

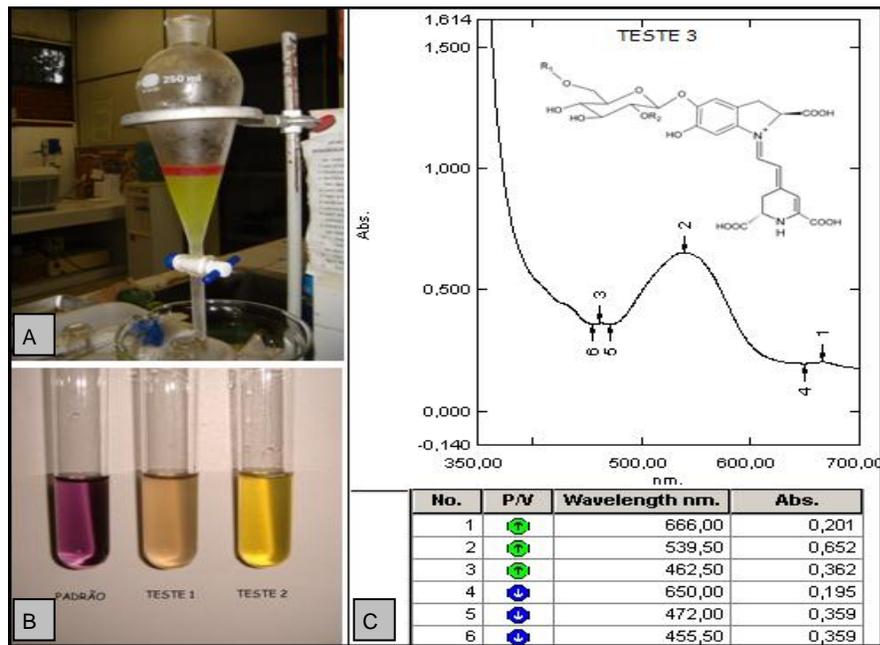


Fig 9. Betacianinas: separação de fases entre as betacianinas (coloração violeta) hidrossolúveis e os pigmentos lipossolúveis (A); testes para comprovação da presença de betacianinas com a descoloração da cor padrão no teste 1 e alteração na coloração para o amarelo no teste 2 (B); no teste 3, com o detalhe da estrutura geral da betacianina, é possível visualizar o pico no ponto 2, com absorbância de 0,652 no comprimento de onda de 539,50 nm.

Em condições de campo, Castellar et al (2003) analisaram o conteúdo das betalainas de três espécies do gênero *Opuntia*. Ambos os pigmentos, betacianinas e betaxantinas, foram identificados em frutos de *O. undulata* e *O. ficus-indica*, enquanto que em *O. stricta*, apenas betacianinas foram detectadas. Conforme o mesmo autor, entre as três espécies, a *O. Stricta* mostrou maior produção dos pigmentos com o maior teor de betacianina (0,08%). Georgiev et al (2008), em uma revisão sobre a produção de betalainas em sistemas in vitro de plantas, relatam a ação dos reguladores de crescimento sobre a produção de betacianinas, e destacam que a influência dos reguladores varia

conforme a cultura, nível de diferenciação celular, dose e tipo dos reguladores nos sistemas de cultivo in vitro. Moreno et al (2008) destacaram o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a luminosidade e a salinidade entre os fatores que causam acúmulo de betacianina, demonstrando a relação entre o estresse imposto as plantas e a produção desses metabólitos. Sepúlveda-Jiménez et al (2004) sugerem que espécies reativas de oxigênio (ERO) podem atuar como sinais capazes de induzir a síntese de betacianina que, por sua vez, podem atuar como sequestradores de ERO, limitando danos causados em tecidos de plantas. As tirosinases, enzimas do tipo das polifenoloxidasas, catalisam a hidroxilação de fenóis para difenóis (CE 1.14.18.1; monofenol: mono-oxigenase) e sua subsequente oxidação para *o*-quinonas (CE 1.10.3.1.; *o*-difenol: oxigênio oxidoreductase) e estão especificamente envolvidas na biossíntese de betalaínas em plantas superiores (Kaim and Rall 1996; Steiner et al 1999). Uma função protetora pode ser atribuída a esta rota em muitas plantas em reação ao estresse (Strack et al 2003). O envolvimento da atividade da tirosinase na biossíntese de betalaínas também foi indicado pela detecção de transcritos de PPO correlacionados com acúmulo de betacianina em frutos de *Phytolacca americana* (Joy et al 1995).

A produção de betacianinas, evidenciada principalmente nas altas concentrações de BAP e no cultivo em SIT com alta frequência (SA), pode ter sido a via de equilíbrio redox adotada pelos brotos submetidos a essas condições de cultivo, mas pode também ser uma sintomatologia do nível excessivo de estresse das plantas, uma vez que a aparente maior formação de betacianinas aconteceu em brotações de palma desenvolvidas no sistema SA com BAP e comprometeu a sobrevivência na etapa de aclimatização (Tabela 8).

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey para o efeito isolado dos sistemas de cultivo e na interação entre este fator e as concentrações de BAP nas variáveis teor de proteína solúvel (PS) e atividades de catalase (CAT), peroxidase (POD), peroxidase do ascorbato (APX) e polifenoloxidase (PPO), aos 90 dias após a indução da multiplicação in vitro da palma. De uma maneira geral, o teor de proteína foi mais elevado em brotos cultivados no sistema SA do que nos demais sistemas (Tabela 7). A presença de BAP no meio de cultura promoveu um acréscimo no teor de PS dos brotos no sistema SA enquanto que no cultivo em meio estático líquido (EL) o teor de PS caiu. Este resultado diverge daqueles descritos por Wu et al (2009), que observaram uma redução de 47,36% no teor de proteínas em brotações hiperídricas, semelhantes às brotações formadas no sistema SA com BAP no meio. Várias pesquisas constataram que estresses bióticos ou abióticos levam a uma alteração no padrão de expressão de proteínas das plantas, podendo ocorrer tanto a inibição quanto a indução da biossíntese de determinados constituintes protéicos (Soares e Machado 2007). Quando o sistema de defesa induzido é ativado, ele inclui a rápida geração de espécies reativas de oxigênio, alterações em polímeros da parede celular, síntese de metabólitos de baixo peso molecular e a produção de novas classes de proteínas relacionadas com a defesa celular (Shewry e Lucas 1997).

Em todos os tratamentos utilizados, a atividade das enzimas CAT, POD, APX e PPO foi superior nas brotações aos 90 dias de cultivo in vitro do que nos explantes no momento da inoculação. Desde a inoculação in vitro e ao longo dos sucessivos subcultivos, as plantas, ou mais frequentemente os explantes, são submetidos sucessiva e/ou simultaneamente a condições ambientais e culturais incomuns que acarretam alterações nas vias metabólicas e incrementam a geração de ERO (Gaspar et al 2002; Misra et al 2010). As plantas possuem um complexo sistema

antioxidativo constituído por enzimas e metabólitos antioxidativos (Dewir et al 2006) que podem ser capazes de prevenir o acúmulo de ERO e o estresse oxidativo (Saher et al 2004).

Tabela 7. Valores médios do teor de proteínas (mg.g^{-1} massa fresca) e das atividades específicas (U.mg^{-1} de proteína) da catalase (CAT), peroxidase (POD), peroxidase do ascorbato (APX) e polifenoloxidase (PPO) em explantes da palma forrageira *Opuntia stricta* Haw cv Orelha de Elefante Mexicana antes da inoculação e aos 90 dias de cultivo em sistemas de cultivo de imersões temporárias de baixa (SB) e alta frequência (SA) e estáticos sólidos (ES) e líquidos (EL) e com diferentes níveis de BAP no meio de cultura.

Sistemas de cultivo	Variáveis analisadas				
	Proteína	CAT	POD	APX	PPO
BAP 0 mg.L^{-1} ($0 \mu\text{M}$)					
SB	1,60 B*	60,45 A	25,28 AB	1045,73 A	552,72 A
SA	3,14 A	24,10 B	6,81 C	618,91 C	258,08 C
ES	1,84 B	54,01 A	28,74 A	871,65 AB	465,49 AB
EL	2,24 B	23,76 B	20,60 B	840,41 BC	405,13 B
BAP $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ ($1,1 \mu\text{M}$)					
SB	3,36 A	33,30 B	8,70 C	593,62 C	225,69 C
SA	3,07 A	34,40 B	16,13 C	498,09 C	326,68 C
ES	1,75 B	27,49 B	32,71 B	854,27 B	447,73 B
EL	1,03 B	71,94 A	55,63 A	1160,79 A	805,13 A
BAP $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ($2,2 \mu\text{M}$)					
SB	2,46 B	52,62 A	7,60 C	631,48 B	370,82 B
SA	4,05 A	24,96 B	11,95 BC	332,70 C	218,74 C
ES	3,12 B	13,81 B	16,60 B	485,23 BC	284,42 BC
EL	0,81 C	57,22 A	66,38 A	1091,37 A	965,38 A
BAP $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ($4,4 \mu\text{M}$)					
SB	1,95 B	53,80 A	23,61 B	815,11 A	405,39 A
SA	4,73 A	27,24 C	11,43 C	357,69 B	221,62 B
ES	1,91 B	43,66 B	24,10 B	849,69 A	452,13 A
EL	1,47 B	45,16 B	39,08 A	946,52 A	482,84 A
Sistemas de cultivo					
SB	2,15 B	50,04 A	16,30 C	771,48 B	388,65 B
SA	3,75 A	27,68 C	11,58 D	451,85 C	256,28 C
ES	2,16 B	34,74 B	25,54 B	765,21 B	412,44 B
EL	1,39 C	49,52 A	45,43 A	1009,77 A	664,62 A
EXPLANTES	4,43	12,03	6,01	330,18	197,79

*médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg.L^{-1} de BAP as brotações cultivadas no sistema SA apresentaram as menores atividades enzimáticas quando comparadas com as dos demais sistemas de cultivo (Tabela 7). Tem sido relatado que as atividades da superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) foram significativamente maiores em tecidos hiperídricos que em tecidos normais (Wu et al 2009). Por outro lado, as baixas atividades das enzimas antioxidativas das brotações do tratamento SA nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg.L^{-1} de BAP (Fig 10) coincidiram com a maior ocorrência de brotos hiperídricos (Fig 8), sugerindo que o nível de estresse nesses tratamentos superou a ação do sistema antioxidativo e favoreceu a síndrome de hiperidricidade. Problemas relativos à qualidade fisiológica de plantas, células, tecidos e órgãos cultivados in vitro, tais como hiperidricidade, têm sido diagnosticados como consequência de estresse oxidativo ocasionado por diversos fatores abióticos, que acarretam o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Cassels e Cury 2001). As enzimas e os metabólitos do sistema antioxidativo são bastante sensíveis às condições de estresse abiótico servindo

como sinalizadoras do estresse. O melhor entendimento das bases fisiológicas e bioquímicas da hiperidricidade em relação à reação ao estresse é de grande interesse para prevenir anormalidades (Wu et al 2009).

Na ausência de BAP a atividade de CAT, POD, APX e PPO em brotações cultivadas no sistema ES foi maior que em brotações no sistema SA (Tabela 7) (Fig 10). As menores atividades enzimáticas encontradas em brotações do sistema SA sem BAP no meio coincidiram com maiores valores de altura e massa fresca de brotos, comprovando que este sistema foi mais favorável ao crescimento de brotações da palma in vitro e que o BAP foi o principal indutor de estresse ocasionando a hiperidricidade.

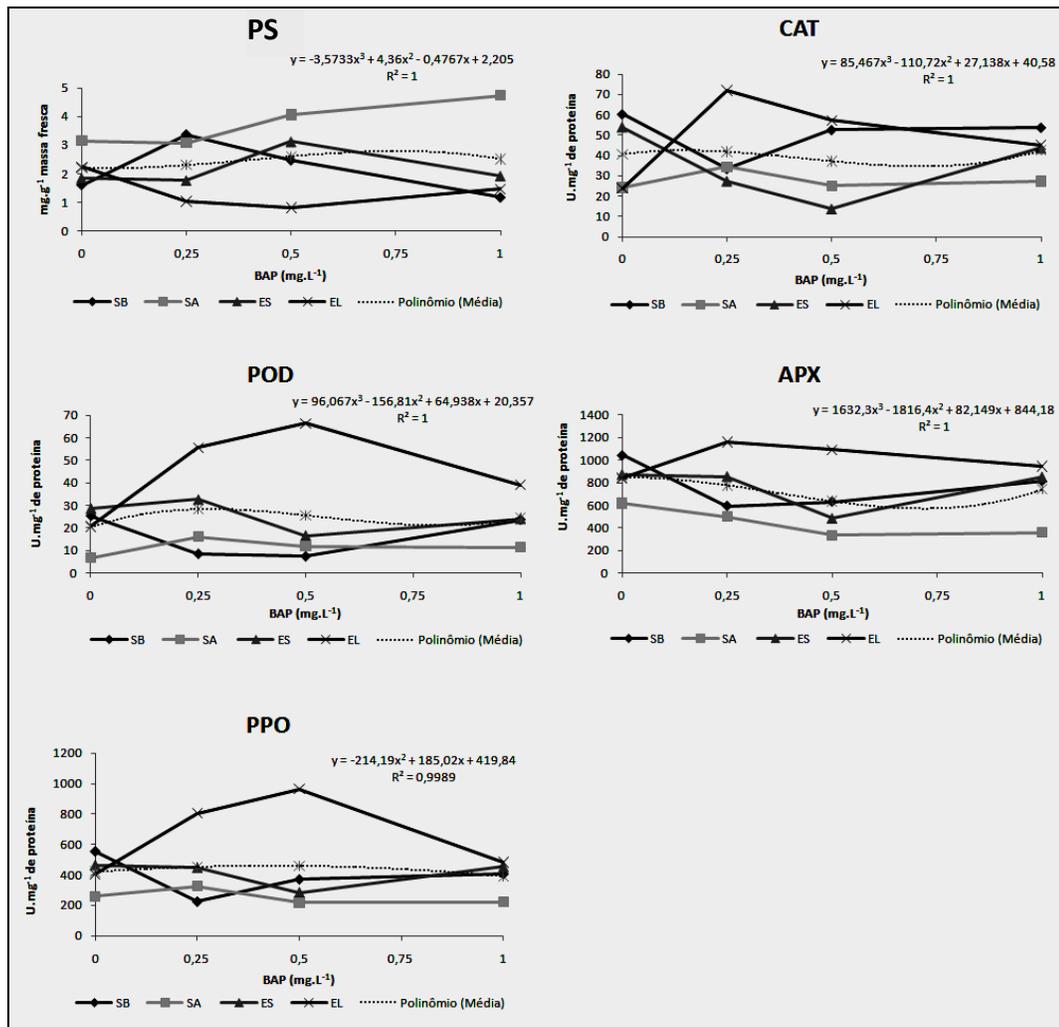


Fig 10. Teor de proteínas solúveis (PS) e comportamento das atividades enzimáticas da catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e polifenoloxidase (PPO), na multiplicação in vitro da palma forrageira *Opuntia stricta* Haw cv Orelha de Elefante Mexicana, com diferentes níveis de BAP no meio de cultura e em sistemas de cultivo de imersões temporárias de baixa (SB) e alta frequência (SA) e estáticos sólidos (ES) e líquidos (EL). Equações referentes aos polinômios das médias.

O sucesso de um protocolo de regeneração in vitro depende diretamente da sobrevivência e desenvolvimento ex vitro das plantas micropropagadas (Joshi e Dhar 2003). Passados 90 dias da aclimatização, as

mudas provenientes dos sistemas SA, ES e EL em meio sem BAP apresentaram os maiores resultados de percentagem de sobrevivência (acima de 95%), altura e biomassa fresca em relação às mudas provenientes do sistema SB (Tabela 8). Dentre os diferentes sistemas com meio isento de BAP, o SA produziu as mudas que mais se destacaram na aclimatização quanto à altura e biomassa, com 11 mm e 2,14 g, respectivamente, a mais do que as mudas provenientes do sistema convencional ES (Tabela 8).

Tabela 8. Percentual de sobrevivência ex vitro, altura e biomassa fresca por muda de palma forrageira *Opuntia stricta* Haw cv. Orelha de Elefante Mexicana micropropagada, 90 dias após a aclimatização.

Sistema de cultivo	BAP mg.L ⁻¹ (μM)	sobrevivência %	Altura média (mm)	Biomassa média (g)
Imersão temporária de baixa frequência (SB)	0,0 (0)	79	43 ± 11,44*	2,05 ± 0,772*
	0,25(1,1)	96	46 ± 10,85	1,99 ± 0,794
	0,50(2,2)	58	44 ± 10,39	1,94 ± 0,853
	1,0 (4,4)	13	25 ± 14,97	0,78 ± 0,499
Imersão temporária de alta frequência (SA)	0,0 (0)	96	67 ± 28,23	5,06 ± 2,903
	0,25(1,1)	0	-	-
	0,50(2,2)	0	-	-
	1,0 (4,4)	0	-	-
Estático sólido (ES)	0,0 (0)	96	56 ± 12,78	2,92 ± 1,068
	0,25(1,1)	83	43 ± 7,86	1,71 ± 0,514
	0,50(2,2)	92	33 ± 9,02	1,05 ± 0,476
	1,0 (4,4)	50	31 ± 5,88	0,92 ± 0,367
Estático líquido (EL)	0,0 (0)	100	44 ± 9,59	1,78 ± 0,554
	0,25(1,1)	58	31 ± 14,62	0,77 ± 0,567
	0,50(2,2)	25	24 ± 8,66	0,93 ± 0,394
	1,0 (4,4)	4	28 ± 5,00	0,48 ± 0,151

* Desvio padrão

Bons percentuais de sobrevivência na aclimatização têm sido obtidos para cactáceas provenientes de cultivo estático sólido, apresentando 100 %, no entanto foram submetidos a meios de cultivo contendo auxinas como em *O. ficus-indica* proveniente de meio com ou sem ácido naftalenoacético (ANA) (Khalafalla et al 2007), enquanto que em *O. ellisiana*, o maior percentual foi obtido em mudas submetidas a diferentes meios indutores de enraizamento contendo ácido 3-indolbutírico (AIB) (Juaréz e Passera 2002). Já em *Nopalea cochenillifera* cultivada no meio MS sem reguladores de crescimento para enraizamento, as plantas apresentaram 100% de sobrevivência e comprimento médio de 5,11 cm no substrato comercial 30 dias após a aclimatização (Vasconcelos et al 2007).

A matéria fresca de raízes nos brotos ficou em torno de 2-3 % da biomassa e foi semelhante para todos os tratamentos, assim como os percentuais de matéria seca de parte aérea e de raízes, com médias de 20 e 50 %, respectivamente. Villalobos (2001) destacou que uma característica importante do sistema de micropropagação é a uniformidade de todos os indivíduos propagados através desse processo. Até os primeiros 30 dias da aclimatização, as plantas advindas de micropropagação apresentaram um talo cilíndrico, o que é característico de plântulas jovens.

Após esse período as plantas tomaram a forma achatada típica dos cladódios (Fig 11), assemelhando-se ao crescimento de plântulas provenientes de sementes (Escobar et al 1986).

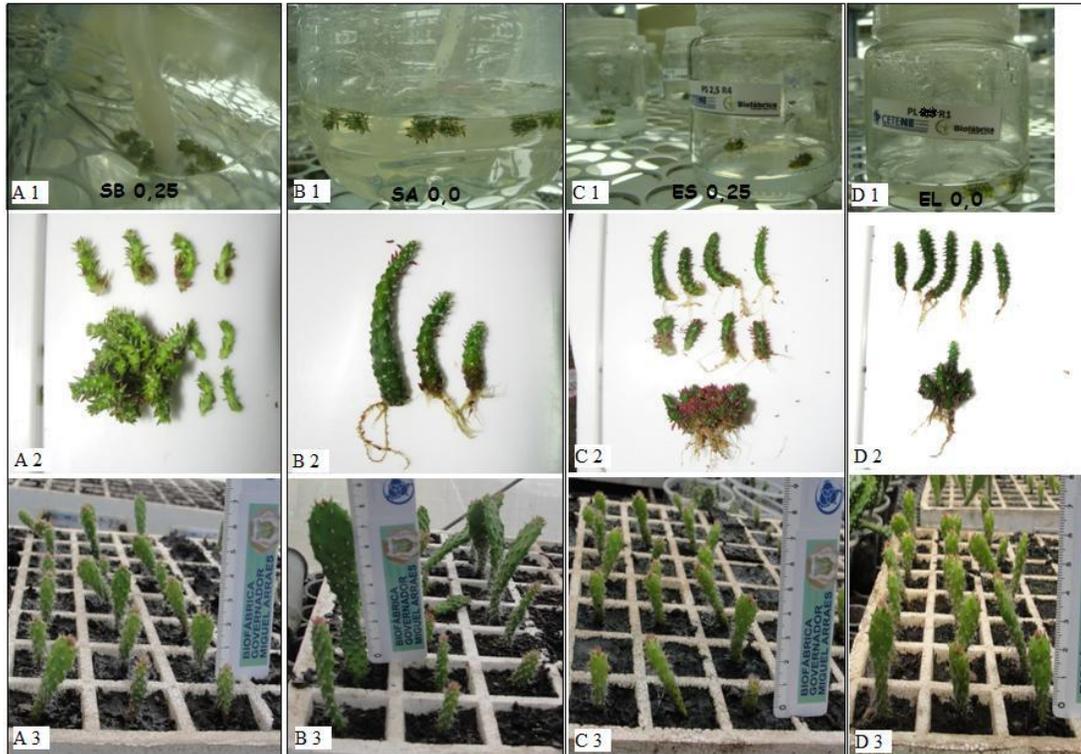


Fig 11. Micropropagação da palma forrageira *Opuntia stricta* Haw cv. Orelha de Elefante Mexicana. Tratamentos que proporcionaram brotos com melhores percentuais de sobrevivência (acima de 95%) na aclimatização: SB 0,25 (A), SA 0,0 (B), ES 0,25 (C) e EL 0,0 (D), nas fases de início de cultivo in vitro (1), 90 dias de cultivo (2) e 90 dias da aclimatização (3).

Os metabólitos enzimáticos analisados neste estudo não podem, isoladamente servir como marcadores do estresse, uma vez que as atividades de todas as enzimas foram superiores nas brotações formadas em mudas provenientes do sistema ES em relação ao SA, que exibiram melhores índices de aclimatização, mas que apresentaram baixa atividade das enzimas antioxidativas e intensa hiperidricidade e formação de batalaínas quando ao SA foi adicionado BAP e a percentagem de aclimatização das mudas foi nula. O metabolismo antioxidante tem sido relatado por ser importante na determinação da habilidade das plantas para sobreviver ao estresse oxidativo na aclimatização (Faisal e Anis 2009), mas esse metabolismo é complexo e envolve constituintes de natureza e atividade química bastante diversificada que respondem tanto a intensidade quanto a duração do estresse, e tem um forte componente genético.

Conclusões

O estresse pelo excesso de BAP caracterizou-se pela ocorrência de hiperidricidade e intensa formação de betacianina.

A hiperidricidade e a presença de betacianina podem ser usadas como indicadoras da qualidade fisiológica das plantas e do seu potencial para aclimatização.

A presença de BAP em sistema de imersão temporária de alta frequência acarreta hiperidricidade, formação de betacianina e impede a aclimatização das plantas.

O cultivo em sistema de imersão temporária de alta frequência em meio sem BAP forma plantas com elevado potencial para aclimatização.

Perspectivas futuras

Os sistemas de cultivo com meio de cultura líquido apresentaram limitações em alguma das fases da micropropagação, no entanto sua utilização deve ser ajustada em um sistema produtivo, podendo apresentar uma série de vantagens em relação ao processo convencional.

Mais pesquisas e experimentações devem ser realizadas para a elaboração de um protocolo eficiente, principalmente em cultivo líquido, estático ou não, podendo ser utilizadas variações entre os sistemas de cultivo e concentrações de BAP no mesmo protocolo.

Agradecimentos

A CAPES, pela concessão de bolsa de mestrado ao primeiro autor; à Andréa Baltar Barros, coordenadora da Biofábrica Governador Miguel Arraes do CETENE, pela disponibilização pessoal, concessão do espaço físico, equipamentos e material vegetal para realização da pesquisa; à professora Dra Vera Lúcia Arroxelas Galvão de Lima do Departamento de Ciências Domésticas da UFRPE, pela disponibilização pessoal e de material para análises das betacianinas.

Referências bibliográficas

- Agrios GN (1997) Plant pathology. Academic Press, San Diego
- Ali MB, Singh N, Shohael AM, Hahn EJ, Paek KY (2006) Phenolic metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress. *Plant Science* 171:147-154
- Aliyu BS, Mustapha Y (2007) Effect of different media on the in vitro growth of cactus (*Opuntia ficus-indica*) explants. *African Journal of Biotechnology* 6 (11):1330-1331
- Alvard D, Cote F, Teisson C (1993) Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32:55-60
- Aragon C, Carvalho LC, Gonzalez J, Escalona M, Amancio S (2009) Sugarcane (*Saccharum* sp. Hybrid) propagated in headspace renovating systems shows autotrophic characteristics and develop improved anti-oxidative response. *Tropical Plant Biology* 2:38–50
- Assis E e Silva F (2006) Assistat. Versão 7.5 beta
- Balen B, Tkalec M, Pavokovic´ D, Pevalek-Kozlina B, Krsnik-Rasol M Growth (2009) Conditions in In vitro Culture Can Induce Oxidative Stress in *Mammillaria gracilis* Tissues. *Journal Plant Growth Regulation* 28:36–45
- Barbera G (2001) História e importância econômica e agroecológica In: FAO/SEBRAE (eds), Agroecologia, cultivo e usos da palma-forrageira, SEBRAE-PB, pp. 1-11
- Barrueto Cid LP (2000) Citocininas. In: Barrueto Cid LP (Ed.). Introdução aos hormônios vegetais. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, pp. 55-88
- Batista MJ, Novaes F, Santos DG, Suguino HH (2001) Drenagem como instrumento de dessalinização e prevenção da salinização de solos. Ministério do Meio Ambiente / Secretaria dos Recursos Hídricos (Série Informes Técnicos). Brasília
- Berris LS Jr, Sizer IW A (1952) spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of Biological Chemistry* 195:133-140
- Bezerra Neto E e Barreto LP (2004) Métodos de análises químicas em plantas. Imprensa Universitária da UFRPE. Recife
- Bhuiyan NH, Adachi T (2003) Stimulation of betacyanin synthesis through exogenous methyl jasmonate and other elicitors in suspension-cultured cells of *Portulaca*. *Journal Plant Physiology* 160:1117–1124

- Blazquez S, Olmos E, Hernández JA, Fernández-García N, Fernández JA, Piqueras A (2009) Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 97:49-57
- Bollmark M, Kubát B, Eliasson L (1988) Variation in endogenous cytokinin content during adventitious root formation in pea cuttings. *Journal Plant Physiology* 132:262–265
- Bollwell GP, Bindschedler LV, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C, Minibayeva F (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: A three-component system. *Journal of Experimental Botany* 53:1367–1376
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Bornman CH, Vogelmann TC (1984) Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification in vitro *Picea abies*. *Physiol. Plant.* 61, 505-512
- Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E (2000) Responses to abiotic stresses. In: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (eds). *Biochemistry e Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville
- Camara TR, Willadino L (2005) Compreendendo o estresse abiótico in vitro In: Nogueira RJM, Araújo ELA, Willadino L, Maaze U (Eds) *Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas*. 1ª ed. MXM Gráfica e Editora, v.1, Recife, pp. 325-333
- Carvalho CU, Albuquerque CC, Brito JZ (2005) *Cultivo in vitro de vegetais: considerações básicas*. Imprensa universitária: Recife
- Cassells AC e Cury RF (2001) Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64:145-157
- Castellar MR, Oboń JM, Alacid M, e Fernández-López JA (2003) Color properties and stability of betacyanins from *Opuntia* fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:2772–2776
- Cavalcanti ER, Coutinho SFS, Selva VSF (2007) Desertificação e desastres naturais na região do semiárido brasileiro. *Revista Cadernos de Estudos Sociais* 22:19-31
- Chiacchio FPB, Mesquita AS, Santos JR (2006) Palma forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o semi-árido baiano. *Bahia Agrícola* 7:39-49

- Costa MAPC, Souza AS, Almeida WAB (2006) Morfogênese in vitro. IN: SouzaAS e Junghans TG (Ed.). Introdução à micropropagação de plantas. EMBRAPA CNPMF, Cruz das Almas, pp. 115-130
- Couselo JL, Varela P, Rey M (2006) Effect of benzyladenine concentration and double-phase culture system on in vitro multiplication of adult Albariño plants. *Am J Enol Vitic* 57:109–112
- Dat J, Vandenaabee S, Vranová E, Van montagu M, Inzé D, Van Breusegem F (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57:779–795
- De Gara L (2004) Class III peroxidases and ascorbate metabolism in plants. *Phytochemistry Reviews*, 3:195–205
- De Klerk GJ, Hanecáková J, Jasik J (2001) The role of cytokinins in rooting of stem slices cut from apple microcuttings. *Plant Biosyst.* 135:79–84
- Delarue M, Santoni V, Caboche M and Bellini C (1997) Cristal mutations in *Arabidopsis* confer a genetically heritable, recessive, hyperhydric phenotype. *Planta* 202:51-61
- Del Rio LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Barroso JB (2003) Plant peroxisomes, reactive oxygen metabolism and nitric oxide. *IUBMB Life* 55:71–81
- Dewir YH, Chakrabarty D, Ali MB, Hahna EJ, Paek KY (2006) Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia millii* hyperhydric shoots. *Environmental and Experimental Botany* 58:93–99
- DiopanV, Adam V, Havel L, Kizek R (2009) Phytohormones as Important Biologically Active Molecules – Their Simple Simultaneous Detection. *Molecules* 14:1825-1839
- Droog F (1997) Plant glutathione S-transferases, a tale of Theta and Tau. *J. Plant Growth Reg.* 16:95–107
- Escalona M, LorenzoJC, Gonzalez BL, Danquita M, Gonzales JL, Desjardins Y, Borroto CG (1999) Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports* 18:743-748
- Escoba A, Villalobos A, Villegas MA (1986) *Opuntia* micropropagation by axillary proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 7:269-277
- Etienne H, Berthouly M (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69:215-231
- Etienne H, Dechamp E, Barry-Etienne D, Bertrand B (2006) Bioreactors in coffee micropropagation. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18 (1):45-54

- Faisal M e Anis M (2009) Changes in photosynthetic activity, pigment composition, electrolyte leakage, lipid peroxidation, and antioxidant enzymes during ex vitro establishment of micropropagated *Rauvolfia tetraphylla* plantlets. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 99:125-132
- Fatibelho-Filho O, Vieira IC (2002) Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. *Química Nova* 25: 455-464
- Ferreira MA (2005) Palma forrageira na alimentação de bovinos leiteiros. Imprensa Universitária UFRPE, Recife
- Feuser S, Nodari RO, Guerra MP (2001) Eficiência comparativa dos sistemas de cultura estacionária e imersão temporária para a micropropagação do abacaxi. *Revista Brasileira de Fruticultura* 23:6-10
- Flores-Flores V e Tekelenburg A (2001) Produção de corante dacti (*Dactylopius coccus* Costa). In: FAO/SEBRAE (eds). Agroecologia, cultivo e usos da palma-forrageira, SEBRAE-PB. pp. 169-186
- Floriano EP (2004) Produção de mudas florestais por via assexuada, 1ª ed. Caderno Didático
- Fogaça LA, Dortzbach D, Alves AC, Pedrotti EL (2006) Morphological and physiological characteristics *Agapanthus umbellatus* var. minor of shoots propagated in bioreactor of temporary immersion. *Plant Cell, Culture Micropropagation* 2:80-87
- Fortes GRL, Pereira JES (2001) Estabelecimento in vitro da ameixeira cv. América. *Revista Brasileira de Fruticultura* 23:183-185
- Foyer CH, Fletcher JM (2001) Plant antioxidants: colour me healthy. *Biologist* 48:115–120
- França SC, Duarte IB, Cerdeira RMM, Pereira AMS (1995) Micropagation of *Stryphnoclendon polyphythum* (Barbatimão). *Plant Cell, tissue e Organ Culture* 42:291-293
- Franck T, Kevers C, Gaspar T, Dommes J, Deby C, Greimers R, Serteyn D, Deby-Dupont G (2004) Hyperhydricity of *Prunus avium* shoots cultured on gelrite: a controlled stress response. *Plant Physiol Biochem* 42:519–527
- Franck T, Kevers C, Gaspar T,(1995) Protective enzymatic systems against activated oxygen species compared in normal and vitrified shoots of *Prunus avium* L.L. raised in vitro. *Plant Growth Regulation*. 16: 253–256
- Frota HM, Carneiro MSS, Llamoca-zárate RM, Campos FAP, Peixoto MJA (2004) Efeitos do BAP e do AIA na indução e no crescimento in vitro de brotos de dez clones de palma forrageira. *Revista Ciência Agronômica* 35:279-283

- Gadjev I, Vanderauwera S, Gechev TS, Laloi C, Minkov IN, Shulaev V, Apel K, Inze D, Mittler R, Breusegem FV (2006) Transcriptomic Footprints Disclose Specificity of Reactive Oxygen Species Signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 141:436–445
- Gandía-Herrero F, García-Carmona F, Escribano J (2006) Development of a protocol for the semi-synthesis and purification of betaxanthins. *Phytochem Anal* 17:262–269
- Gaspar T, Franck T, Bisbis B, Keevers C, Jouve L, Hausman JF, Dommes J (2002) Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant growth regulation* 37:263-285
- George EF (1996) Plant propagation by tissue culture. Part 2. The practice, 2nd edn. Exegetics Ltd., Edington, UK
- Georgiev V, Ilieva M, Bley T, Pavlov A (2008) Betalain production in plant in vitro systems. *Acta Physiology Plant* 30:581–593
- Ghosh S, Mahoney SR, Penterman JN (2001) Ultrastructural and biochemical changes in chloroplasts during *Brassica napus senescence*. *Plant Physiology Biochemistry* 39:777-784
- Grattapaglia D, Machado MA (1998) Micropropagação. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Embrapa-SPI/Embrapa CNPH, v. 1 Brasília, pp. 183-260
- Grotewold E (2006) The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu Rev Plant Biol* 57:761–780
- Handrow W, Floh EIS (1990) Aspectos básicos do controle da morfogênese in vitro. In: Torres, AC, Caldas LS (Eds.). *Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas*, ABC/TP/EMPRAPA-CNPH, Brasília, pp. 203-212
- Harborne JB (1973) *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*. Chapman and Hall. London
- Hills FS (2001) Anatomia e morfologia. In: FAO/SEBRAE (eds). *Agroecologia, cultivo e usos da palma-forrageira*, SEBRAE-PB, pp. 28-35
- Hirt H, Shinozaki K (2003) *Topics in Current Genetics: Plant Responses To Abiotic Stress*. v. 4 Springer-Verlag Berlin
- Hoffmann W (2001) Etnobotânica. In: FAO/SEBRAE (eds). *Agroecologia, cultivo e usos da palma-forrageira*, SEBRAE-PB, pp. 12-19
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2008) *Produção Pecuária municipal*, Rio de Janeiro, v. 36. p.1-55

- Iiyama K, Lam TBT, Stone BA (1994) Covalent cross links in the cell wall. *Plant Physiology* 104:315–320
- Jaleel CA, Riadh K, Gopi R, Manivannan P, Inés J, Al-Juburi HJ, Chang-Xing Z, Hong-Bo S, Panneerselvam R (2009) Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. *Acta Physiol Plant* 31:427–436
- Jayakumar K, Vijayarengan P, Zhao CX, Jaleel CA (2008) Soil applied cobalt alters the nodulation, leg-haemoglobin content and antioxidant status of *Glycine max* (L.) Merr. *Colloids Surf B Biointerfaces* 67:272–275
- Johansen, D (1940) *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Company, New York
- Joshi M and Dhar U (2003) In vitro propagation of *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew an endangered ethnoreligious medicinal herb of Himalaya. *Plant Cell Rep* 21:933-939
- Joy RW, Sugiyama M, Fukuda H and Komamine A (1995) Cloning and characterization of polyphenol oxidase cDNAs of *Phytolacca americana*. *Plant Physiol* 107:1083–1089
- Joyce SM, Cassells AC and Jain SM (2003) Stress and aberrant phenotypes in vitro culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74:103–121
- Juárez MC and Passera CB (2002) In vitro propagation of *Opuntia ellisiana* Griff. and acclimatization to field conditions. *Biocell* 26(3):319-324
- Junghans TG e Souza AS (2009) Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. Cruz das Almas
- Kadota M, Niimi Y (2003) Effects of cytokinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity in in vitro pear cultivar shoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72:261–265
- Kaim W, Rall J (1996) Copper—a “modern” bioelement. *Angew. Chem.Int. Ed. Engl.* 35:43–60
- Kar M, Mishra D (1976) Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during pice leaf senescence. *Plant Physiology* 57:315-319
- Keevers C, Bisbis B, Le Dily F, Billard JP, Huault C, Gaspar TH (1995) Darkness improves growth and delays necrosis in a non chlorophyllous habituated sugarbeet callus. *In vitro Cellular e Developmental Biology* 31:122–126
- Kevers C, Franck T, Strasser RJ, Dommès 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

- Khalafalla MM, Abdellatef E, Mohameed Ahmed MM, Osman MG (2007) Micropropagation of cactus (*Opuntia ficus-indica*) as strategic tool to combat desertification in arid and semi arid regions. *Int. J. Sustain. Crop Prod.* 2(4):1-8
- King RM (1957) Studies in the tissue culture of cacti. *Cactus and Succulent Journal* 29:102-104
- Konieczny R, Libik M, Tuleja M, Niewiadomska M (2008) Oxidative events during in vitro regeneration of sunflower. *Acta Physiologiae Plantarum* 30:71-79
- Koolman J, Roehm KH (2005) *Color Atlas of Biochemistry*, 2nd ed., Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Kozai T, Kubota C, Jeong BR (1997) Environmental control for the large-scale production of plants through in vitro techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 51:49-56
- Laloi C, Apel K, Danon A (2004) Reactive oxygen signalling: the latest news. *Current Opinion in Plant Biology* 7:323-328
- Lemos EEP (2009a) Micropropagação da cana-de-açúcar. In: Junghans TG e Souza AS Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, pp. 257-286
- Lemos EEP (2009b) Micropropagação de plantas por Biorreatores. In: Junghans TG e Souza AS Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas pp. 83-119
- Lemos EEP, Ferreira MS, Alencar LMC, Oliveira JGL, Magalhães VS (2001) Micropropagação de clones de banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. *Revista Brasileira de Fruticultura* 23:482-487
- Levin R, Alper Y, Stav R, Watad A (1997) Methods and apparatus for liquid media and semi-automated micropropagation. *Acta Horticulturae* 447:659-663
- Lichtenthaler HK (1996) Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *Journal Plant Physiology* 148:4-14
- Lima JD e Moraes WS (2006) Concentração de benzilaminopurina e avaliação de protocolo para multiplicação in vitro de genótipos de bananeira. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 36 (1):13-19
- Llamoca-Zárate RM, Aguilar LF, Landsmann J, Campos FAP (1999) Whole Plant regeneration from the shoot apical meristem of *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae). *Journal of Applied Botany-Angewandte Botanik* 73:83-85
- Lopes EB (2007) Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino. EMEPA/FAEPA, João Pessoa

- Lopez-Huertas E, Charlton WL, Johnson B, Graham IA, Baker A. (2000) Stress induces peroxisome biogenesis genes. *EMBO J.* 19:6770–6777
- Lorenzo JC, Gonzalez BL, Escalona M, Teisson C, Espinosa P, Borroto C (1998) Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54:197-200
- 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 Plant Growth Regulation* 28:341–348
- Malda G, Backhaus RA, Martin C (1999) Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of in vitro cultured cactus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58:1–9
- Malik SK, Chaudhury R, e Kalia RK (2005) Rapid in vitro multiplication and conservation of *Garcinia indica*: A tropical medicinal tree species. *Scientia Horticulturae* 106 (4):539-553
- Margis-Pinheiro M, Sandroni M, Lummerzeim M, Oliveira D (1999) A defesa das plantas contra as doenças. *Ciência Hoje* 25:24-31
- Martínez GA, Civello PM, Chaves AR, Añon MC (2001) Characterization of peroxidases mediated chlorophyll bleaching in strawberry fruit. *Phytochemistry* 58:379–387
- Mason HS, Mullet JE (1990) Expression of two soybean vegetative storage protein genes during development and in response to water deficit, wound, and jasmonic acid. *The Plant Cell* 2:569-579
- Mata-Rosas M, Baltazar-García RJ, Moon P, Hietz P, Luna-Monterrojo VE (2010) In vitro regeneration of *Lycaste aromatica* (Graham ex Hook) Lindl. (Orchidaceae) from pseudobulb sections. *Plant Biotechnology Reports* 4:157–163
- Mclusky SR, Bennett MH, Beale MH, Lewis MJ, Gaskin P, Mansfied JW (1999) Cell wall alteration and localised accumulation of feruloyd-3'-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration by *Botrytis alii* are associated with actin polarisation, peroxidases activity and suppression of flavonoid biosynthesis. *Plant Journal* 17:523–534
- Mehrotra S, Goel MK, Kukreja AK and Mishra BN (2007) Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. *African Journal of Biotechnology* 6 (13):1484-1492
- Meratan AA, Ghaffari SM, Niknam V (2009) In vitro organogenesis and antioxidant enzymes activity in *Acanthophyllum sordidum*. *Biologia Plantarum* 53:5-10

- Metral JJ (1965) Les cactees fourrageres dans le Nord-Est du Bresil plus particulierement dans L'etat du Ceara. *Agronomia Tropical* 20:248-261
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant in Science* 9:405-410
- Mondragón-Jacobo C, e Pimienta-Barrios E (2001) Propagação. FAO/SEBRAE (eds), *Agroecologia, cultivo e usos da palma-forrageira*, SEBRAE-PB, pp. 65-71
- Moreno DA, García-Viguera C, Gil JI, Gil-Izquierdo A (2008) Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutritional health. *Phytochem Rev.* 7:261–280
- Mok MC, Martin RC and Mok DWS (2000) Cytokinins: Biosynthesis, metabolism and perception. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 36:102-107
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15:473–497
- Nascimento JP (2008) Caracterização morfolométrica e estimativa da produção de *Opuntia ficus-indica* Mill. sob diferentes arranjos populacionais e doses de fósforo no semiárido da Paraíba, Brasil. Dissertação, Universidade Federal de Campina Grande.
- Nobel PS (2001) Biologia ambiental. In: FAO/SEBRAE (eds). *Agroecologia, cultivo e usos da palma-forrageira*, SEBRAE-PB, pp. 36-48
- Noctor G, De Paepe R, Foyer CH (2007) Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends in Plant Science* 12:125-134
- Oliveira RP e Silva SO (1997) Micropopagação massal de bananeira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 32(4):415-420
- Oliveira MKT. de; Bezerra Neto F, Câmara FAA, Nunes GHS, Oliveira FA (2007) Propagação “in vitro” da cultura do abacaxizeiro ornamental (*Ananas lucidus* Miller). *Caatinga* 20:167-171
- Oliveira RP e Silva SO (1997) Micropopagação massal de bananeira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 32 (4):415-420
- Paek KY, Hahan EJ, Son SH (2001) Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. *In vitro Cellular Developmental Biology Plant* 37:149-157

- Pereira JES, Fortes GLR (2003) Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38 (9):1035-1043
- Picoli EAT, Otoni CW, Figueira ML, Carolino MB and Almeida RS (2001) Hyperhydricity in in vitro eggplant regenerated plants: Structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). *Plant Sci.* 160:857-868
- Pimienta-Barrios E e Muñoz-Urías A (2001) Domesticação das opuntias e variedades cultivadas. In: FAO/SEBRAE (eds). *Agroecologia, cultivo e usos da palma-forrageira*, SEBRAE-PB, pp. 58-64
- Piqueras A, Cortina M, Serna MD, Casas JL (2002) Polyamines and hyperhydricity in micropropagated carnation plants. *Plant Science* 62:671-678
- Pomar F, Caballero N, Pedreño MA, Ros Barcelò A (2002) H₂O₂ generation during the auto-oxidation of coniferyl alcohol drives the oxidase activity of a highly conserved class III peroxidase involved in lignin biosynthesis. *FEBS Letters* 529:198–202
- Quiroga M, Guerrero C, Botella MA, Barceló A, Amaya I, Medina MI, Alonso FJ, Milrad de Forchetti S, Tigier H, Valpuesta V (2000) A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiology* 122:1119–112
- Reigosa MJ, Pedrol N, Sánchez A (2004) *La Ecofisiología Vegetal - Una ciencia de síntesis*. Thomson, Madrid
- Rodrigues PHV, Teixeira FM, Lima AMLP, Ambrosano, GMB (2006) Propagação de mudas de helicônia em biorreator de imersão temporária. *Bragantia* 65:29-35
- Ros Barcelò A, Pomar F, Lopez-Serrano M, Pedreño MA (2003) Peroxidase: a multifunctional enzyme in grapevines *Functional Plant Biology* 30:577–591
- Sáenz C, Berger H, García JC, Galletti L, Cortázar VG, Higuera I, Mondragón C, Rodríguez-Félix A, Sepúlveda E, Varnero MT (2006) Utilización agroindustrial del nopal. *Boletín de servicios agrícolas de la fao* 162, Roma
- Saher S, Fernández-García N, Piqueras A, Hellin E, Olmos E (2005) Reducing properties, energy efficiency and carbohydrate metabolism in hyperhydric and normal carnation shoots cultured in vitro: a hypoxia stress? *Plant Physiology and Biochemistry* 43:573–582
- Saher S, Piqueras A, Hellin E & Olmos E (2004) Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. *Physiologia Plantarum* 120:152-161

- Santos DC, Farias I, Lira MA, Santos MVF, Arruda GP, Coelho RSB, Dias FM, Warumby JF, Melo JN (2002) Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia e Nopalea*) em Pernambuco: cultivo e utilização. Documentos IPA, Recife
- Santos DC, Farias I, Lira MA, Santos MVF, Arruda GP, Coelho RSB, Dias FM, Melo JN (2006) Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia e Nopalea*) em Pernambuco. Documentos IPA, Recife
- Sepúlveda-Jiménez G, Rueda-Benítez P, Porta H, Rocha-Sosa M (2004) Betacyanin synthesis in red beet (*Beta vulgaris*) leaves induced by wounding and bacterial infiltration is preceded by an oxidative burst. *Physiol Mol Plant Pathol.* 64:125–133
- Shewry PR, Lucas JA (1997) Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. *Advances In Botanical Research Incorporating Advances In Plant Pathology* 26:135-192
- Silva AB, Pasqual M, Teixeira JB, Araújo AG (2007) Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42:1257-1260
- Soares AMS, Machado OLT (2007) Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Tropica – Ciências Agrárias e Biológicas* 1:1-10
- Soriano-Santos J, Franco-Zavaleta ME, Pelayo-Zaldívar C, Armella-Villalpando MA, Yáñez-López ML, Guerrero-Legarreta I (2007) Caracterización parcial del pigmento rojo del fruto de la “jiotilla” (escontria chiotilla [weber] britton e rose). *Revista Mexicana de ingeniería química* 6:19-25
- Sottomayor M, Ros Barcelò A (2003) Peroxidase from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don and the biosynthesis of alpha-3',4'-anhydrovinblastine: a specific role for a multifunctional enzyme. *Protoplasma* 222:97–105
- Souza AV, Pereira AMS (2007) Enraizamento de plantas cultivadas in vitro. *Revista Brasileira Plantas Medicinai* 9 (4) 103-117
- Sreedhar RV, Venkatachalam L, Neelwarne B (2009) Hyperhydricity-Related Morphologic and Biochemical Changes in *Vanilla planifolia*. *J. Plant Growth Regulation* 28:46–57
- Sreekanth D, Arunasree MK, Roy KR, Chandramohan T, Reddy GV, Reddanna P (2007) Betanin a betacyanin pigment purified from fruits of *Opuntia ficus-indica* induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia Cell line-K562. *Phytomedicine* 14:739–746
- Srivastava LM (2002) Cytokinins In: Srivastava LM (Ed) *Plant growth and development: hormones and environment*. Amsterdam: Academic Press, pp. 191-202

- Steiner U, Schliemann W, Boëhm H, Strack D (1999) Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. *Planta* 208:114-124
- Stintzing FC, Carle R (2008) N-heterocyclic pigments: betalains. In: Socaciu C (eds) *Food colorants: chemical and functional properties*. CRC Press/Taylor e Francis, Boca Raton/London, pp 87–100
- Strack D, Vogt T, Schliemann W (2003) Recent advances in betalain research. *Phytochemistry* 62:247–269
- Taiz L, Zeiger E (2004) *Fisiologia vegetal*. Artmed, Porto Alegre
- Teixeira JB (2006) Produção de mudas clonais em biofábricas e uso de biorreator. *Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia* 180
- Termignoni RR (2005) *Cultura de Tecidos Vegetais 1ªed*. UFRGS
- Torres AC, Caldas LS, Bufo JA (1998) Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas. Embrapa, Brasília, 1:183-185
- Vanacker H, Carver TLW, Foyer CH (1998) Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiol.* 117:1103–1114
- Vanisree M, Lee CY, Lo SF, Nalawade SM, Lin CY, Tsay HS (2004) Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot Bull Acad Sin.* 45:1–22
- Vasconcelos AGV, Lira MA, Cavalcanti VALB, Santos MVF, Camara T, Willadino L (2007) Micropropagação de palma forrageira cv. Miúda (*Nopalea cochenillifera* - Salm Dyck). *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 2:28-31
- Villa F, Araújo AG, Pio LAS, Pasqual M (2005) *Ciênc. Agrotec.* 29 (3):582-589
- Villalobos VM (2001) Aplicação do cultivo de tecidos para a micropropagação de *Opuntia* sp. In: FAO/SEBRAE (eds). *Agroecologia, cultivo e usos da palma-forrageira*, SEBRAE-PB, pp. 72-78
- Williams RR (1993) Mineral nutrition "in vitro": a mechanistic approach. *Australian journal of botany* 41:237-51
- Wu Z, Chen LJ, Long YJ (2009) Analysis of ultrastructure and reactive oxygen species of hyperhydric garlic (*Allium sativum* L.) shoots. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 45:483–490
- Xu PL, Guo YK, Bai JG, Shang L, Wang XJ (2008) Effects of longterm chilling on ultrastructure and antioxidant activity in leaves of two cucumber cultivars under low light. *Plant Physiology* 132:467–478

Ye B, Muller HH, Zhan J, Gressel J (1997) Constitutively elevated levels of putrescine and putrescine-generating enzymes correlated with oxidant stress resistance in *Coryza bonariensis* and wheat. *Plant Physiology* 115:1443–1451

Ziv M (2005) Simple bioreactors for mass propagation of plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81:277–285

Zryd JP, Christinet L (2004) Betalains. In: Davies K (eds) *Plant pigments and their manipulation*. *Annu. Plant Rev.* vol 14. CRC Press/Blackwell, Oxford, pp 185–213

ANEXO**NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DE MANUSCRITO NO JORNAL
PLANT CELL, TISSUE AND ORGAN CULTURE**

- Instructions for Authors

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

TITLE PAGE**Title Page**

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT**Text Formatting**

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.

Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead.

- Save your file in doc format. Do not submit docx files.
- [Word template](#)

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- [LaTeX macro package](#)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

SCIENTIFIC STYLE

Please always use internationally accepted signs and symbols for units, SI units.

REFERENCES

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).

- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al 1993).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- [EndNote style](#)

TABLES

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

Definition: Black and white graphic with no shading.

- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.

- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

- [Springer Open Choice](#)

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, they agree to the Springer Open Choice Licence.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.