

NISE DE FÁTIMA COUTINHO SOUTO

**CULTIVO *in vitro* E ATIVIDADE DE ENZIMAS
ENVOLVIDAS NA OXIDAÇÃO DE EXPLANTES DE
Tapeinochilos ananassae (Hassk). K. Schum.**

**RECIFE
AGOSTO - 2008**

NISE DE FÁTIMA COUTINHO SOUTO

**CULTIVO *in vitro* E ATIVIDADE DE ENZIMAS
ENVOLVIDAS NA OXIDAÇÃO DE EXPLANTES DE
Tapeinochilos ananassae (Hassk). K. Schum.**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Botânica, Departamento de Biologia,
Área de Botânica da Universidade
Federal Rural de Pernambuco, como
parte dos requisitos necessários para
obtenção do título de Mestre em
Botânica.

Orientadora: Profa. Dr^a Lilia Gomes Willadino

Conselheiras: Profa. Dr^a Cláudia Ulisses de Carvalho Silva

Profa. Dr^a Ana Lúcia Figueiredo Porto

RECIFE
AGOSTO - 2008

FICHA CATALOGRÁFICA

S728c Souto, Nise de Fátima Coutinho
Cultivo *in vitro* e atividade de enzimas envolvidas na oxidação
de explantes de *Tapinochilos ananassae* (Massak) K. Schum /
Nise de Fátima Cutinho Souto. -- 2008.
57 f. il.

Orientadora : Lilia Gomes Willadino
Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal
Rural de Pernambuco. Departamento de Biologia.
Inclui bibliografia.

CDD 581. 1

1. Cultivo de tecido vegetal
 2. Oxidação fenólica
 3. Flores tropicais
 4. Peroxidase
 5. Peroxidase
 6. Polifenoloxidase
- I. Willadino, Lilia Gomes
II. Título

NISE DE FÁTIMA COUTINHO SOUTO

**CULTIVO *in vitro* E ATIVIDADE DE ENZIMAS
ENVOLVIDAS NA OXIDAÇÃO DE EXPLANTES DE
Tapeinochilos ananassae (Hassk). K. Schum.**

ORIENTADORA: _____
Profª. Dra. Lilia Gomes Willadino

CONSELHEIRAS:

Profª. Dra. Cláudia Ulisses de Carvalho Silva

Profª. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

RECIFE
AGOSTO - 2008

NISE DE FÁTIMA COUTINHO SOUTO

**CULTIVO *in vitro* E ATIVIDADE DE ENZIMAS
ENVOLVIDAS NA OXIDAÇÃO DE EXPLANTES DE
Tapeinochilos ananassae (Hassk). K. Schum.**

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Terezinha Rangel Câmara
(Universidade Federal Rural de Pernambuco/ UFRPE) – Titular

Profa. Dra. Virgínia Maria Tenório Sabino Donato
(Universidade Federal Rural de Pernambuco/ UFRPE) - Titular

Profa. Dra. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares
(Universidade Federal Rural de Pernambuco/ UFRPE) – Titular

Prof. Dr. Gilberto de Souza e Silva Júnior
(Escola Agrotécnica Federal de Vitória de Santo Antão) – Suplente

RECIFE
AGOSTO - 2008

Dedico aos meus pais, minha irmã e Reinaldo, pessoas que fazem de cada dia a mais na minha vida um novo sonho, uma nova realidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por todas as pessoas especiais que tem colocado em minha vida e por todas as metas alcançadas;

Aos meus pais, minha avó e Milla pelo simples fato de existirem e me ensinarem a nunca desistir de meus sonhos;

A Reinaldo, por estar ao meu lado, me ajudar tanto e me incentivar sempre. Te amo Ném, você é simplesmente TUDO;

À minha orientadora Lília Willadino, por toda sua simplicidade e imensa sabedoria, compreensão, paciência e dedicação;

À minha co-orientadora Cláudia Ulisses, pela sua amizade, valiosos conselhos, e por sempre ensinar a dedicação e o compromisso pela pesquisa científica;

À minha co-orientadora Ana Porto, pela sua paciência, dedicação, simpatia e disponibilidade, dedicadas sempre;

À professora Terezinha Câmara, por toda a sua alegria, apoio e ensinamentos valiosos;

À professora Isabelle Meunier, por seu apoio nas análises estatísticas e por ser sempre tão atenciosa;

À Rosa (minha prima, sogra e amiga!), minhas cunhadas Carola e Renata e minha linda sobrinha Luíza, pelo incentivo constante e todo o carinho que sempre têm comigo;

Aos meus amados padrinhos Titia Rita e Titio Tarcísio (*in memoriam*);

Aos demais tios e primos, com amor;

Ao meu cunhado Abner, por sempre estar presente;

Às minhas grandes e eternas amigas Helga (Panda) e Renata;

À minha amiga Patrícia Cunha, querida pessoa, pela sua amizade e apoio em todos os momentos, além de tudo que me ensinou em referência aos amigos e mesmo à própria fisiologia vegetal;

À Pat Paulino e Gemima, maravilhosas meninas que me ensinaram bastante quando cheguei ao laboratório;

Ao querido casal Vitor e Gil, por todo o apoio na realização dos experimentos;

Aos queridos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais: Lu, Maninho, Bruna, Helder, Fabian, Luiz, Wellington, Aurinha e Dani Werner;

Aos professores Ulysses Paulino e Cibele Castro por todo o apoio;

À querida Margarida, do PPGB, por toda a sua atenção e simpatia;

Aos membros da banca examinadora;

À todos os professores do PPGB que contribuíram para a minha formação;

À CAPES, pela concessão da bolsa;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco;

Contudo, agradeço a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho. E acabo este texto ressaltando a certeza de que essas pessoas estiveram presentes em um momento muito esperado de minha vida, e a elas, só tenho a agradecer por serem tão especiais.

Resumo

O cultivo *in vitro* é uma ferramenta de grande importância na produção de mudas com qualidade fitossanitária. O *Tapeinochilos ananassae* (Hassk) K. Schum é uma espécie tropical com grande aceitação no mercado floricultor mundial. No Nordeste brasileiro, vem enfrentando sérios problemas fitossanitários causados principalmente pelo *Rhabdovirus*. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o estabelecimento e desenvolvimento de diferentes explantes no cultivo *in vitro* de *T. ananassae*, incluindo o estudo de variáveis bioquímicas e anatômicas. Para isso, gemas laterais e embriões zigóticos maduros foram inoculados em meio MS completo ou reduzido à metade da força iônica, utilizando três fontes de antioxidantes: ácido ascórbico, carvão ativado e PVP, nas concentrações $0,25\text{g L}^{-1}$; $3,0\text{g L}^{-1}$ e $0,5\text{g L}^{-1}$. O meio de cultivo $\frac{1}{2}\text{MS}$ suplementado com $3,0\text{g L}^{-1}$ de carvão ativado promoveu um maior índice de sucesso no estabelecimento de embriões zigóticos. As plantas formadas a partir da cultura de embriões foram propagadas por segmentos nodais em diferentes concentrações de BAP e GA₃: $\frac{1}{2}\text{MS}$; $\frac{1}{2}\text{MS}+0,5\text{mg.L}^{-1}$ GA₃; $\frac{1}{2}\text{MS}+1,0\text{mg.L}^{-1}$ GA₃; $\frac{1}{2}\text{MS}+0,5\text{mg.L}^{-1}$ BAP; $\frac{1}{2}\text{MS}+0,5\text{mg.L}^{-1}$ BAP+ $0,5\text{mg.L}^{-1}$ GA₃; $\frac{1}{2}\text{MS}+0,5\text{mg.L}^{-1}$ BAP+ $1,0\text{mg.L}^{-1}$ GA₃. O meio de cultivo constituído de $\frac{1}{2}$ dos sais MS e isento de reguladores de crescimento mostrou-se mais adequado para o cultivo de segmentos nodais de *T. ananassae*. As gemas laterais não apresentaram desenvolvimento morfogênico nas condições de estudo deste trabalho. Além disso, foi observado grande oxidação fenólica, independentemente do meio de cultivo utilizado, e elevado índice de contaminação microbiana, sobretudo bacteriana, quando do uso de gemas advindas de ramos basais. Nas análises enzimáticas das gemas laterais cultivadas *in vitro* em processo de oxidação, percebeu-se que a atividade da peroxidase decaiu ao longo do tempo, sugerindo a perda do potencial organogênico; já a atividade da polifenoloxidase tendeu a aumentar ao longo do processo de oxidação dos explantes.

Abstract

The *in vitro* culture is a tool of great importance in the production of seedlings of the fitossanitary quality. The *Tapeinochilos ananassae* (Hassk) K. Schum is a tropical species that has a great acceptance in the world of floriculture market and presents, in the Brazilian Northeast, fitossanitary problems in which the *Rhabdovirus* is highlighted. In the present work, aiming to assess the establishment and development of various explants in the *in vitro* culture of *T. ananassae*, including the study of biochemical and anatomical variables. For this, lateral buds and mature zygotic embryos were inoculated in MS medium, full or reduced to its half ionic strength, using three sources of antioxidants: ascorbic acid, activated charcoal and PVP, in the concentrations 0,25g.L⁻¹; 3,0g.L⁻¹ and 0,5g. L⁻¹. The ½MS culture medium supplemented with 3,0g. L⁻¹ activated charcoal promoted a higher rate of success in the establishment of zygotic embryos. The plants formed from the culture of embryos were propagated by nodal segments in different concentrations of BAP and GA₃: ½MS; ½MS + 0,5mg.L⁻¹ GA₃; ½MS + 1,0mg.L⁻¹ GA₃; ½MS + 0,5mg.L⁻¹ BAP; ½MS + 0,5mg.L⁻¹ BAP + 0,5mg.L⁻¹ GA₃; ½MS + 0,5mg.L⁻¹ BAP + 1,0mg.L⁻¹ GA₃; and showed better development when cultivated in ½MS medium free from growth regulators. The lateral buds had not shown morfogenetic development under the conditions of study, besides a large phenolic oxidation had been seen, regardless of the culture medium that had been used, and a high level of microbial contamination, especially bacterial, when buds that had come from basal branches are used. In the enzymatic analysis of lateral buds that were cultivated *in vitro* in a process of oxidation, had been realized that the activity of peroxidase had declined through the time, suggesting the loss of organogenetic potential, but the activity of polyphenoloxidase had tended to increase during the oxidation process of explants.

Lista de Figuras e Tabelas

Revisão Bibliográfica

Figura 1. A) Hastes vegetativas e (B) inflorescência de *Tapeinochilos ananassae* (Hassk) K. Schum; (C) flor e (D) sementes..... 17

Manuscrito

Tabela 1. Proporções de formação de plantas, embriões não desenvolvidos e oxidação em diferentes meios de cultivo durante o estabelecimento *in vitro* de embriões zigóticos de *Tapeinochilos ananassae*. n= número de indivíduos, Z= padrão reduzido, p (%) = proporção geral..... 42

Tabela 2. Número médio de folhas, de nós, de raízes e de brotos e massa fresca (g) dos explantes em diferentes combinações de BAP e GA₃ no meio de cultivo aos 45 dias..... 43

Figura 1. Aspecto das plantas de *Tapeinochilos ananassae* desenvolvidas em diferentes suplementações de reguladores vegetais no meio nutritivo: (A) ½MS; (B) ½MS+0,5mg.L⁻¹ GA₃; (C) ½MS+1,0mg.L⁻¹ GA₃; (D) ½MS+0,5mg.L⁻¹ BAP; (E) ½MS+0,5mg.L⁻¹ BAP+0,5mg.L⁻¹ GA₃; (F) ½MS+0,5mg.L⁻¹ BAP+1,0mg.L⁻¹ GA₃..... 44

Figura 2. (A) Corte transversal de gema lateral de *Tapeinochilos ananassae*. (A) vista geral do corte histológico evidenciando ápice caulinar (Ac), bainhas foliares (Bf), células parenquimáticas (Cp), epiderme uniestratificada (Ep), feixes vasculares (Fv) e pêlos epidérmicos unicelulares (Peu); e (B) floema (Fl) e xilema (Xi)..... 45

Figura 3. Atividade específica de peroxidase (A) e polifenoloxidase (B) (U.min⁻¹. mg⁻¹ de proteína) em gemas laterais de *Tapeinochilos ananassae* cultivadas *in vitro* durante 21 dias..... 46

Sumário

1. Introdução.....	13
2. Revisão Bibliográfica.....	15
2.1 Floricultura tropical.....	15
2.2 Aspectos Botânicos de <i>Tapeinochilos ananassae</i>	15
2.3 Cultivo <i>in vitro</i> de Plantas.....	18
2.3.1 Micropropagação e vias organogênicas.....	18
2.3.2 Reguladores de crescimento.....	18
2.3.3 Cultura de embriões zigóticos.....	20
2.3.4 Cultivo <i>in vitro</i> de gemas laterais.....	20
2.4 Contaminação microbiana na etapa de estabelecimento <i>in vitro</i> dos explantes.....	21
2.5 Oxidação fenólica durante o estabelecimento <i>in vitro</i> e estresse oxidativo em plantas.....	22
2.6 O papel da peroxidase e polifenoloxidase como enzimas envolvidas em processos organogênicos e oxidativos no sistema celular vegetal.....	23
3. Referências.....	25
Manuscrito	
Cultivo <i>in vitro</i> e atividade de enzimas envolvidas na oxidação de explantes de <i>Tapeinochilos ananassae</i> (Hassk). K. Schum.....	33
Abstract.....	34
Introdução.....	35
Materiais e Métodos.....	35
Resultados e Discussão.....	36
Agradecimentos.....	39
Referências.....	39
Normas da Revista Plant Cell, Tissue and Organ Culture.....	47

1. Introdução

A amplitude de climas e solos brasileiros permite o cultivo de um grande contingente de espécies de flores e plantas ornamentais com potencial para competir no mercado internacional (SILVA, 2005). Dentre as flores tropicais está *Tapeinochilos ananassae* (Hassk) K. Schum, espécie com grande aceitação no mercado mundial que se destaca por suas inflorescências de coloração vermelha brilhante e hastes vegetativas de arranjo espiralado (BROSCHAT, 1995). Tais características propiciam a essa espécie extenso uso em projetos paisagísticos e na composição de arranjos florais.

A propagação vegetativa, realizada principalmente por divisão de touceira e enraizamento de estacas, é o principal meio de multiplicação do tapeinóquilos. Tal prática é difundida para essa espécie, visto o baixo índice de germinação das sementes, devido a alguma incompatibilidade no processo germinativo (PAIVA e LOGES, 2005). A propagação vegetativa pode, no entanto, limitar a quantidade de mudas disponíveis, além de facilitar a disseminação de pragas e doenças.

Uma alternativa aplicável ao problema é a produção de plantas por meio do cultivo *in vitro*, importante ferramenta biotecnológica na obtenção de um grande número de mudas sadias. Teoricamente, qualquer tecido pode ser utilizado como explante, devido a totipotência das células vegetais. No entanto, explantes que contenham maior porção de tecido meristemático ou maior capacidade de expressar a totipotência são mais responsivos (KERBAUY, 1999; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A despeito do grande potencial de utilização das técnicas de micropropagação para a produção de mudas de *Tapeinochilos ananassae*, não foram encontrados, na literatura especializada, registros do cultivo *in vitro* dessa espécie. Para fins de micropropagação, vários explantes podem ser utilizados, com preferência para os tecidos juvenis como gemas e ápices caulinares, a fim de regenerar indivíduos completos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). A regeneração *in vitro* por cultivo de gemas laterais tem sido amplamente difundida por ser de fácil controle e por produzir clones com maior fidelidade genética (SANTOS, 2003). O sucesso na regeneração de plantas usando gemas laterais como explante inicial foi constatado em diversos trabalhos (HANDA et al., 2005; SILVA et al. 2005; DINIZ et al., 2006; SCHMILDT et al., 2007). Já os embriões zigóticos são referidos como excelentes fontes de explantes, devido ao seu estado juvenil e elevada totipotencialidade e, neste caso, há variabilidade genética das plantas produzidas (HU e FERREIRA, 1998).

Durante o cultivo *in vitro* de plantas, independente da técnica a ser utilizada, um dos momentos cruciais é o estabelecimento inicial do explante no meio de cultivo (ERIG e

SCHUCH, 2003) e, entre os mais sérios aspectos desse processo, destacam-se a contaminação microbiana e a oxidação fenólica.

O presente trabalho objetivou avaliar aspectos do cultivo *in vitro* de *Tapeinochilos ananassae*, assim como estabelecer condições de cultivo das plantas e estudar indicadores bioquímicos envolvidos no processo oxidativo dos tecidos.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Floricultura Tropical

As flores tropicais possuem características favoráveis à comercialização, tais como beleza, exotismo, diversidade de cores e formas, resistência ao transporte e durabilidade pós-colheita, justificando, assim, sua elevada aceitação no mercado externo. A floricultura tropical é uma atividade que está em ascensão no âmbito mundial por se tratar de um agronegócio gerador de renda, fixador de mão-de-obra no campo, além de ser uma cultura alternativa para pequenos produtores (LINS e COELHO, 2003).

Entre os destinos das exportações brasileiras das flores, citam-se a Holanda, países da União Européia, países integrantes do MERCOSUL, Estados Unidos, Suíça, Japão e Austrália. Em último levantamento referente ao 1º semestre de 2007, foram exportados cerca de US\$ 17,3 milhões; desse numerário distribuem-se US\$ 9,7 milhões para a Holanda e US\$ 3,4 milhões para os Estados Unidos, correspondendo, respectivamente, a 56% e 19,5% do total (KIYUNA et al., 2004; REETZ et al., 2007).

No Brasil, o maior exportador de flores é o Estado de São Paulo. Em se tratando de flores tropicais, destacam-se os estados do Ceará, Alagoas e Pernambuco, sendo este último o maior produtor nacional de flores tropicais com sua área de cultivo concentrada na região litorânea e Zona da Mata (ROCHA, 2006).

Comprovadamente, o Nordeste brasileiro vem se destacando como pólo produtor de flores tropicais, com fortalecimento da cadeia produtiva e conseqüentemente o crescimento conjunto do setor, principalmente pelo clima, disponibilidade de solo, água, energia e mão de obra. Esse conjunto de fatores incide diretamente na qualidade do produto e possibilita custos de produção mais baixos e preços competitivos nos mercados externos (JÚNIOR e FILHO, 2003; LOGES et al., 2005).

2.2 Aspectos botânicos de *Tapeinochilos ananassae*

As espécies do gênero *Tapeinochilos* são herbáceas rizomatosas, perenes, medindo de 1,5 a 6 metros de altura. Seus centros de diversidade estão situados nas regiões da Indonésia, no Nordeste da Austrália e, principalmente, na Nova Guiné, um dos sistemas florestais mais preservados do mundo (FERRERO, 2001). Nesse gênero, podem-se observar hastes vegetativas com folhas arranjadas de forma espiralada, dando um formato sinuoso à planta (Figura 1A). As inflorescências situam-se abaixo das folhagens e são facilmente visualizadas

(PAIVA e LOGES, 2005), emergindo diretamente do rizoma, são formadas por brácteas com textura rígida, de formato arredondado e possuem coloração variada: vermelha, vermelha-escura e, em poucas espécies, amarela e laranja (Figura 1B). Na base da bráctea desenvolve-se a flor, cuja coloração varia dependendo da espécie, podendo ser branca, amarela e rósea (Figura 1C). Os frutos são do tipo capsular e carnosos e as sementes são pretas e de tegumento rígido, com a presença de um pequeno arilo, geralmente branco (Figura 1D) (FERRERO, 2001).

Tapeinochilos ananassae (Hassk) K. Schum é a espécie mais conhecida e cultivada do gênero, apresentando inflorescências de coloração vermelha brilhante (Figura 1B) com grande aceitação no mercado mundial (BROSCHAT, 1995). São comercializadas tanto as hastes florais como as hastes vegetativas, para composição de arranjos florais (FERRERO, 2001; PAIVA e LOGES, 2005).

Devido ao baixo índice de germinação das sementes, a propagação vegetativa é o principal meio de multiplicação, o qual muitas vezes promove a disseminação de pragas e doenças entre os cultivos (PAIVA e LOGES, 2005). De acordo com Coelho e Kitajima (2002), existem cultivos de *Tapeinochilos ananassae* na região da mata úmida nordestina, acometidas por vírus como o *Rhabdovirus*, causando sintomas de nanismo, faixas cloróticas nas folhas, necrose e variegação nas extremidades dos ramos, e redução no tamanho das inflorescências. Além disso, foi constatado por Furtado et al. (2007) a ocorrência dos fungos *Curvularia lunata* e *Curvularia eragrostidis* em cultivos de *Tapeinochilos ananassae* no Estado de Alagoas, causando podridões nas inflorescências. Neste sentido o cultivo *in vitro* apresenta-se como uma alternativa viável à produção de mudas isentas de doenças.

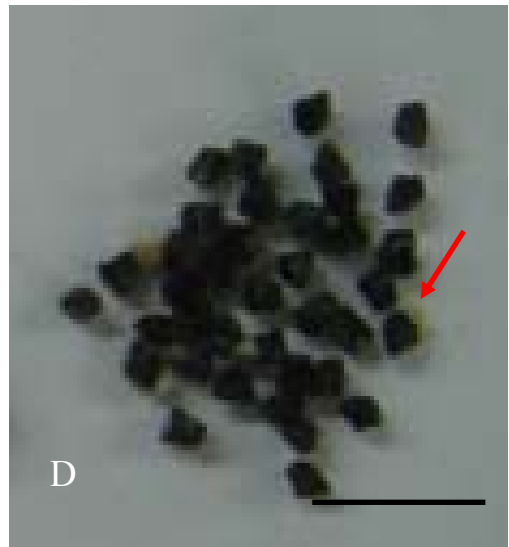
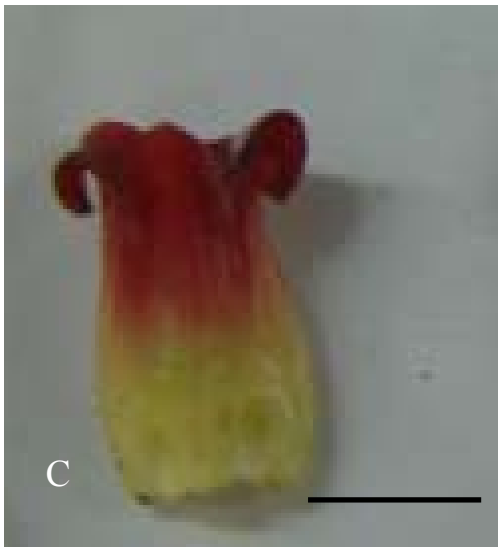


Figura 1. A) Hastes vegetativas; (B) Brácteas de inflorescência de *Tapeinochilos ananassae* (Hassk) K. Schum; (C) flor e (D) sementes. Bar = 150 mm.

2.3 Cultivo *in vitro* de plantas

2.3.1 Micropropagação e vias morfogênicas

O cultivo *in vitro* de plantas, abrange um conjunto de técnicas de grande impacto na produção de mudas saudáveis e vigorosas, além de facilitar estudos de variáveis anatômicas, fisiológicas, bioquímicas e genéticas. Dentre as técnicas do cultivo de plantas, a micropropagação é aquela que mais tem se difundido e encontrado aplicações práticas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A propagação clonal *in vitro*, como também pode ser chamada a micropropagação, pode ser conduzida através de: multiplicação mediante indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta; e multiplicação via embriogênese somática. Dessa forma, a rota de desenvolvimento a ser tomada dependerá do tipo de explante utilizado, da indução a que será submetido e sua subsequente manipulação para regeneração (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; GONZÁLEZ et al., 2002).

A totipotência das células vegetais permite, de forma teórica, o uso de qualquer tecido vegetal como explante, mas a preferência é por aqueles que contenham maior porção de tecido meristemático ou mesmo, maior capacidade de expressar a totipotência (KERBAUY, 1999; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Além do tipo de explante, a indução organogênética é influenciada e determinada pelo genótipo, fitorreguladores, meio de cultura e condições de cultivo (HOU e JIA, 2004; PARAMAGEETHAM et al., 2004). Há muitas espécies, entretanto, para as quais não foi evidenciada, na prática, a capacidade regenerativa (KERBAUY, 1999; PERES, 2002).

A micropropagação apresenta grandes vantagens e aplicações, como a obtenção de mudas livres de doenças para os plantios comerciais, bem como viabiliza o cultivo comercial de espécies raras na natureza, minimizando o extrativismo predatório de espécies nativas (LAMAS, 2004).

2.3.2 Reguladores de crescimento

Os reguladores de crescimento são fatores determinantes no padrão de desenvolvimento da maioria dos sistemas de cultivo *in vitro* de plantas, pois sua adição em meios nutritivos é capaz de suprir possíveis deficiências endógenas dos explantes (CALDAS et al., 1998; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A auxina foi o primeiro regulador vegetal a ser descoberto. Em 1926, Fritz Went identificou a presença de uma substância ativa no crescimento de plantas, e a partir daí foram abertos caminhos para o estudo das mais diversas faces do envolvimento dessas substâncias na promoção de crescimento e desenvolvimento das plantas (KERBAUY, 2004). As auxinas atuam na expansão celular, participam também na divisão celular em cultura de tecidos, além de desempenharem um papel fundamental no enraizamento das plantas (KRIKORIAN, 1991).

Ao lado das auxinas, as citocininas são outra classe de fitorreguladores bastante utilizadas no cultivo *in vitro* de plantas. Desde a descoberta da primeira citocinina – cinetina – por Skoog, Miller e colaboradores, em 1955, o número de substâncias definidas como tal tem crescido, incluindo uma grande variedade de compostos naturais e sintéticos, derivados de adenina e feniluréia (MOK e MOK, 2001).

De acordo com Kerbauy (2004), as citocininas são essenciais à citocinese, formação de cloroplastos, alterações na taxa metabólica, atividade enzimática, quebra de dominância apical, mobilização de nutrientes, retardamento da senescência e formação de tecidos e órgãos. Dentre as citocininas, destaca-se o BAP (6-benzilaminopurina), devido à eficácia demonstrada na multiplicação de diversas espécies *in vitro*, favorecendo a formação de brotos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

As giberelinas, por sua vez, constituem uma classe de fitorreguladores que também podem ser usada com sucesso na promoção de desenvolvimento dos cultivos *in vitro*. O GA₃ (ácido giberélico) encontra-se dentre as giberelinas mais usadas, apesar do número de giberelinas ser superior a setenta, o que faz com que o tecido vegetal possa demonstrar uma resposta dependente de uma giberelina específica. As giberelinas estão envolvidas na divisão e alongamento celulares, indução floral, quebra de dormência e mobilização de reservas em sementes, durabilidade pós-colheita de folhagens e flores ornamentais (KERBAUY, 2004). Dentre as aplicações do GA₃, destaca-se seu potencial no cultivo *in vitro* para promover o alongamento de partes aéreas (CALDAS et al., 1998; CHAGAS et al., 2005), mediado principalmente por uma maior plasticidade da parede celular (KERBAUY, 2004). Conforme Taiz e Zeiger (2004), as giberelinas promovem o alongamento de entrenós em diversas espécies, agindo diretamente no meristema intercalar.

2.3.3 Cultivo de embriões zigóticos

A embriogênese inicia-se a partir da fecundação, quando ocorre a fusão de um dos gametas do tubo polínico com a oosfera, resultando numa célula diplóide (zigoto) que após divisões mitóticas sucessivas, originará o zigoto, que antecede a formação do embrião (MARIATH et al., 2003).

A cultura de embriões é uma técnica do cultivo *in vitro* de plantas que propicia o estudo do desenvolvimento de embriões zigóticos isolados das sementes, condições experimentais difíceis de serem manipuladas quando o embrião encontra-se no interior dessas estruturas. Sob condições assépticas em meio de cultivo de composição química conhecida e adequada ao seu desenvolvimento, torna-se mais fácil identificar as exigências essenciais para o crescimento, diferenciação e morfogênese dos embriões (RAGHAVAN, 2003; HU e FERREIRA, 1998). Além de possibilitar estudos fisiológicos e de nutrição em diferentes estádios da embriogênese, a cultura de embriões zigóticos tem sido usada na superação de dormência de sementes (por imaturidade embrionária ou presença de inibidores químicos no endosperma); testes de viabilidade de sementes, recuperação de híbridos inférteis e propagação clonal (HU e FERREIRA 1998; SANTOS 2003). Conseqüentemente, o cultivo de embriões zigóticos tem se estabelecido com sucesso para distintas espécies vegetais (SANTA-CATARINA et al., 2001; SOUZA et al., 2003; LEDO et al., 2007; ANDRADE et al., 2000), incluindo flores tropicais como estrelícia (PAIVA et al., 2004) e helicônia (TORRES et al., 2005).

2.3.4 Cultivo *in vitro* de gemas laterais

Durante o estabelecimento *in vitro* de um explante, haverá maior sucesso quando usados tecidos juvenis, com maior competência organogênica (PERES, 2002). O uso de tecidos meristemáticos já existentes, como gemas axilares, oferece uma fonte de explante vantajosa, pois já possui células meristemáticas competentes (SOUTO et al., 2007).

Estruturalmente, as gemas axilares das plantas apresentam um meristema apical e várias folhas jovens (SAJO e CASTRO, 2003). Tais gemas têm sido utilizadas amplamente não só para o estabelecimento como para multiplicação *in vitro* de diversas culturas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998), visto possuírem maior fidelidade genética (SANTOS, 2003).

As gemas laterais têm sido usadas com sucesso no estabelecimento *in vitro* de diversas plantas, como: *Prunus* sp. (SILVA et al., 2005), *Aniba rosaedora* (HANDA et al., 2005),

Pyrus spp. (ERIG e FORTES, 2002) e outras. Muitas vezes registra-se, no entanto, a ocorrência de oxidações fenólicas e contaminações microbianas, havendo a necessidade de se ajustar medidas profiláticas, como descrito pelos referidos autores.

2.4 Contaminação microbiana na etapa de estabelecimento *in vitro* dos explantes

Um fator de suma importância no estabelecimento *in vitro* de explantes é promover a desinfestação do tecido sem conduzi-lo à morte quando isolado. Fungos e algumas bactérias encontram no meio de cultivo condições propícias ao seu desenvolvimento, crescendo de forma acelerada e competindo com os tecidos vegetais pelos nutrientes contidos no meio de cultura. (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A contaminação microbiana pode ser decorrente de um procedimento ineficiente de assepsia dos explantes na fase de pré-inoculação ou mesmo de microrganismos resistentes aos produtos utilizados ou de microrganismos endofíticos, que escapem da desinfestação superficial. Para evitar esses problemas têm sido tomados cuidados fitossanitários especiais com as plantas matrizes, além da utilização de antibióticos e fungicidas não só na etapa de desinfestação dos explantes (normalmente incluindo o uso de hipoclorito de sódio e/ ou cálcio), como também suplementados ao meio de cultivo (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Além disso, segundo Pierik (1990), explantes aparentemente isentos de microrganismos podem apresentar contaminação interna, visível somente após determinado período de cultivo *in vitro* ou até mesmo, após vários subcultivos. As bactérias endofíticas, as quais convivem harmonicamente com a planta em seu habitat natural, durante a micropropagação podem competir com os explantes devido ao ambiente favorável para seu crescimento (SANTOS et al., 2005).

Ventura et al. (2001) ressaltam que a importância do tempo de desinfestação, bem como a concentração do agente desinfestante dependem das circunstâncias particulares de cada caso, devendo ser previamente testados, quando não se conhecem métodos eficientes para o material em estudo. Além disso, os autores citam a importância dos trabalhos que visem um método simples e eficiente de desinfestação sem que haja danos ao explante, como problemas de oxidação.

2.5 Oxidação fenólica durante o estabelecimento *in vitro* e estresse oxidativo em plantas

A oxidação do explante ocorre principalmente em função da liberação de compostos fenólicos pelos tecidos injuriados, decorrente da excisão dos explantes. O escurecimento dos tecidos tem sido atribuído à liberação e oxidação de compostos fenólicos, produzindo substâncias tóxicas e inibindo não só o crescimento dos explantes como também podendo acarretar a morte (ERIG e SCHUCH, 2003; SATO et al., 2001; MELO et al., 2001; FLORES et al., 1998).

O escurecimento de tecidos vegetais excisados, assim como do meio de cultura, ocorre com freqüência. A severidade da oxidação varia de acordo com a espécie, tecido ou órgão, fase de desenvolvimento da planta, idade do material vegetal, meio nutritivo utilizado e outras variáveis do cultivo *in vitro*. Quando muito severa, está associada com a morte precoce do explante ou visível retardo do seu desenvolvimento (HUANG et al., 2002).

O acúmulo de polifenóis e produtos de oxidação, como melanina, suberina, lignina, cutina e calose ao redor da superfície excisada, modificam a composição do meio de cultivo e a absorção de metabólitos, prejudicando o desenvolvimento do explante (ANDRADE et al., 2000).

Considerando a importância desse aspecto, vários têm sido os estudos a fim de evitar ou minimizar a oxidação dos explantes na fase inicial do cultivo *in vitro*. Entre os principais fatores estudados, destacam-se: lavagem dos explantes em água corrente, antes da desinfestação, a fim de auxiliar na lixiviação de compostos fenólicos; incubação no escuro (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998); redução da luminosidade; adição de substâncias antioxidantes como os ácidos cítrico e ascórbico, polivinilpirrolidona (PVP) e carvão ativado (FLORES et al., 1998; MELO et al., 2001; ERIG e SCHUCH, 2003; HANDA et al., 2005; BASSAN et al., 2006).

Os ácidos cítrico e ascórbico são usados como agentes quelantes, ligando-se aos metais presentes no meio e evitando que estes fiquem disponíveis e se oxidem (GEORGE, 1996 *apud* MELO et al., 2001). Seu efeito contra a oxidação tem sido relatado, principalmente, em soluções de lavagem antes da inoculação dos explantes (LEDO et al., 2002). O polivinilpirrolidona (PVP) é um composto de alta massa molar que devido à sua baixa solubilidade, é hábil na remoção de compostos fenólicos em soluções, mediante a formação de pontes de hidrogênio entre os compostos naturais e o PVP (FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2002). Já o carvão ativado adsorve compostos tóxicos formados durante a oxidação de compostos fenólicos e, além disso, propicia um ambiente escuro que minimiza a

incidência luminosa na base do explante, diminuindo a oxidação (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Situações de estresse nas plantas podem acarretar em modulação de respostas defensivas, para que possa ser restabelecido o metabolismo normal. O estresse oxidativo reúne uma série de perturbações fisiológicas (SOARES e MACHADO, 2007). Praticamente todo estresse, biótico ou abiótico está associado ao estresse oxidativo. O oxigênio molecular, quando em contato com os sistemas metabólicos, pode formar espécies reativas de oxigênio (ROS) que causam sérios danos celulares (SMIRNOFF, 1993).

As espécies reativas de oxigênio apresentam-se na forma de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^\cdot) e ânion superóxido (O_2^-) e constituem subprodutos do metabolismo celular, tendo como pontos de produção os peroxissomos, as mitocôndrias e os cloroplastos, assim como podem ser gerados diante de determinados períodos de desenvolvimento nas plantas, como maturação de sementes. Além disso, estresses ambientais favorecem e mesmo intensificam a produção de ROS, e isso pode funcionar não só como uma espécie de sinalização a múltiplas respostas de defesa, como também, quando em níveis elevados de produção, vir a constituir danos a diversas classes de biomoléculas, como proteínas, DNA e lipídios (MULLINEAUX et al., 2000; MITTLER, 2002; SOARES e MACHADO, 2007).

Enzimas e substâncias antioxidantes podem ser mobilizadas a fim de proteger a célula contra o excesso ou a produção inapropriada de espécies reativas de oxigênio, formadas em decorrência de danos oxidativos (BULBOVAS et al., 2005).

Os danos oxidativos em células e compartimentos subcelulares podem ser evitados pela ativação de mecanismos de defesa enzimáticos (superóxido dismutase, peroxidases, catalase) assim como não enzimáticos (glutationa, ascorbato, α -tocoferol, tioredoxina) (AGARWAL e SHAHENN, 2007; MAGER et al., 2000).

2.6 O papel da peroxidase e polifenoloxidase em processos morfogenéticos e oxidativos no sistema celular vegetal

O sistema de defesa enzimático tem a função de remover ou neutralizar as ROS do interior das células vivas. No processo de desintoxicação celular, a ação combinada dos sistemas enzimáticos e não enzimáticos é importante para evitar danos oxidativos celulares em plantas submetidas a variadas condições de estresse (MAGER et al., 2000).

A polifenoloxidase e a peroxidase estão entre as principais oxidases responsáveis por reações oxidativas dos polifenóis (POURCEL et al., 2006).

A polifenoloxidase é uma enzima que contém cobre como cofator e usa o oxigênio molecular para oxidar o-difenóis a o-quinonas e, em algumas plantas, oxida monofenóis a o-difenóis (WANG e CONSTABEL, 2004). A polifenoloxidase é uma enzima intracelular, localizada principalmente na membrana dos cloroplastos e sua ativação ocorre durante infecção por microrganismos ou injúrias mecânicas, resultando em formação de quinonas e conseqüentemente, de polímeros insolúveis que proporcionam uma barreira, prevenindo contra a expansão de infecções nas plantas (LOPES et al., 2000).

Já as peroxidases são hemeproteínas que também catalisam a oxidação de compostos fenólicos e estão envolvidas na oxidação da auxina ácido indol-3-acético (AIA), na lignificação, na cicatrização de ferimentos, na defesa contra patógenos, entre outros processos fisiológicos (GASPAR et al., 1982; KAO, 2003; POURCEL et al., 2006). Além de participar do mecanismo antioxidante, a peroxidase também atua na morfogênese em vista da sua atuação na oxidação de AIA, e pode, portanto, ser usada como um marcador bioquímico na elucidação e acompanhamento de processos morfogenéticos em plantas (ANDERSEN, 1986; LIMA et al, 2002).

Várias respostas e correlações têm sido documentadas a respeito de estresses ambientais em plantas, no entanto, ainda existem vários questionamentos (SOARES e MACHADO, 2007). Dessa forma, a identificação da oxidação fenólica em tecidos cultivados *in vitro* pode ser avaliada com maior profundidade a partir de estudos correlacionados à atividade de enzimas antioxidativas. A utilização de marcadores bioquímicos, como a peroxidase, pode transpor a subjetividade da identificação visual da morfogênese *in vitro* e auxiliar na identificação precoce de tais processos (PIZA et al., 2003).

3. Referências Bibliográficas

AGARWAL, S.; SHAHEEN, R. Stimulation of antioxidant system and lipid peroxidation by abiotic stresses in leaves of *Momordica charantia*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.19, n.2, p.149-161, 2007.

ANDRADE, M.W.; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.1, p.174-180, 2000.

ANDERSEN, W.C.A. A revised medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. **Journal American American Society Horticultural Science**, v.109, p.343-347, 1986.

BASSAN, J.S.; REINIGER, L.R.S.; ROCHA, B.H.G; SEVERO, S.R.P.; FLÔRES, A.V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meio de cultura no estabelecimento de canafístula (*Peltophorum dubium* (SPRENG.) TAUB.). **Ciência Florestal**, outubro-dezembro, v.16, n.4, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil, p. 381- 390, 2006.

BROSCHAT, T.K. Fertilization rate affects production and postharvest quality of *Tapeinochilus ananassae* flowers. **HortScience**, v.30. n.5. p.1013-1014. 1995.

BULBOVAS, P.; RINALDI, M.C.S.; DELITTI, W.B.C.; DOMINGOS, M. Variação sazonal em antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). **Revista Brasileira de Botânica**, v.28, n.4, p.687-698, out.-dez. 2005.

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

CHAGAS, E.A.; PASQUAL, M.; RAMOS, J.D.; PIO, L.A.S. Cultivo de embriões imaturos de Citros em diferentes concentrações de carvão ativado e ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.29, n.6, p.1125-1131, nov.-dez, 2005.

COELHO, R.S.B.; KITAJIMA, E.W. Ocorrência de *Rhabdovirus* em *Tapeinochilos ananassae* no estado de Pernambuco. **Palestras e Resumos: XXXV Congresso Brasileiro**

de Fitopatologia. **Revista Oficial da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**. v.27. Suplemento. Agosto. 2002. ISSN 0100-4158.

DINIZ, J.D.N.; MAGALHÃES, J.R.; INNECCO, R.; ALMEIDA, J.L.; PINHOS, J.L.N. Multiplicação e enraizamento *in vitro* do guaco. **Revista Ciência Agronômica**, v.37, n.1, p.59-64, 2006.

ERIG, A.C.; FORTES, G.R.L. Estabelecimento de pereira (*Pyrus spp.*) *in vitro* a partir de meristemas e gemas. **Ciência Rural**, v.32, n.4, p.577-582, 2002.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.9, n.3, p.221-227, jul-set, 2003.

FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I.C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, v.25, n.3, São Paulo, maio, 2002.

FERRERO, M.D. The genus *Tapeinochilos* from New Guinea: lifting the veil on the least know member of Costaceae. **The Bulletin of Heliconia Society**. Janeiro. p.5-10. 2001.

FLORES, R.; STEFANELLO, S.; FRANCO, E.T.H.; MANTOVANI, N. Regeneração *in vitro* de Espinheira-Santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.4, n.3, p.201-205, Set.-Dez.,1998.

FURTADO, D.C.M.; AMORIM, E.P.R.; GALVÃO, A.L.B.; CARNAÚBA, J.P.; OLIVEIRA, J.N. Ocorrência de *Curvularia lunata* e *Curvularia eragrostidis* em *Tapeinochilos ananassae* no Estado de Alagoas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, p.201, 2007.

GASPAR, T.H.; PENEL, C.L.; THORPE, T.; GREPPIN, H. Peroxidases: a survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. **Genève: Université de Genève**, 1982. 324p.

GONZÁLEZ, E.R.; ANDRADE, A.; BERTOLO, A.L.. Transformação genética do eucalipto. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.5, n.26, p.18-22, 2002.

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

HANDA, L.; SAMPAIO, P.T.; QUISEN, R.C. Cultura de embriões e de gemas de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amazonas**. v.35, n.1 Manaus. 2005.

HUANG, L.; LEE, Y.; HUANG, B.; KUO C.; SHAW, J. High polyphenol oxidase activity and low titratable acidity in browning bamboo tissue culture. **In Vitro Cell Development of Biology**, v.38, p.358-365, 2002.

HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. **Cultura de embriões**. *In*: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CBAB, p.371-394, 1998.

HOU, S.W.; JIA, J.F. High frequency plant regeneration from *Astragalus melilotoides* hypocotul and stem explants via somatic embryogenesis and organogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.79, p.95-100, 2004.

JÚNIOR, R.J.C.; FILHO, W.L. Produção de flores tropicais na Zona da Mata de Pernambuco: uma nova alternativa de diversificação após a crise da agroindústria canavieira. **GEPEC**, v.7, n.3, 2003.

KAO, C.H. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v.39, p.83-89, 2003.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004.

KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. *In*: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI / Embrapa - CNPH, v.2, 1999, p.519-531.

KIYUNA, I.; FRANCISCO, V.L.F.S.; COELHO, P.J.; CASER, D.V.; ASSUMPÇÃO, R.; ÂNGELO, J.A. Floricultura brasileira no início do século XXI: o perfil do produtor. **Informações Econômicas**, SP, v.34, n.4, abr. 2004.

KRIKORIAN, A.D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. *In*: ROCA, W.M.; MROGINSKY, L.A. (Eds.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. p.41-77.

LAMAS, A.M. **Floricultura em Pernambuco**. Recife: SEBRAE-PE, 2004. 82p. (Série. Agronegócio).

LEDO, A.S.; LAMEIRA, O.A.; BENBADIS, A.K. Explantes de cupuaçuzeiro submetidos a diferentes condições de cultura *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.3, p.604-607, 2002.

LEDO, A.S.; GOMES, K.K.P.; BARBOSA, S.B.S.C., VIEIRA, G.S.S.; TUPINAMBÁ, E.A.; ARAGÃO, W.M. Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos e aclimação de plântulas de coqueiro-anão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.2, p.147-154, fev. 2007.

LIMA, G.P.P.; BARSALOBRES, C.; PIZA, I.M.T.; CEREDA, M.P. Efeito do BAP e ANA e atividade da peroxidase em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz cv MCOL 22) cultivada *in vitro*. **Revista Brasileira de Agrocência**, v.8, n.2, p.107-110, mai-ago, 2002.

LINS, S.R.O.; COELHO, R.S.B. Ocorrência de doenças em flores tropicais no Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.3, maio-jun, 2003.

LOGES, V.; TEIXEIRA, M.C.F.; CASTRO, A.C.R.; COSTA, A.S. Colheita, pós-colheita e embalagem de flores tropicais em Pernambuco. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.3, p.699-672, 2005.

LOPES, L.M.V.; PEREIRA, R.G.F.A.; MENDES, A.N.G.; VILELA, E.R.; CARVALHO, V.D. Avaliação da qualidade de grãos de diferentes cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Revista Brasileira de Armazenamento**, Especial café, n.1, p.3-8, 2000.

MAGER, W.H; BOER, A.H.; SIDERLUS, M.H.; VOSS, H.P. Cellular responses to oxidative and osmotic stress. **Cell Stress & Chaperones**, v.5, n.2, p.73- 75, 2000.

MARIATH, J.E.A.; SANTOS, R.P.; BITTENCOURT JR, N.S. **Flor**. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Org.). ANATOMIA VEGETAL. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, v.1, p.329-373, 2003.

MELO, B.; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirubeira [*Syagrus oleracea* (MART.) BECC.]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.6, p.1301-1306, nov.-dez., 2001.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.9, p. 405-410, 2002.

MOK, D. W. S.; MOK, M. C. Cytokinin metabolism and action. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.52, p.89- 118, 2001.

MULLINEAUX, P.; BALL, L.; ESCOBAR, B.; KARPINSKA, B.; CREISSEN, G.; KARPINSKI, S. Are diverse signalling pathways integrated in the regulation of *Arabidopsis* antioxidant defence gene expression in response to excess excitation energy? **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v.355, n.1402, p.1531-40, 2000.

PAIVA, P.D.O.; PAIVA, R.; PASQUAL, M. PAIVA, L. V. Estabelecimento *in vitro* de estrelícia (*Strelitzia reginae* Banks.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.5, p.1031-1037, set.-out. 2004.

PAIVA, W.O.; LOGES, V. Costaceae. In: TERAPO, D.; CARVALHO, A.C.P.P.; Barroso, T.C.S.F. **Flores Tropicais**. EMBRAPA. Brasília – DF. p.141-153. 2005.

PARAMAGEETHAM, C. BABU, G.P.; RAO, J.V.S. Somatic embryogenesis in *Centella asiatica* L. na important medicinal and nutraceutical plant of India. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.79, p.19-24, 2004.

PERES, L.E.P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas. **Biociência & Desenvolvimento**, n.25, março/abril 2002.

PIZA, I.M.T.; LIMA, G.P.P.; BRASIL, O.G. Atividade de peroxidase e níveis de proteínas em plantas de abacaxizeiro micropropagadas em meio salino. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.9, n.4, p.361-366, out.-dez., 2003.

PIERIK, R.L.M. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. 3ªed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 326p.

POURCEL, L.; ROUTABOUL, J.; CHEYNIER, V.; LEPINIEC, L.; DEBEAUJON, I. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. **Plant Science**, v.12, n.1, 2006.

REETZ, E. R. et al. **Anuário Brasileiro das Flores 2007**. Editora Gazeta Santa Cruz. Santa Cruz do Sul, 2007, 112p.

SANTOS, M. H. L. C.; MARIANO, R. L. R.; CAMARA, T. R.; ANDRADE, A. G.; WILLADINO, L.; LIMA, G. P. P. Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L.f. **Hoehnea**, v.32; n.2, p.1-8, 2005.

RAGHAVAN, V. One hundred years of zygotic embryo culture investigations. **In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant**, v.39, n.5, Setember, 2003.

ROCHA, L. B. **A produção de flores no estado do Ceará em Baturité, Redenção e São Bedito**. Dissertação apresentada ao curso de mestrado em geografia, do centro de Ciências, da Universidade Federal do Ceará, Brasil, 2006.

SAJO, M.G.; CASTRO, N.M. **Caule**. In: Anatomia vegetal. APEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERRREIRO, S.M. (eds.), Viçosa, UFV, p.283-302, 2003.

SANTA-CATARINA, C.; MACIEL & S.C. PEDROTTI, E.L. Germinação *in vitro* e embriogênese somática a partir de embriões imaturos de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.24, n.4 (suplemento), p.501-505, 2001.

SANTOS, E. K. Totipotência celular e cultura de tecidos vegetais. In: Loreta Brandão Freitas; Fernanda Bered. (Org.). **Genética e Evolução Vegetal**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003, p.415-444.

SATO, A.Y.; DIAS, H.C.T.; ANDRADE, L.A.; SOUZA, V.C.. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. **Revista Cerne**, v.7, n.2, p.117-123, 2001.

SCHIMILDT, O.; SCHIMILDT, E.R.; AMARAL, J.A.T. Sulfato de adenina na multiplicação *in vitro* do mamoeiro 'Tainung 01'. **Scientia Agraria**, v.8, n.2, p.141-147, 2007.

SILVA, A.L.; FRANCO, E. T.H.; BISOGNIN, D.A.; DORNELLES, E.B.; WALTER, J.M. . Efeitos do nitrato de amônia na multiplicação e regeneração de gemas laterais de *Dyckia maritima* Baker – Bromeliaceae. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.11, n.3, p.369-371, jul-set, 2005.

SILVA, C.U.C. **Cultivo *in vitro* de espécies de Helicônia (*Heliconia spp.*) mediante embriogênese somática e embriões zigóticos.** Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Botânica (PPGB), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), 2005.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. **New Phytology**, v.125; p.27- 58, 1993.

SOARES, A.M.S.; MACHADO, O.L.T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v.1, n.1, p.9- 20, 2007

SOUTO, N.; MELO, G.; PAULINO, P.; ULISSES, C.; WILLADINO, L.; COSTA, D. Cultura de Tecidos: um instrumento na conservação da biodiversidade. *In*: MOURA, A. N.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. (orgs.) **Biodiversidade, potencial econômico e processos eco- fisiológicos em ecossistemas nordestinos**, Recife: COMUNIGRAF., p.279-301, 2007.

SOUZA, A.V.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; CORRÊA, R.; CASTRO, E.M. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. Edição Especial, p.1532-1538, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 719p., 2004.

TORRES, A.C.; DUVAL, F.G.; RIBEIRO, D.G.; BARROS, A.F.F.; ARAGÃO, F.A.D. Efeito da sacarose, cinetina, isopentenil adenina e zeatina no desenvolvimento de embriões de *Heliconia rostrata in vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.3, p.789-792, jul./ set. 2005.

VENTURA, G.M.; DIAS, J.M.M.; TEIXEIRA, S.L.; CARVALHO, V.S.; NOVAIS, R.F.; MOTOIKE, S.Y. ; GROSSI, J.A.S. Organogênese *in vitro* em gemas axilares dianteiras de plantas adultas de híbridos do grupo *Cattleya*. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.7, n.2, p.157-163, 2001.

WANG, J.; CONSTABEL, C.P. Three polyphenol oxidases from hybrid poplar are differentially expressed during development and after wounding and elicitor treatment. **Physiologia Plantarum**, v.122, n.3, p.344- 353, 2004.

Manuscrito

**CULTIVO *in vitro* E ATIVIDADE DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NA OXIDAÇÃO DE
EXPLANTES DE *Tapeinochilos ananassae* (Hassk). K. Schum.¹**

¹ Trabalho desenvolvido no Programa de Pós-Graduação em Botânica (PPGB/UFRPE) a ser enviado para a Revista Plant Cell, Tissue and Organ Culture.

***Cultivo in vitro* e atividade de enzimas envolvidas na oxidação de explantes de *Tapeinochilos ananassae* (Hassk). K. Schum.¹**

Nise de Fátima Coutinho Souto^{1,7*}; Cláudia Ulisses de Carvalho Silva²; Ana Lúcia Figueiredo Porto³; Isabelle Maria Jacqueline Meunier^{4, 7}; Gilvany Rodrigues de Andrade⁵; Gileno Vitor Mota Lima^{1,7}; Lilia Gomes Willadino^{6,7}

¹Programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco; ²Unidade Acadêmica da Universidade Federal Rural de Pernambuco em Garanhuns, Rua Bom Pastor, s/n Boa Vista, CEP: 55296280, Garanhuns, PE s; ³Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901; ⁴ Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal Rural de Pernambuco; ⁵ Bióloga graduada pela Universidade Federal Rural de Pernambuco; ⁶ Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco; ⁷ Rua Dom Manoel de Medeiros, s/ n, Dois Irmãos, Recife- PE, Brasil, CEP:52171900.

* Autor para correspondência: E-mail: nise_souto@hotmail.com; fone: (81) 3320 6364.

ABSTRACT

Zygotic embryos and lateral buds of *Tapeinochilos ananassae* Hassk. K. Schum were inoculated in MS medium, full or reduced to its half salts concentration ($\frac{1}{2}$ MS), using three sources of antioxidants: ascorbic acid, activated charcoal and PVP, in concentrations $0,25\text{g L}^{-1}$; $3,0\text{g L}^{-1}$ e $0,5\text{g L}^{-1}$, respectively. The $\frac{1}{2}$ MS medium supplemented with 3.0g L^{-1} activated charcoal promoted the best establishing of embryos. The plants derived from the embryos were subcultivated by nodal segments in different concentrations of BAP and GA₃: $\frac{1}{2}$ MS; $\frac{1}{2}$ MS + 0.5mg L^{-1} GA₃; $\frac{1}{2}$ MS + 1.0mg L^{-1} GA₃; $\frac{1}{2}$ MS + 0.5mg L^{-1} BAP; $\frac{1}{2}$ MS + 0.5mg L^{-1} BAP + 0.5mg L^{-1} GA₃; $\frac{1}{2}$ MS + 0.5mg L^{-1} BAP + 1.0mg L^{-1} GA₃. Satisfactory results in multiplication and higher conditions of the development of aerial part and roots had been seen at the plants in $\frac{1}{2}$ MS medium. The buds had not presented development, besides intense phenolic oxidation and high microbial contamination had been seen, mainly bacterial in the buds extracted from basal branches. In the enzymatic analysis of lateral buds that had been cultivated *in vitro* in oxidation process, the activity of peroxidase had decrease through the time, while the activity of polyphenoloxidase had tended to enlarge during the oxidation process of explants.

Key-words: tropical flowers; *in vitro* culture; peroxidase; polyphenoloxidase; organogenesis; phenolic oxidation

Abbreviations: BAP- 6- benzylaminopurine; GA₃- giberelic acid; PVP- polyvinylpyrrolidone; MS- Murashige and Skoog medium

INTRODUÇÃO

A espécie *Tapeinochilos ananassae* Hassk. K. Schum. destaca-se entre as flores tropicais de elevada aceitação no mercado mundial (Broschat 1995), tendo em vista a cor vermelha brilhante de suas inflorescências e o arranjo espiralado de suas hastes vegetativas.

A baixa viabilidade de suas sementes faz da propagação vegetativa a sua principal forma de reprodução, o que pode facilitar a disseminação de pragas e doenças entre as mudas (Paiva e Loges 2005).

A cultura de tecidos de plantas apresenta-se como uma ferramenta importante para a produção de mudas sadias a curto prazo e em espaço reduzido. Para iniciar as culturas *in vitro*, embriões zigóticos e gemas têm sido bastante utilizados como explantes, dada a sua juvenildade e totipotência (Grattapaglia e Machado 1998).

O estabelecimento dos explantes é etapa crucial no cultivo *in vitro* e, dentre os mais sérios aspectos desse processo, destacam-se a contaminação microbiana e a oxidação fenólica (Erig e Schuch 2003). A espécie e o tipo de explante podem variar e responder de forma diferente à ação de reguladores de crescimento (Lima et al 2002).

Tendo em vista a ausência de referências na literatura consultada sobre o cultivo *in vitro* de *Tapeinochilos ananassae* e dado seu destaque na floricultura tropical a nível mundial, este trabalho teve por objetivo avaliar o estabelecimento da espécie considerando diferentes tipos de explante, oxidação fenólica e contaminação microbiana; além de estabelecer condições de cultivo das plantas e estudar marcadores bioquímicos envolvidos no processo organogenético e oxidativo dos tecidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo *in vitro*: Embriões zigóticos e gemas laterais de *Tapeinochilos ananassae* foram cultivados em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) completo ou com a metade da força iônica ($\frac{1}{2}$ MS), suplementado com três tipos de antioxidantes: ácido cítrico, carvão ativado ou polivinilpirrolidona. O primeiro experimento foi constituído de oito tratamentos: $\frac{1}{2}$ MS, $\frac{1}{2}$ MS + 0,25g. L⁻¹ ácido cítrico; $\frac{1}{2}$ MS + 3,0g. L⁻¹ carvão ativado; $\frac{1}{2}$ MS + 0,5g. L⁻¹ PVP; MS, MS + 0,25g. L⁻¹ ácido cítrico; MS + 3,0g. L⁻¹ carvão ativado; MS + 0,5g. L⁻¹ PVP. No cultivo de embriões zigóticos utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com 15 repetições por tratamento. No cultivo de gemas laterais advindas de ramos basais e apicais utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado. Durante os 8 dias iniciais, as culturas permaneceram no escuro. Em relação aos embriões, foram realizadas observações durante 30 dias de cultivo, quando se analisou: a formação de plantas, a ocorrência de embriões sem desenvolvimento e a oxidação. Foi utilizado o teste z para análise de proporção (Vieira 2003), com correção de continuidade e $\alpha=5\%$. Quanto às gemas laterais, devido à ausência de estruturas regenerativas, foi realizada análise histológica e bioquímica, além de avaliar a homogeneidade das proporções de contaminação microbiana pelo teste de qui-quadrado (λ^2) a $\alpha=5\%$. Após a fase de estabelecimento *in vitro*, um segundo experimento foi elaborado e conduzido utilizando os segmentos nodais provenientes do desenvolvimento dos embriões zigóticos. Os segmentos nodais foram inoculados em meio $\frac{1}{2}$ MS, utilizando 2 concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) combinadas com 3 concentrações de GA₃ (Ácido giberélico): $\frac{1}{2}$ MS; $\frac{1}{2}$ MS+0,5mg. L⁻¹ GA₃; $\frac{1}{2}$ MS+1,0mg. L⁻¹ GA₃; $\frac{1}{2}$ MS+0,5mg. L⁻¹ BAP; $\frac{1}{2}$ MS+0,5mg. L⁻¹ BAP+0,5mg. L⁻¹ GA₃; $\frac{1}{2}$ MS+0,5mg. L⁻¹ BAP+1,0mg. L⁻¹ GA₃. Após 45 dias de cultivo observou-se o número de folhas, número de nós, número de raízes e massa fresca total (g) das plantas. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado e com 14 repetições por tratamento. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e na comparação de médias aplicou-se o Teste de Tukey a 5%, por meio do programa ASSISTAT 7.5 Beta. Em todos os meios nutritivos referentes aos experimentos foi acrescido 6,5 g L⁻¹ de ágar e o pH ajustado para 5,8 para então serem esterilizados em autoclave a 121°C a 1 atm, durante 20 minutos. A unidade experimental constou de um explante por tubo de ensaio (20 x

150 mm) contendo 10 mL de meio nutritivo. As culturas foram mantidas em sala de crescimento a uma temperatura de $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas, com intensidade luminosa de $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Análise histológica: A fim de verificar a integridade dos tecidos as gemas foram fixadas em FAA 50 (Johansen 1940). Realizaram-se cortes transversais à mão livre, os quais foram clarificados com hipoclorito de sódio (30%), lavados em água destilada e posteriormente corados com Safrablau (Kraus e Arduin 1997). Após a coloração os cortes foram montados em água glicerizada 66% e a lutagem foi feita com esmalte incolor. Foram realizadas imagens através de câmera digital acoplada ao microscópio ótico Coleman modelo XSZ – 107BN projetando-se, nas mesmas condições ópticas, as escalas correspondentes.

Análises bioquímicas: A atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase foram avaliadas em gemas laterais por ocasião da extração e aos 7, 14 e 21 dias de cultivo. Amostras de 0,05g de matéria fresca foram maceradas em nitrogênio líquido, com auxílio de almofariz e pistilo, em 2,5mL de Tampão Fosfato de Sódio 0,1M pH=6,5, sendo toda essa fase experimental realizada à temperatura de 0 a 4°C . Os extratos foram centrifugados por 15 min a 8.000 rpm, e o sobrenadante foi mantido a -20°C até o momento das análises. Os ensaios foram realizados em triplicatas e constaram das seguintes análises: teor de proteínas solúveis totais (Bradford 1976), atividade da peroxidase (Vieira e Fatibello-Filho 1998) e atividade da polifenoloxidase (Kar e Mishra 1976). O cálculo da atividade específica das enzimas foi realizado dividindo-se a atividade pelo conteúdo protéico ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa fresca) para cada amostra. Os dados foram submetidos à análise de regressão polinomial e expressos em $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteína. g^{-1} massa fresca.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estabelecimento *in vitro* dos embriões zigóticos

Aos 30 dias de cultivo, os embriões zigóticos cultivados em $\frac{1}{2}$ MS suplementado com $3,0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de carvão ativado apresentaram proporções de plantas formadas superior aos demais tratamentos e menores proporções de oxidação e não desenvolvimento de embriões. (Tabela 1). O carvão ativado nas concentrações de $2,5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ nos meios de cultivo para *Piper hispidinervum* C. DC. (Guedes et al. 2006) e $0,1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa* (Souza et al. 2003) favoreceu a germinação e produziu plantas mais vigorosas.

O efeito benéfico do carvão ativado está associado à adsorção de substâncias tóxicas, como os compostos fenólicos e produtos de sua degradação, liberados pelos tecidos vegetais em cultivo *in vitro*, ocasionando menor toxidez para os explantes (Corrêa et al. 2003). No presente estudo, não foi observado resultado favorável ao estabelecimento *in vitro* dos embriões não foi visto quando o carvão ativado foi adicionado ao meio de cultivo MS em sua concentração salina original (Tabela 1). Embriões de *Lychnophora pinaster* Mart. (Souza et al. 2003) também apresentaram desenvolvimento mais efetivo em meios de cultivo mais diluídos. Entretanto embriões de estrelícia (*Strelitzia reginae* Banks.) responderam de forma similar a diferentes concentrações de sais do MS (Paiva et al. 2004). Além de possuírem um maior potencial hídrico, meios mais diluídos têm concentração reduzida de alguns metais, como o ferro, cobre e zinco, que podem ser cofatores ou mesmo parte da estrutura de enzimas oxidativas, podendo aumentar a suscetibilidade dos explantes à oxidação (Utino et al. 2001).

Neste trabalho, a adição de PVP foi pouco eficiente nos meios de cultivo para estabelecimento *in vitro* dos embriões zigóticos de *Tapeinochilos ananassae*. Quando associado ao meio MS observou-se maior número de embriões oxidados e não desenvolvidos, além de menor proporção de formação de plantas. Em estudos com guarabirobeira, Melo et al. (2001) perceberam que o PVP ($0,4\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) não foi capaz de controlar a oxidação e a que a porcentagem de germinação foi reduzida em cerca de 15% em relação a outros antioxidantes. Por outro lado, o estabelecimento *in vitro* de *Lippia sidoides* Cham. (pimenta-alecrim), tanto o carvão ativado como o PVP mostraram-se eficientes na conversão de embriões zigóticos em

plantas e, neste caso, os autores sugerem o uso do carvão ativado por apresentar menor custo financeiro (Costa et al. 2007).

Cultivo de segmentos nodais

Aos 45 dias de cultivo observou-se um melhor desenvolvimento das plantas de *Tapeinochilos ananassae* cultivadas em meio $\frac{1}{2}$ MS isento de reguladores de crescimento. O número de folhas, de nós e de raízes decresceu significativamente à medida que os reguladores de crescimento BAP e GA₃ foram adicionados (Figuras 1 e 2).

No presente estudo, as plantas de *Tapeinochilos ananassae* em meio nutritivo suplementado com GA₃ apresentaram tendência à clorose, com desenvolvimento não significativo do número de nós. Resultados similares foram vistos em *Ficus indica* (Fráguas et al. 2004), em que a presença da giberelina prejudicou a formação de brotações e da parte aérea, resultando em folhas alongadas e cloróticas. A adição de reguladores de crescimento no cultivo de segmentos nodais de *Tapeinochilos ananassae* resultou ainda na formação de calos na base dos explantes com tendência à oxidação (Figura 2).

A formação de calosidade na base do segmento nodal, devido ao acúmulo de carboidratos, não é desejável nessa fase de multiplicação, pois o calo pode comprometer a proliferação de gemas axilares e afetar o enraizamento (Grattapaglia e Machado, 1998), fazendo com que a planta reduza a absorção dos nutrientes do meio, sobretudo os reguladores de crescimento (Andrade et al. 2001). Em plantas de acácia negra (*Acacia mearnsii* De Wild.), a suplementação do meio nutritivo com citocininas, promoveu a formação de calos basais nos explantes (Borges Junior et al. 2004).

A presença de fitorreguladores promoveu uma tendência à hiperhidricidade e formação de calos, podendo acarretar em incremento da massa fresca das plantas em *Tapeinochilos ananassae*, de forma que não houve diferenças significativas entre os tratamentos, ainda que as plantas cultivadas em meio $\frac{1}{2}$ MS sem reguladores de crescimento tenham apresentado melhor formação de parte aérea e raízes (Tabela 2 e Figura 1).

Em relação ao número de brotos formados, não houve diferença significativa entre o tratamento na presença ou ausência de reguladores de crescimento. A ausência de reguladores de crescimento nos meios nutritivos além de propiciar a formação de plantas com boas características morfofisiológicas, reduz o custo da micropropagação em *Tapeinochilos ananassae*.

Aspectos anatômicos e estabelecimento *in vitro* de gemas laterais

No presente estudo, não houve desenvolvimento de plantas nos tratamentos utilizados no estabelecimento *in vitro* das gemas laterais de *Tapeinochilos ananassae*. Diante disso, foi analisada a anatomia da gema lateral, recém extraída da planta matriz, através de fotomicrografia de cortes transversais, para verificar a integridade dos tecidos. Dessa forma foi possível observar o potencial organogenético do explante, uma vez que o ápice caulinar apresentou-se com células indiferenciadas, e, portanto, com o meristema íntegro. Em volta do ápice caulinar, observaram-se bainhas foliares, sendo as mais internas menos diferenciadas, enquanto que as mais externas apresentaram maior diferenciação, com xilema e floema mais amadurecidos e funcionais. Na epiderme foi observada apenas uma camada de células e a presença de uma fina camada de cutícula, além de pêlos epidérmicos unicelulares (Figura 2).

Foi verificada elevada oxidação fenólica e contaminação microbiana, contribuindo de forma negativa para o desenvolvimento dos explantes. Aos 15 dias de cultivo, já era aparente a oxidação do material vegetal em todos os meios de cultivo, havendo oxidação total dos explantes no período compreendido entre os 20 e 30 dias de cultivo, independente do antioxidante utilizado. De acordo com Grattapaglia e Machado (1998) a oxidação fenólica pode ser inerente ao tecido da planta utilizado, não ocorrendo resposta eficiente à adição de antioxidantes. Gemas de estrelícia também apresentaram elevadas taxas de oxidação que impediam o desenvolvimento dos explantes (Paiva et al. 2004).

A contaminação microbiana alcançou 46,9% das gemas cultivadas. Considerando como 100% o total de gemas contaminadas, a contaminação microbiana nas gemas provenientes de ramos basais foi de 84%, apresentando-se significativamente superior ($\chi^2 = 65,28$; $p < 0,05$) em relação às gemas de ramos apicais (16%). Considerando como 100% o total de gemas inoculado de acordo com sua posição (de ramos basais ou apicais), as gemas laterais de ramos basais apresentaram maior frequência de contaminação por fungos (36,2%) e bactérias (42,5%), com valores de χ^2 de 18,06 e 29,17 respectivamente ($p < 0,05$); enquanto que os valores foram de 2,5% e 12,5%, respectivamente, para fungos e bactérias, em gemas de ramos apicais. Gemas laterais de ramos basais apresentam, em geral, superfícies irregulares e pilosas, associada a menor juvenilidade, que dificulta a desinfestação (Torres et al., 1998).

Em gemas de variedades de *Malus domestica* Borkh cultivadas *in vitro*, as contaminações bacterianas alcançaram um índice de 56% na cv. Galaxy, mas a contaminação fúngica não ultrapassou 1,4% para esta variedade e as demais (cvs. Mastergala e Maxigala) (Erig e Schuch 2003). No estabelecimento *in vitro* de *Aniba rosaeodora* Ducke (pau-rosa), Handa et al. (2005) observaram elevadas contaminações bacterianas e fúngicas em gemas apicais advindas da rebrota de mudas; no entanto, citam uma menor incidência de bactérias nas culturas quando foram utilizadas brotações mais recentes.

Atividade específica da peroxidase e polifenoloxidase

Ocorreu decréscimo da atividade da peroxidase ao longo do cultivo *in vitro* das gemas laterais. Aos 7 dias, a atividade da enzima sofreu queda de 26,5%, de 51,2% aos 14 dias e de 58,8% aos 21 dias, em relação às gemas recém-extraídas da plantas matriz (Figura 3A).

A diminuição da atividade da peroxidase coincide com a crescente oxidação dos explantes, que durante os 21 dias de cultivo, não demonstraram desenvolvimento organogenético. Resultados semelhantes foram obtidos por Andersen (1986), sugerindo que a baixa atividade da enzima poderia estar relacionada com a perda do potencial morfogenético de células de *Rhododendron* cultivadas *in vitro*, assim como observado em calos de *Panax ginseng* (Bonfill et al 2003).

Em calos de laranja também foi observada correlação positiva entre a orgânogênese e atividade de peroxidase (Kochba e Spiegel- Roy, 1977). Em explantes de *Tulipa gesneriana* L. cv Apeldoorn a atividade da peroxidase aumentou em função de uma maior atividade metabólica dos tecidos, resultante da maior produção de peróxido de hidrogênio (Van Rossum et al. 1997).

A intensa oxidação fenólica aos 21 dias de cultivo pode ter afetado o mecanismo de defesa celular ao estresse oxidativo nas gemas de *Tapeinochilos ananassae* cultivadas *in vitro*, podendo neste caso, aumentar ou diminuir a atividade de certas enzimas envolvidas no sistema antioxidativo das células. A peroxidase pode degradar produtos como radicais livres (peróxidos) e fenóis (Lima et al. 1998), liberados em condições estressantes e passíveis de reagirem com as biomoléculas. Já a perda ou diminuição da atividade dessa enzima, condiz com uma elevada produção de metabólitos tóxicos, levando à morte celular.

No que diz respeito à polifenoloxidase, a atividade desta enzima apresentou uma discreta queda aos 7 dias iniciais de cultivo (16,2%), para então decair em 60% de sua atividade e finalmente, aos 21 dias, apresentou aumento em cerca de três vezes da atividade em relação às gemas recém-extraídas (Figura 4B). A elevada atividade da polifenoloxidase está diretamente correlacionada com o escurecimento dos tecidos em decorrência da polimerização de quinonas (Huang et al. 2002).

Na espécie *Tulipa gesneriana* L. cv Apeldoorn, Van Rossum et al. (1997) observaram que a elevação da atividade da polifenoloxidase acompanhou o grau de oxidação crescente dos tecidos *in vitro*. Da mesma forma, calos de *Virginia pine* (Tang e Newton 2004) apresentaram um ligeiro aumento da atividade da PPO ao longo do tempo, para depois decair nos calos sem oxidação, enquanto aumentou a atividade da referida enzima naqueles em que era claramente visível o processo oxidativo, com escurecimento dos tecidos.

Em gemas de várias espécies de bambu, Huang et al. (2002) perceberam que o escurecimento dos tecidos estendeu-se para células intactas em novos brotos formados, sugerindo que a autólise de células injuriadas – possivelmente ocorrida na excisão dos explantes - pode ser transmitida para as não injuriadas. Nas gemas de *Tapeinochilos ananassae*, foi percebido o escurecimento gradual dos tecidos, inicialmente na região basal estendendo-se, ao longo do tempo, para todo o explante

Dessa forma, as enzimas peroxidase e polifenoloxidase puderam, de fato, ser utilizadas como indicadores bioquímicos da organogênese e oxidação fenólica em gemas laterais de *Tapeinochilos ananassae* cultivadas *in vitro*.

AGRADECIMENTOS

À Capes pela bolsa concedida durante o curso de Mestrado.

REFERÊNCIAS

Andersen WCA (1986) A revised medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. Journal American American Society Horticultural Science, 109: 343-347.

Andrade LMCO, Pasqual M, Maciel ALR, Pereira AB, Cavalcante-Alves JM (2001) Cultura *in vitro* de embriões de *Coffea arabica*: influência de NAA e BAP. Ciência e Agrotecnologia, 25 (5): 1063-1070.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Bonfill M, Cusidó RM, Palazón J, Canut E, Piñol T, Morales T (2003). Relationship between peroxidase activity and organogenesis in *Panax ginseng* calluses. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 73: 37-41.

Borges Júnior N, Sorbosa RC, Martins-Coder MP (2004) Multiplicação *in vitro* de gemas axilares de acácia negra (*Acácia mearnsii* De Wild.). Arvore 28(4).

Broschat, TK (1995) Fertilization rate affects production and postharvest quality of *Tapeinochilus ananassae* flowers. HortScience 30: 1013-1014.

Corrêa RM, Pinto JEBP, Bertolucci KV, Reis ES, Souza AV (2003). Potencial do carvão ativado, filtro amarelo e interação fotoperíodo/ temperatura na formação de raízes tuberosas de batata-doce *in vitro*. Ciência Rural, Santa Maria, 33 (3): 423- 430.

Costa AS, Arrigoni-Blank MF, Blank AF, Mendonça AB, Amancio VF, Ledo AS (2007) Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. Horticultura Brasileira 25: 68-72.

Erig AC, Schuch MW (2003) Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala. Revista Brasileira de Agrociência 9: 221-227.

Fráguas CB, Pasqual M, Pereira AR (2004) Multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L.: Efeito da cinetina e do ácido giberélico. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, jan./ fev., 28 (1): 49-55.

Guedes RS, Schmitz GC, Maciel SA, Oliveira JP, Pereira JES (2006) Avaliação da germinação de sementes e do desenvolvimento inicial de plantas de pimenta longa *in vitro*. In:

46 Congresso Brasileiro de Olericultura, Goiânia. Horticultura Brasileira - suplemento CD Rom. Brasília : ABH., 24: 41-44.

Grattapaglia, D, Machado MA (1998) Micropropagação. In: Torres AC, Caldas LS, Buso, JA (eds) Cultura de tecidos e transformação de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH. pp. 183-260.

Handa L, Sampaio PT, Quisen RC (2005) Cultura de embriões e de gemas de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). Acta Amazonas 35: 29- 33.

Huang L, Lee Y, Huang B, Kuo C, Shaw J (2002) High polyphenol oxidase activity and low titratable acidity in browning bamboo tissue culture. In Vitro Cell Development of Biology 38: 358- 365, 2002.

Johansen DA (1940) Plant Microtechnique. New York. McGraw Hill. 523p.

Kar M, Mishra D (1976) Polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiology, 57: 315- 319.

Kochba, JL, Spiegel-Roy P (1977) Differences in peroxidase activity and isoenzymes in embriogenic and non-embriogenic “Shamount” orange ovular callus lines. Plant cell Physiology 18: 463-467.

Kraus JEE, Arduin M (1977) Manual básico de métodos em Morfologia Vegetal. EDUR, Rio de Janeiro.

Lima GPP, Barsalobres C, Piza IMT, Cereda MP (2002) Efeito do BAP e ANA e atividade da peroxidase em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz cv MCOL 22) cultivada *in vitro*. Revista Brasileira de Agociência, 8(2): 107-110.

Lima GPP, Broetto F, Brasil OG (1998) Efeito da salinidade sobre o teor de proteínas e atividades da peroxidase e redutase de nitrato em calos de arroz. Acta Biológica Leopoldensia, 20: 357-363.

Melo B, Pinto JEBP, Luz JMQ, Peixoto JR, Juliatti FC (2001) Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirrobeira [*Syagrus oleracea* (MART.) BECC.]. Ciência e Agrotecnologia, 25, :1301-1306.

Murashige T., Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Paiva PDO, Paiva R, Pasqual M, Paiva LV (2004) Estabelecimento *in vitro* de estrelícia (*Strelitzia reginae* Banks.). Ciência e Agrotecnologia 28: 1031- 1034.

Paiva WO, Loges V (2005) Costaceae. In: Terao, D, Carvalho ACPP, Barroso TCSF (eds) Flores Tropicais. EMBRAPA. Brasília – DF pp.141 -153.

Souza AV, Pinto JEBP, Bertolucci SKV, Corrêa R, Castro EM (2003) Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. Ciência e Agrotecnologia Edição Especial: 1532-1538.

Tang W, Newton RJ (2004) Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Science* 167: 621- 628.

Torres AC, Caldas LS, Buso JA (1998) Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. V. 1, Brasília, EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA- CNPH.

Utino S, Carneiro IF, Chaves LJ (2001) Crescimento e oxidação de explantes de bananeira-prata (*Musa AAB*). I. concentrações de sais de ferro, cobre e zinco. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 23: 225-229.

Van Rossum MWPC, Alberda M, Van Der Plas (1997) Role of oxidative damage in tulip bulb scale micropropagation. *Plant Science* 130: 207-216.

Vieira IC, Fatibello- Filho O (1998) Flow injection spectrophotometric determination of hydrogen peroxide using a crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*) as a source of peroxidase. *Analyst* , 123 (9): 1809-1812.

Vieira S (2003) Bioestatística: tópicos avançados. Rio de Janeiro, Campus, 212p.

Tabela 1. Proporções de formação de plantas, embriões não desenvolvidos e oxidação em diferentes meios de cultivo durante o estabelecimento *in vitro* de embriões zigóticos de *Tapeinochilos ananassae*. n= número de indivíduos, Z= padrão reduzido, p (%) = proporção geral.

Tratamentos	Formação de Plantas			Oxidação		Embriões não desenvolvidos	
	n	p (%)	Z	p (%)	Z	p (%)	Z
½ MS	15	46,7	-0,512	40	0,105	6,7	1,433
½ MS + 0,25g. L ⁻¹ ácido cítrico	14	57,1	1,702	42,9	0,692	0	3,393*
½ MS + 3,0g. L ⁻¹ carvão ativado	15	80,0	6,695*	20	2,885*	0	3,465*
½ MS + 0,5g. L ⁻¹ PVP	15	46,7	-0,512	46,7	1,599	6,7	1,433
MS	15	26,7	3,395*	20	2,885*	40	6,697*
MS + 0,25g. L ⁻¹ ácido cítrico	12	50	0,029	25	1,577	25	1,870
MS + 3,0g. L ⁻¹ carvão ativado	15	46,7	-0,512	33,3	-0,105	13,3	-0,600
MS + 0,5g. L ⁻¹ PVP	15	13,3	6,277*	60	4,589*	26,7	2,632*
Total	116	45,7	-	36,2	-	14,7	-

* Valores significativos, considerando-se valores de z superiores a 1,96 ou inferiores a -1,96 ($\alpha=5\%$).

Tabela 2. Número médio de folhas, de nós, de raízes e de brotos e massa fresca (g) dos explantes em diferentes combinações de BAP e GA₃ no meio de cultivo aos 45 dias.

Tratamento	Número de folhas	Número de nós	Número de raízes	Número de brotos	Massa fresca (g)
½ MS					
½ MS + 0,5g. L ⁻¹ GA ₃	1,41 a*	1,7 a	1,81 a	1,07 a	0,79 a
½ MS + 1,0g. L ⁻¹ GA ₃	0,89 b	1,36 b	1,22 b	0,84 a	0,73 b
½ MS + 0,5g. L ⁻¹ BAP	0,91 b	1,42 ab	1,05 b	0,92 a	0,74 ab
½ MS + 0,5g. L ⁻¹ BAP + 0,5g. L ⁻¹ GA ₃	0,98 b	1,4 b	0,8 b	0,83 a	0,78 a
½ MS + 0,5g. L ⁻¹ BAP + 1,0g. L ⁻¹ GA ₃	0,74 b	1,22 b	0,8 b	0,8 a	0,73 b
½ MS + 0,5g. L ⁻¹ BAP + 1,0g. L ⁻¹ GA ₃	0,8 b	1,29 b	0,84 b	0,84 a	0,75 ab

* Médias seguidas de mesma letra entre colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

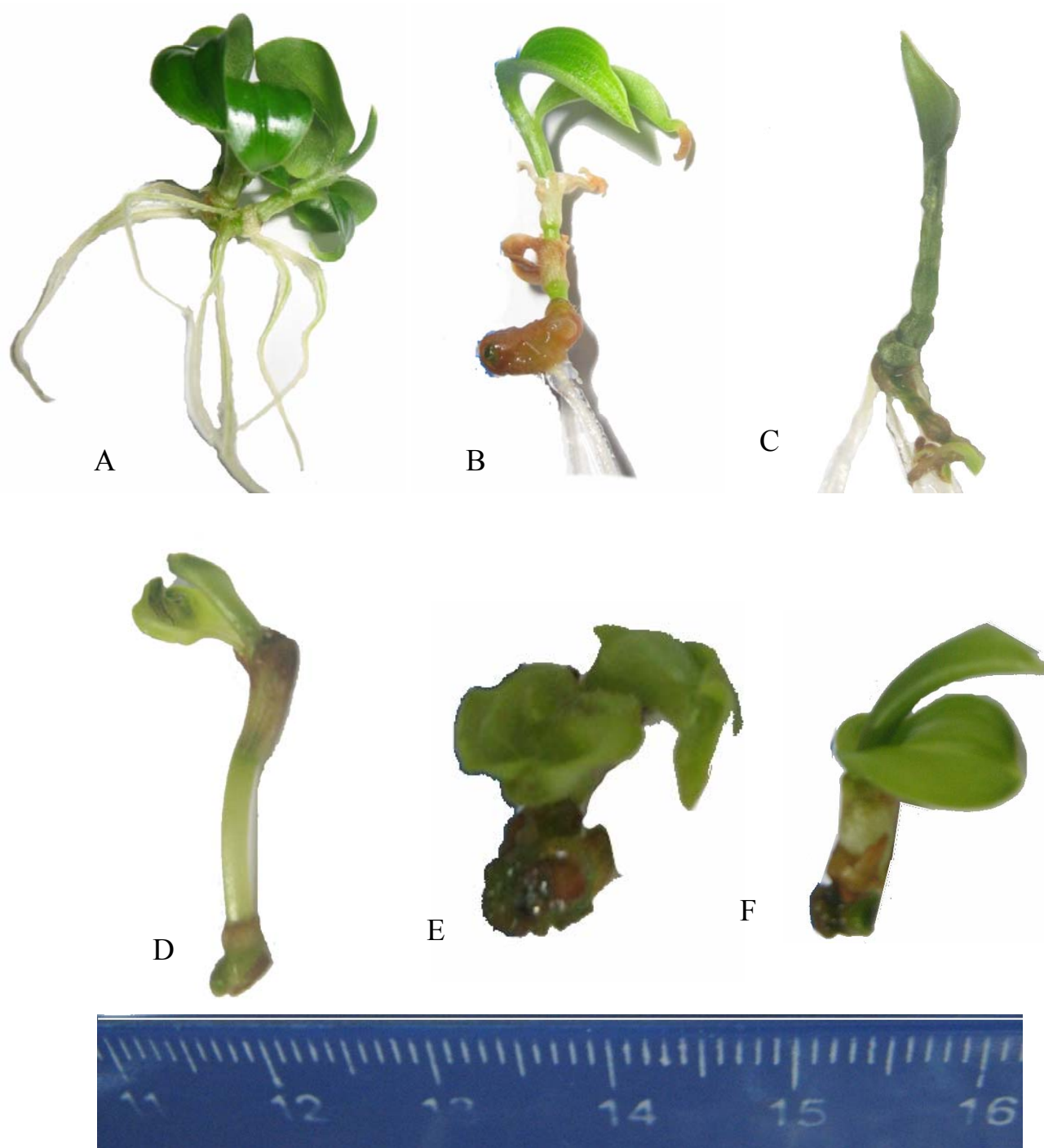


Figura 1. Aspecto das plantas de *Tapeinochilos ananassae* desenvolvidas em diferentes suplementações de reguladores de crescimento no meio nutritivo: (A) $\frac{1}{2}$ MS; (B) $\frac{1}{2}$ MS+0,5mg. L⁻¹ GA₃; (C) $\frac{1}{2}$ MS+1,0mg. L⁻¹ GA₃; (D) $\frac{1}{2}$ MS+0,5mg. L⁻¹ BAP; (E) $\frac{1}{2}$ MS+0,5mg. L⁻¹ BAP+0,5mg. L⁻¹ GA₃; (F) $\frac{1}{2}$ MS+0,5mg. L⁻¹ BAP+1,0mg. L⁻¹ GA₃

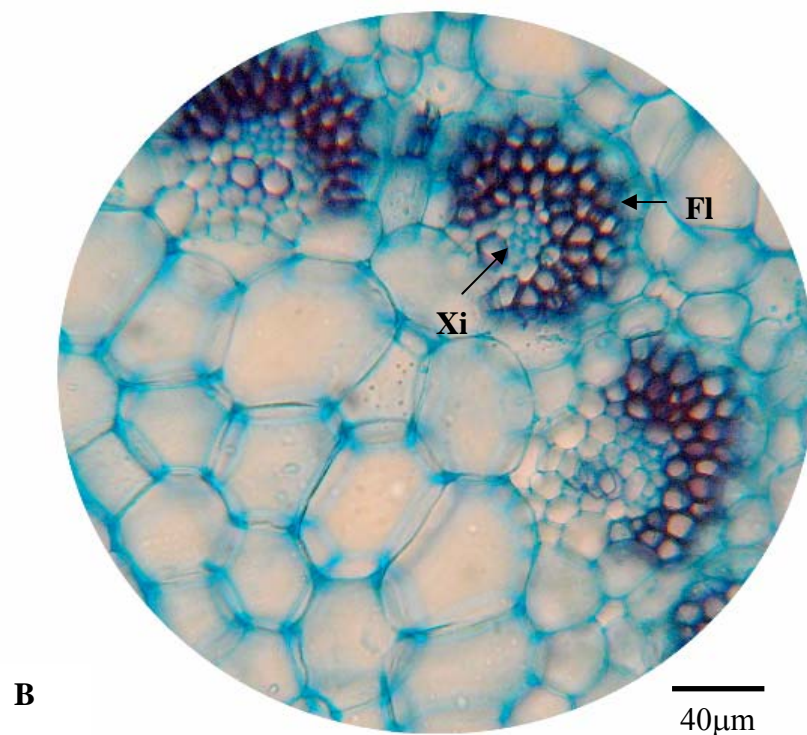
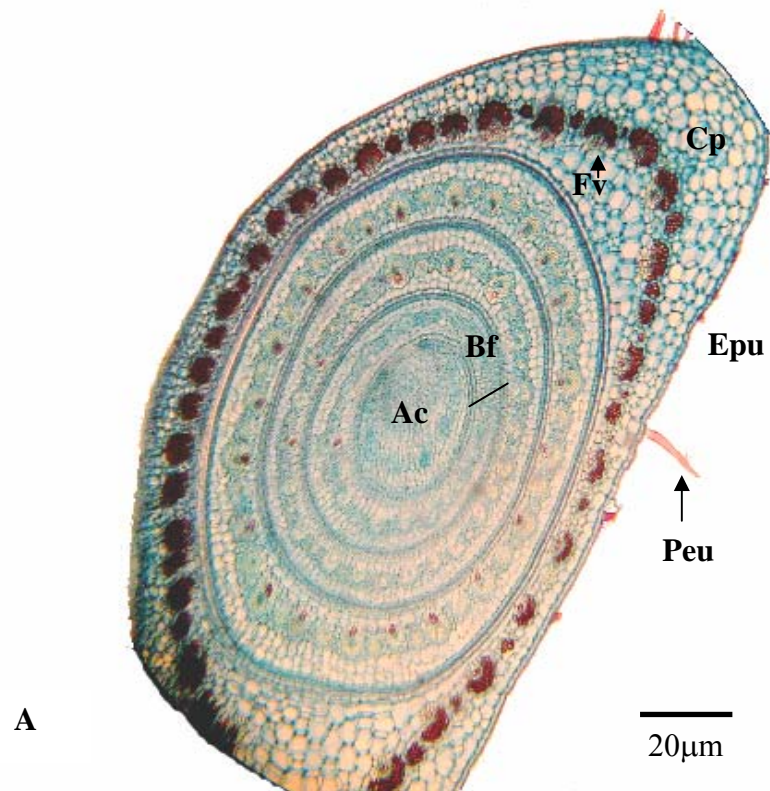
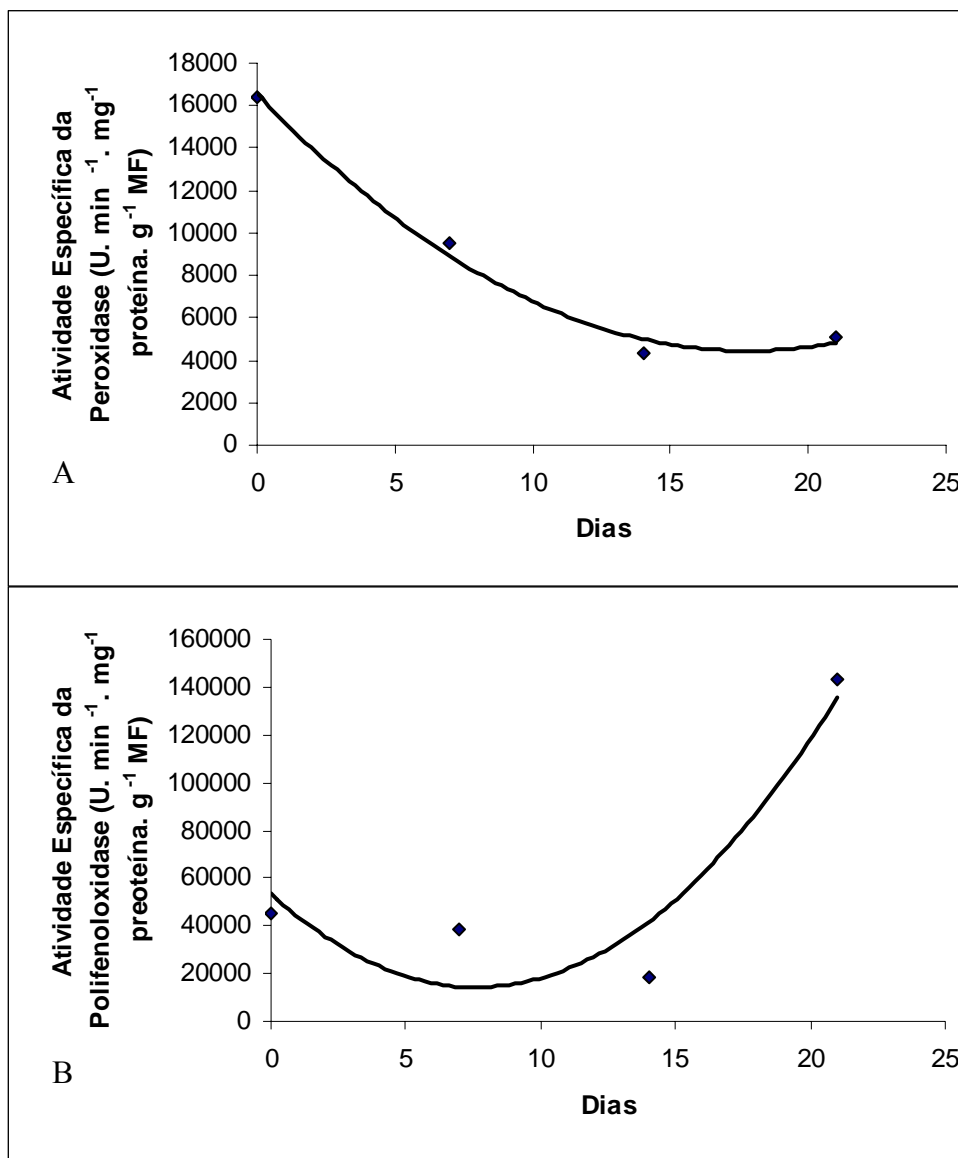


Figura 2. Corte transversal de gema lateral de *Tapeinochilos ananassae*. (A) vista geral do corte histológico evidenciando ápice caulinar (Ac), bainhas foliares (Bf), células parenquimáticas (Cp), epiderme uniestratificada (Epu), feixes vasculares (Fv) e pêlos epidérmicos unicelulares (Peu); e (B) floema (Fl) e xilema (Xi).



(A): $Y = 38,352x^2 - 1363,6x + 16,567$

$R^2 = 0,9898$

(B): $Y = 675,28x^2 - 10278x + 53368$

$R^2 = 0,8675$

Figura 3. Atividade específica de peroxidase (A) e polfenoloxidase (B) (U. min⁻¹. mg⁻¹ de proteína. g⁻¹ de matéria fresca) em gemas laterais de *Tapeinochilos ananassae* cultivadas *in vitro* durante 21 dias.

Normas de submissão à Plant Cell, Tissue and Organ Culture

ISSN: 1573-5044 (electronic version)

Aims and scope

Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) publishes articles that are of scientific and/or practical importance. The editors welcome scientists to submit manuscripts to *PCTOC*. Four types of articles are published: 1. research articles, 2. research notes (brief articles), 3. reviews, and 4. book reviews. *PCTOC* covers all areas of research in which plant tissue culture is a major aspect:

- biotechnological breeding including genetic modification, somatic hybridisation and embryo rescue;
- propagation *in vitro*, including micropropagation, somatic embryogenesis and freeing plants from diseases;
- the use of tissue culture in physiological or molecular researches; production of secondary metabolites;
- storage of valuable genetic material including slow growth *in vitro* and cryopreservation.

Submit online

We trust that you will find this Online Manuscript Submission, Review and Tracking System very user friendly. To make your start even easier, please find below a few instructions:

New Authors: Please click the 'Register' button from the menu above and enter the requested information. Upon successful registration you will be sent an e-mail with instructions to verify your registration.

Note:

- When you have received an e-mail from us with an assigned user ID and password, DO NOT REGISTER AGAIN. Just log in to the system as 'Author'.

Authors: Please click the 'Login' button from the menu above and log in to the system as 'Author'. Then submit your manuscript and track its progress through the system. A wide range of submission file formats is supported, including: Word, WordPerfect, RTF, TXT, TIFF, GIF, JPEG, EPS, LaTeX2E, TeX, Postscript, PICT, Excel, Tar, Zip and Powerpoint.

PDF is not an acceptable file format.

Note:

- Please upload your manuscript only ONCE on to the system. After uploading your manuscript, it will be automatically formatted as a PDF file, and you will be sent an e-mail requesting that you approve your submission. Please return to the main menu and APPROVE your submission accordingly.

Returning Authors: Please use the provided username and password and log in as 'Author' to track your manuscript or to submit a NEW manuscript. (*Do not register again as you will then be unable to track your manuscript*).

Reviewers: Please click the 'Login' button from the menu above and log in to the system as 'Reviewer'. You may view and/or download manuscripts assigned to you for review, submit your comments for the editors and the authors, and track the progress of your manuscripts through the system.

Note:

- Please click the 'Accept' or 'Decline' button as soon as possible after receipt of the e-mail asking you to review a manuscript.

To change your username and password: Log in to the system and select 'Update My Information' from the menu above. At the top of the Update My Information screen, click the 'Change Password' button and follow the directions.

Forget your password? If you have forgotten your password, click the 'Login' button and click 'Forget Your Password?' at the bottom of the Login screen and follow the directions.

Types of papers**Original research papers**

Original research papers should generally not exceed ten pages of printed text, including references, tables and figures (one page of printed text = approx. 600 words). A manuscript for a research paper should be assembled in the following order: Title, Author(s), Affiliation(s) (if the senior author is not the corresponding order, this is indicated) Key words, Abstract, Abbreviations, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion (Results and Discussion may be combined), Acknowledgements, References, Tables, legends to figures, figures.

Research notes

Research notes should not exceed four pages of printed text (one page of printed text = approx. 600 words), including references, tables and figures. A manuscript for a research note

should be assembled in the following order: Title, Author(s), Affiliation(s) (if the senior author is not the corresponding order, this is indicated) Key words, Abstract, Abbreviations Document without subheadings, Acknowledgements, References, Tables, legends to figures, figures.

Review papers

Review papers should not exceed 20 pages of printed text, including references, tables and figures. A manuscript for a review should be assembled in the following order: Title, Author(s), Affiliation(s) (if the senior author is not the corresponding order, this is indicated) Key words, Abstract, Abbreviations Document without subheadings, Acknowledgements, References, Tables, legends to figures, figures.

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) 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

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 100 to 150 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 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 on the title page are not given reference symbols. 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).

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.

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 (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
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

Doe J (1999) Title of subordinate document. In: The dictionary of substances and their effects. Royal Society of Chemistry. Available via DIALOG. <http://www.rsc.org/dose/title> of subordinate document. Accessed 15 Jan 1999

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

www.issn.org/en/node/344

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 heading. The table title should explain clearly and concisely 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 heading.

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 Guidelines

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

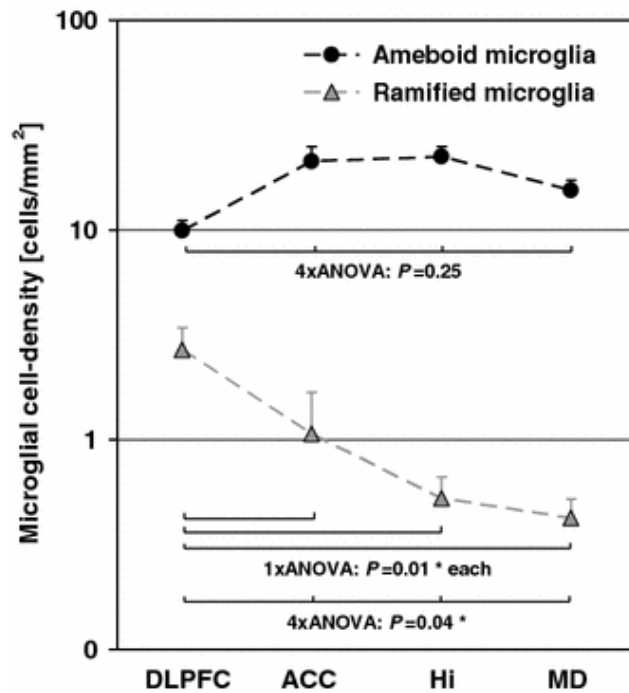
- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the 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

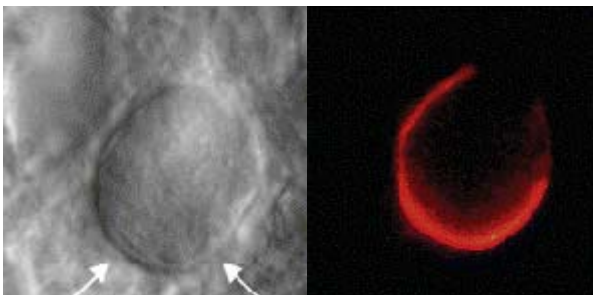
figures are legible at final size.

- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Line drawings should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.



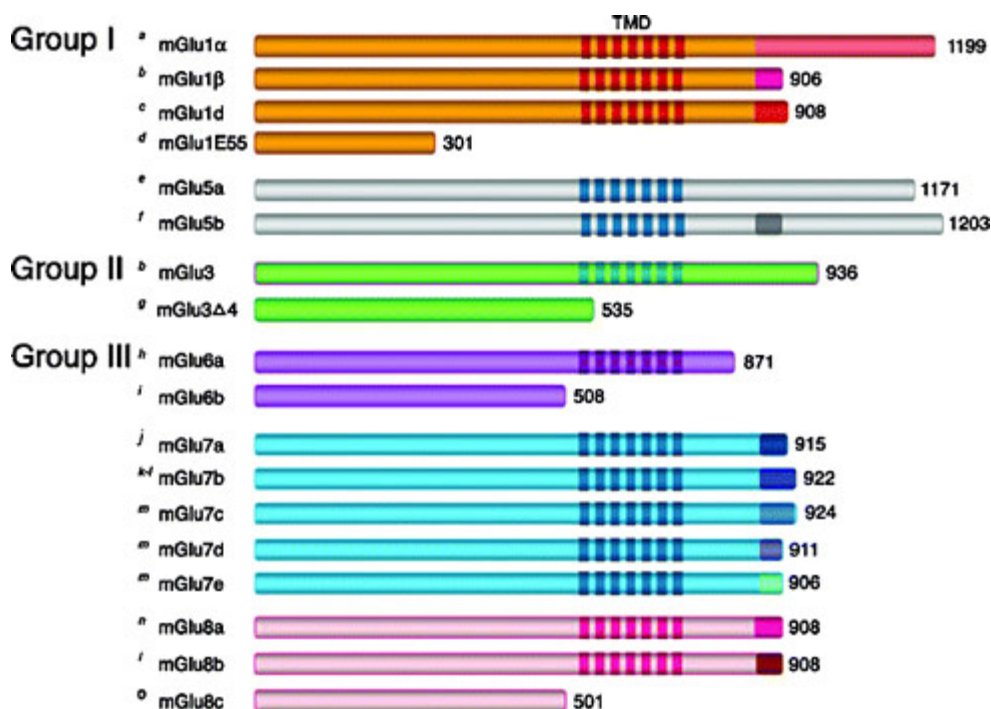
Halftone Art

- 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."

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts.
- 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.

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

Additional 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.

Languages

Articles and abstracts must be in English or in the journal's official language(s), but the journal accepts additional abstracts in other languages of the author's choice (for instance in the author's first language, if not English or the journal's official language). Such abstracts are optional. Authors would need to supply such abstracts themselves, certify that they are a faithful translation of the official abstract, and they must be supplied in Unicode (see www.unicode.org for details), especially if they are using non-roman characters.

<http://www.unicode.org>

Such abstracts in other languages will carry a disclaimer:

"This abstract is provided by the author(s), and is for convenience of the users only. The author certifies that the translation faithfully represents the official version in the language of the journal, which is the published Abstract of record and is the only Abstract to be used for reference and citation."