

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



Dissertação

**Micropropagação de Plantas Ornamentais- *Gypsophila paniculata* e
*Dracaena sanderiana***

Vania Trevelin

Pelotas, 2014

Vania Trevelin

Micropropagação de Plantas Ornamentais-*Gypsophila paniculata* e *Dracaena sanderiana*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Peters

Coorientadora: Dr^a. Daiane de Pinho Benemann

Pelotas, 2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

T812m Trevelin, Vania

Micropropagação de plantas ornamentais-gypsophila paniculata e dracaena sanderiana / Vania Trevelin ; José Antonio Peters, orientador ; Daiane de Pinho Benemann, coorientador. — Pelotas, 2014.

59 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Cultura de tecidos. 2. Biorreatores. 3. Estabelecimento. 4. Estr. _sse oxidativo. I. Peters, José Antonio, orient. II. Benemann, Daiane de Pinho, coorient. III. Título.

CDD : 584.93

Elaborada por Maria Beatriz Vaghetti Vieira CRB: 10/1032

Vania Trevelin

Micropropagação de Plantas Ornamentais-*Gypsophila paniculata* e *Dracaena sanderiana*

Dissertação aprovada, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Fisiologia Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 15 de outubro de 2014

Banca examinadora:

.....
Prof. Dr. José Antonio Peters (Orientador)
Doutor em Botânica pela Universidade de São Paulo-USP

.....
Prof.(a) Dra. Ilisandra Zanandrea
Doutora em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Lavras- UFV

.....
Prof. Dr.Paulo Celso de Mello Farias
Doutor em Biotecnologia Vegetal pela Universidade de São Paulo- USP

“O saber,
a gente aprende com os mestres e com os livros;
a sabedoria,
aprende-se com a vida e com os humildes”.

Cora Coralina

A Deus,

Ofereço

A meu noivo Ismael Sebben

com amor e carinho,

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu saúde, coragem e persistência para enfrentar as dificuldades de minha vida e durante a realização do curso.

A Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de participar do curso para a obtenção do grau de Mestre em Fisiologia Vegetal, em especial à coordenação do Curso.

Ao meu orientador José Antonio Peters, que com sua sabedoria e experiência me auxiliou nas horas mais difíceis, durante todo o trabalho.

A professora Ilisandra Zanandrea, pelo apoio, pela amizade e principalmente pela ajuda com os trabalhos desenvolvidos.

A minha coorientadora Daiane de Pinho Benemann, que sempre esteve disposta a me ajudar com suas ideias e colaborações.

Ao colega Manuel Urbano Junior, pela sua ajuda e serenidade, durante todas as dificuldades enfrentadas.

Aos estagiários do Laboratório de Cultura de Tecidos: Giovanni Victório Cerutti, Mauricio Carlos Flores, Mara Cintia Wilhelmann, que não mediram esforços para ajudar nos experimentos, quando possível.

A todos os colegas do curso, em especial aos do Laboratório de Cultura de Tecidos, que sempre me apoiaram e se prontificaram a ajudar no que fosse necessário.

A querida amiga e professora, Liane T. Dorneles, pelas conversas de incentivo e apoio, por ter acreditado mais do que ninguém na minha capacidade, apesar de tantas dificuldades enfrentadas.

A minha irmã Ivanete sua família, pelo apoio moral nesta caminhada, ajuda nos piores momentos de minha vida e amor e carinho dedicados durante toda a minha existência.

A todos, que mesmo não citados aqui, mesmo de longe, de alguma forma colaboraram para a conclusão de mais uma etapa em minha vida.

RESUMO

TREVELIN, V. **Micropropagação de Plantas Ornamentais - *Gypsophila paniculata* e *Dracaena sanderiana***. 2014.59f. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós- Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas- UFPel, Pelotas/RS

A floricultura traz muitos benefícios sociais e econômicos, já que é possível produzir em pequenas áreas, criando trabalho e desta forma mantendo o homem no campo. O Brasil, por apresentar climas e solos bastante diversificados, é um país que possibilita o cultivo das mais variadas espécies de flores e plantas ornamentais, tanto de origem nativa ou exótica, como de clima temperado ou tropical. A *Gypsophila paniculata* é uma espécie com grande mercado entre as flores de corte, podendo ser propagada comercialmente através de métodos vegetativos, como enraizamento de estacas. Outra planta ornamental de destaque é a *Dracaena sanderiana*, conhecida como Bambu-da-sorte, sendo atualmente uma das plantas de vaso mais populares em todo o mundo. Os arranjos formados foram popularizados segundo a tradição chinesa do Feng Shui, sendo oferecidos como presentes com intuito de trazer sorte, energizar ambientes e dissipar fluxos negativos. A tecnologia da cultura de tecidos pode auxiliar na propagação destas espécies, visando à produção de mudas com elevada qualidade genética e sanitária, substituindo assim, os métodos de propagação por sementes ou estacas. Tanto as técnicas convencionais de micropropagação, como o uso de biorreatores podem ser utilizadas para a propagação destas espécies ornamentais, viabilizando aumentar a oferta de mudas para o mercado. Os estudos foram conduzidos em experimentos que visaram à multiplicação de *G. paniculata*, em meios MS semissólido e líquido em biorreatores com sistema de imersão temporária (STI) e o estabelecimento e indução inicial de brotações de *D. sanderiana*, testando diversos explantes e reguladores de crescimento, bem como avaliar o estresse oxidativo, ocorrido *in vitro* na fase de estabelecimento. Neste contexto, o trabalho teve como objetivos: a) realizar uma análise comparativa entre a multiplicação de *G. paniculata* *in vitro* pelo sistema convencional e por biorreatores com sistema de imersão temporária; b) definir um protocolo eficiente para o estabelecimento de *D. sanderiana* e analisar a atividade das enzimas antioxidantes da mesma, durante o processo de estabelecimento *in vitro*. Quanto aos resultados de micropropagação e multiplicação de *G. paniculata*, o sistema de biorreator de imersão temporária foi mais eficiente, demonstrando maior proliferação de brotações e maior número de folhas. Para *D. sanderiana* os resultados obtidos mostraram que o procedimento de desinfestação mais promissor para a espécie foi com hipoclorito de sódio a 2% por 15 minutos e lavagens de 10 minutos com Cetazima 250 mgL⁻¹, com adição de PPM (Plant Preservative Mixture) ao meio de cultura. Dentre os meios testados, o meio MS semissólido suplementado com 15 mgL⁻¹ de 2ip e 0,5 mgL⁻¹ AIA e posterior diminuição para 2mgL⁻¹ de 2ip, foram os que apresentaram os melhores resultados quanto ao estabelecimento e indução de gemas. Quanto às análises enzimáticas, após 20 dias *in vitro*, os explantes de *D. sanderiana* já apresentaram uma adaptação ao ambiente, independente de serem expostos a luz ou ao escuro.

Palavras-chaves: cultura de tecidos; biorreatores; estabelecimento; estresse oxidativo

ABSTRACT

TREVELIN, V. **Micropropagation of Ornamental Plants - *Gypsophila paniculata* and *sanderiana* *Dracaena***. 2014.59f. Master's Dissertation- Graduate Program in Plant Physiology. Federal University of Pelotas- UFPel, Pelotas / RS

Floriculture brings many social and economic benefits, since it is possible to produce in small areas, fostering employment and thus keeping the man in the country. Brazil, by presenting very diverse climates and soils, is a nation that enables the growth of a wide variety of flowers and ornamental plants, both from native and exotic origins, and from temperate and tropical climates. The *Gypsophila paniculata* is a species that provides a large market among the cut flowers and can be commercially disseminated by vegetative methods such as rooting. Another outstanding ornamental plant is the *Dracaena sanderiana*, known as lucky bamboo, being currently one of the most popular pot plants worldwide, whose arrangements were popularized according to the Chinese tradition of Feng Shui, being offered as a gift with the intention of bringing luck, energizing environments and dispel negative flows. The tissue culture technology can aid spreading these species, aiming at producing seedlings with high genetic quality and health, thus taking the place of the methods of propagation by seeds or cuttings. Both conventional micropropagation techniques and the use of bioreactors can be used for the propagation of these ornamental species, enabling to increase the supply of seedlings to market. These studies were conducted through experiments which aimed at the reproducing of *G. paniculata* in semisolid and liquid media in bioreactors with a temporary immersion system (TIS) and the establishment and initial shoot induction of *D. sanderiana*, testing several explants and growth regulators, as well as at evaluating oxidative stress in vitro, occurred in the establishment phase. In this context, the study aimed at: a) conducting a comparative analysis between the multiplication of *Gypsophila paniculata* in vitro, both by conventional system and through bioreactors with temporary immersion system; b) defining an efficient protocol for in vitro establishment of *Dracaena sanderiana* and analyzing the activity of its antioxidant enzymes during the establishment process. Regarding the results of *G. paniculata*'s micropropagation and multiplication, the temporary immersion bioreactor system was more efficient, demonstrating greater proliferation of shoots and a greater number of leaves. Concerning *D. sanderiana*, results showed that the most promising decontamination procedure for the species was with sodium hypochlorite 2% for 15 minutes and 10 minute washes with Cetazima 250 mgL⁻¹, with the addition of PPM to the cultural environment. Among the media tested, MS semisolid environment supplied with 15 mgL⁻¹ 2ip and 0.5 mgL⁻¹ AIA and subsequent decrease to 2mgL⁻¹2ip presented the best results regarding the bud establishment and formation. In the enzymatic analysis, after 20 days in vitro, *D. sanderiana* explants already presented an adaptation to the environment, whether it be exposed to light or dark.

Keywords: tissue culture; bioreactors; establishment; oxidative stress

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotografia do modelo de biorreator com sistema de imersão temporária (SIT), utilizado para experimento com <i>G. paniculata</i>	24
Figura 2	Fotografias dos Biorreatores (SIT) montados na sala de crescimento no Laboratório de Cultura de Tecidos.....	24
Figura 3	Fotografias de: A- Brotações desenvolvidas em meio semissólido que foram utilizadas como explantes para o biorreator; B- Explantes transferidos para biorreator.....	25
Figura 4	Fotografias das brotações de <i>G. Paniculata</i> , em meio MS líquido nos biorreatores (SIT), após 30 dias de cultivo.....	26
Figura 5	Fotografias de plantas de <i>G. paniculata</i> em meio MS semissólido (sistema convencional), após 30 dias de cultivo...	27
Figura 6	Fotografias de plantas de <i>D. sanderiana</i> (bambu-da-sorta), cultivadas em casa de vegetação da Universidade Federal de Pelotas.....	38
Figura 7	Fotografia das estacas obtidas a partir das plantas cultivadas em casa de vegetação, com brotações axilares utilizadas como explantes para o estabelecimento e análises enzimáticas de <i>D. sanderiana</i>	39
Figura 8	Fotografias dos explantes e meios de cultura utilizados para estabelecimento <i>in vitro</i> e análises enzimáticas de <i>D. sanderiana</i>	39
Figura 9	Gráfico indicativo de porcentagem de contaminação de explantes (nós e entrenós) de <i>D. sanderiana</i> submetidos a diferentes procedimentos de desinfestação.....	43
Figura 10	Fotografias de: A- Brotações de <i>D. sanderiana</i> , após 90 dias em meio semissólido oriundas de segmentos nodais; B- brotação enraizada após 180 dias em meio semissólido; C- Planta após 240 dias em meio semissólido.....	44

Figura 11	Fotografia de gemas basais provenientes de brotos jovens de <i>D. sanderiana</i> inoculados, em meio semissólido, após 90 dias em cultura.....	44
Figura 12	Fotografia de gemas desenvolvidas e pequenas brotações basais provenientes de brotos jovens de <i>D. sanderiana</i> inoculados, em meio semissólido, após 120 dias em cultura...	44
Figura 13	Gráficos indicativos das atividades das enzimas SOD (A), CAT (B) e APX (C) e concentrações de peróxido de hidrogênio (D) em explantes de bambu-da-sorta cultivados no escuro.....	46
Figura 14	Gráficos indicativos das atividades das enzimas SOD (A), CAT (B) e APX (C) e concentrações de peróxido de hidrogênio (D) em explantes de bambu-da-sorta cultivados na luz.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Variáveis analisadas em <i>G. paniculata</i> , multiplicadas em meio semissólido e biorreatores com SITs.....	26
Tabela 2	Tratamentos utilizados para estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>D. sanderiana</i>	40

SUMÁRIO

RESUMO.....	07
ABSTRACT.....	08
INTRODUÇÃO GERAL.....	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
CAPÍTULO I- Micropropagação de <i>Gypsophila paniculata</i> pelos métodos convencional e Biorreatores com Sistemas de Imersão Temporária (SITs)	
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3. RESULTADOS	25
4. DISCUSSÃO.....	27
5. CONCLUSÕES.....	29
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
CAPÍTULO II- Estabelecimento, indução de multiplicação e estresse oxidativo de <i>Dracaena sanderiana</i> (bambu-da- sorte) <i>in vitro</i>	
1. INTRODUÇÃO.....	34
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3. RESULTADOS	42
4. DISCUSSÃO.....	47
5. CONCLUSÕES.....	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um país com climas e solos bastante diversificados, o que possibilita o cultivo das mais variadas espécies de flores e plantas ornamentais, tanto de origem nativa ou exótica, bem como de clima temperado e tropical. A produção brasileira de plantas ornamentais divide-se em: flores de corte, flores de vaso, sementes, plantas de interiores, plantas de paisagismo e folhagens (BUAINAIN; BATALHA, 2007). A floricultura pode trazer benefícios sociais e econômicos, por seu desenvolvimento não exigir grandes áreas de plantio, trazendo assim, benefícios ao homem do campo. Entre as culturas agrícolas, a floricultura destaca-se por empregar, em média, oito funcionários por hectare (IMBRAFLOR, 2013). O plantio de flores é uma atividade exercida por pequenos produtores rurais, o que contribui para uma melhor distribuição de renda na área rural, estimulando o agronegócio e a agricultura familiar. A geração de renda da floricultura é muito significativa, proporciona aproximadamente 206 mil empregos diretos, dos quais 102.000 (49,5%) relativos à produção, 6.400 (3,1%) relacionados à distribuição, 82.000 (39,7%) no varejo e 15.600 (7,7%) em outras funções, principalmente de apoio (IMBRAFLOR, 2013).

O principal mercado para a floricultura brasileira é o interno, em função do grande potencial de expansão, devido ao baixo consumo per capita, em torno de US\$ 4,70 por habitante, enquanto a Suíça possui um consumo per capita de aproximadamente US\$ 170 por habitante (JUNQUEIRA; PEETZ, 2005). O Brasil tem ainda participação pouco expressiva no segmento mundial, no entanto vem expandindo sua produção ao longo dos anos. As rosas são as principais flores de corte cultivadas no Brasil, seguidas pelos crisântemos e helicônias, e outras 70 espécies, como as gérberas, gypsophilas, estrelícias, tango, gladiólos e alpinias (JUNQUEIRA; PEETZ, 2005). O mercado mundial de flores e plantas ornamentais está em plena expansão e tem como principal exportador a Holanda, seguida pela Colômbia e Itália, entre outros. Entre as mais variadas espécies ornamentais produzidas, a *Gypsophila paniculata* e a *Dracaena sanderiana* têm grande importância econômica e se destacam no mercado (PETRY, 2008; PATRO, 2012; ANON.,2014).

Um dos cultivos que vem se destacando significativamente no Veilling Holambra-SP é a *Gypsophila paniculata*. Espécie ornamental, arbustiva, com

aproximadamente um metro de altura, da família das Cariofilaceae (BARROSO, 1978). No Brasil, é chamada comercialmente de "mosquitinho" ou "branquinha", sendo uma importante flor de corte, muito utilizada em arranjos florais. O seu processo de propagação vegetativa pode apresentar problemas fitossanitários, possibilitando a disseminação de doenças, através de plantas contaminadas. Um exemplo é a bactéria *Erwinia herbicola* pv. *Gypsophilae* (Ehg), que pode atacar a planta, causando galhas (COOKSEY, 1986). Esta doença pode causar de 30 a 60 % das perdas de plantas de *G. paniculata* em campos comerciais e pode ser um fator limitante para a propagação desta espécie (MILLER et al., 1981). A ocorrência da doença é mais frequente durante a propagação por estacas em casas de vegetação, tendo como resultado o enfraquecimento, a queda das folhas e finalmente morte da planta inteira (CLARK et al., 1989). A técnica da cultura de tecidos em *G. paniculata* tem sido usada principalmente para micropropagação e eliminação de doenças (HENRY, 1993), possibilitando que os produtores possam obter plantas uniformes em sua floração, o que garantirá o sucesso de sua comercialização. Além do sistema convencional na micropropagação, o uso de biorreatores na cultura de tecidos pode ser usado para reduzir os custos com automação e produção em massa (CHAKRABARTY et al., 2003; DEBNATH, 2009). A produção de mudas em meio líquido nos biorreatores, com sistema de imersão temporária (SITs), é uma estratégia complementar para superar as limitações, ou seja, o controle químico ou físico das condições da cultura nos vasos, presentes nas técnicas convencionais de propagação a base de ágar (PAEK et al., 2001, 2005). Desta forma, essas mudas de qualidade seriam repassadas aos produtores com maior agilidade e a um custo menor.

Outra planta ornamental de destaque é a *Dracaena sanderiana*, conhecida como Bambu-da-sorte, sendo atualmente uma das plantas de vaso mais populares em todo o mundo (PATRO, 2012). Envolve cerca de 40 espécies de árvores e arbustos suculentos classificados na família Ruscaceae, segundo o Grupo de Filogenia das Angiospérmicas II (APG, 2003), ou o gênero é separado em sua própria família, Dracaenaceae ou Agavaceae (SUBHASHINI et al., 2011). Atualmente, a família Ruscaceae é combinada com a família Asparagaceae com base no sistema APG III (APG, 2009), com a finalidade de unir famílias confusas, quando elas não apresentam distinção nos dados moleculares (LU; MORDEN,

2010). O bambu-da-sorte é nativo de Camarões, na África Ocidental e encontrado nas áreas tropicais e subtropicais da África e da Índia (SUBHASHINI et al., 2011). É uma planta de interiores conhecida por sua aparência e facilidade de cultivo em ambiente com temperatura amena (acima dos 15°C), meia-sombra e bastante umidade (DAQUINTA et al., 2010). A propagação da espécie é realizada pela técnica da estaquia, onde as estacas são retiradas do caule, normalmente, com 4 a 8 cm de comprimento, sendo utilizadas tradicionalmente para a indução de raízes. Quando colocadas em vasos podem ser moldadas pacientemente em formatos simples, retorcidos ou espiralados por fototropismo positivo, formando arranjos florais de alto valor comercial, entre R\$ 70 e R\$ 100 (ANON., 2014). Os arranjos formados foram popularizados segundo a tradição chinesa do Feng Shui sendo oferecidos como presente com intuito de trazer sorte, energizar ambientes e dissipar fluxos negativos (PATRO, 2012; ANON., 2014). Mesmo quando enraizadas as estacas apresentam crescimento lento, o que faz com que estudos sobre a espécie, bem como a sua propagação *in vitro*, possam auxiliar a produção de mudas em um período mais curto de tempo. Apesar da importância da espécie como ornamental, não existem muitos estudos com *D. sanderiana* em condições *in vitro* (ASLAM et al., 2010). O sucesso do método de micropropagação depende de vários fatores, como reguladores de crescimento acrescentados aos meios, genótipos das plantas e tipo de explantes (PATI et al., 2005).

Desta forma, a cultura de tecidos tornou-se favorável para a produção de mudas de muitas espécies vegetais de interesse econômico, do ponto de vista produtivo e comercial, substituindo os métodos de propagação por sementes ou estacas (WANG et al., 2013). Essa produção pode suprir as demandas específicas do mercado interno e externo, proporcionando garantia de qualidade e da homogeneidade do produto final, em larga escala, a curto período de tempo e com espaços reduzidos (COLOMBO et al., 2010). No estudo de plantas ornamentais, a micropropagação tem sido empregada com sucesso na multiplicação *in vitro* de abacaxi ornamental (PASQUAL et al., 2008), bastão-do-imperador (COLOMBO et al., 2010), bambu-da-sorte (DAQUINTA et al., 2010) e coral-da-serra (FIOR et al., 2011).

O sucesso no estabelecimento e desenvolvimento de uma cultura *in vitro* depende fundamentalmente da utilização de explantes viáveis. Para que isso ocorra

é necessário que os explantes superem o estresse causado pela retirada da planta matriz, e consequentemente o estresse oxidativo proveniente dos procedimentos de desinfestação e do ambiente *in vitro*. As plantas desenvolveram diversos mecanismos altamente eficientes para que suas células superassem a toxicidade das espécies reativas de oxigênio (EROs), após o desenvolvimento do desequilíbrio entre as EROS e enzimas antioxidantes. Um desses mecanismos é representado por um grupo de enzimas: a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Ascorbato Peroxidase (APX), entre outras. Como na natureza, o estresse *in vitro* se reflete na forma de estresse oxidativo, que é definido como um desequilíbrio entre compostos antioxidantes e oxidantes, produzindo as EROS (SCANDALIOS, 1993), as quais destroem moléculas vitais como lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos, promovendo distúrbios fisiológicos, podendo causar a morte celular (BRAY; BAILEY; WRETILNYK, 2000).

Os objetivos do presente estudo foram: a) realizar uma análise comparativa entre a multiplicação de *Gypsophila paniculata in vitro* pelo sistema convencional, e por biorreatores com sistema de imersão temporária, para possibilitar a otimização da técnica na multiplicação da espécie; b) definir um protocolo eficiente para o estabelecimento *in vitro* de *Dracaena sanderiana* e analisar o estresse oxidativo durante o processo de seu estabelecimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANONIMO. Bambu-da-sorte (*Dracaena sanderiana*). Disponível em: <<http://decoracao e jardinagem.com/bambu-da-sorte-dracaena-sanderiana>>. Acesso em: 18 mai de 2014.
- APG (Angiosperm Phylogeny Group). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. Botanical Journal of the Linnean Society, v.141, p. 399-436, 2003.
- APG (Angiosperm Phylogeny Group). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Botanical Journal of the Linnean Society, v.141, p. 399-436, 2009.
- ASLAM, J., MUJIB, A., SHARMA, M.P. Cell and tissue culture of *Dracaena sanderiana* Sander ex Mast- a review. Hamdard Medical, v.52 n.4, p.31-36, 2010.
- BARROSO, G. M. Família Cariofilaceae Lindl, In: Sistemática das angiospermas do Brasil. EDUSP, v.1, p. 103-108, 1978.
- BRAY, E.A.; BAILY- SERRES, J.; WRETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed). Biochemistry and molecular biology of plant. Rockville: American Society of Plant Physiologists, p. 1189-1197, 2000.
- BUAINAN, A. M.; BATALHA, M. Cadeias produtivas de flores e mel. Brasília: Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Política Agrícola, Agronegócios, v.9, p.140, 2007.
- CHAKRABARTY, D.; HAHN, E.J.; YOON, Y.J.; PAEK, K.Y. Micropropagation of apple rootstock M.9 EMLA using bioreactor. Journal Horticultural Science Biotechnology v.78, p.605-609, 2003.
- CLARK E., VIGODSKI-HASS H. e GAFNI Y. Characterization in tissue culture of hiperplasias induced by *Erwinia herbicola* thovar *gypsophila*. Physiology Molecular Plant Pathology, v. 35, p. 383-390, 1989.
- COLOMBO L.A.; ASSIS, A.M.; FARIA, R.T.; ROBERTO, S.R. Estabelecimento de protocolo para multiplicação in vitro de Bastão- do-imperador (*Etlingera elatior*) Jack RM Sm. Acta Scientiarum Agronomy, v. 32, n.4, p. 695-700, 2010.
- COOKSEY, D.A. Galls of *Gypsophila paniculata* caused by *Erwinia herbicola* thovar *gypsophila*, Plant Disease, v.70, p. 464-468, 1986.
- DAQUINTA, M.G.; RODRÍGUEZ, D.P.; MÁZ, Y.L.; TORRIJO, F.S. Propagación in vitro de bambu chino (*Dracaena sanderiana* L.). Ciencia y Tecnología, v. 3, n.1, p.7-13, 2010.

DEBNATH, S.C. Characteristics of strawberry plants propagated by in vitro bioreactor culture and ex vitro propagation method. *Engineering Life Sciences*, v.9, p.239-246, 2009.

EVENS, T. J.; NIEDZ, R. P. The effects of nitrogen and potassium nutrition on the growth of non embryogenic and embryogenic tissue of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) *Plant Biology*, v. 8, p.126, 2008.

FIOR, C.S., BRENTANO, A.M., SAMPAIO, J.A.T.; RODRIGUES, L.R. Propagação *in vitro* de coral-da-serra (*Siphocampylus betulifolius*) a partir de segmentos nodais. *Iheringia*, v. 66, n.2, p. 257-264, 2011.

HENRY, M. *Gypsophila paniculata* L. (Baby's breath): In vitro culture and production of gypsogeninsaponins. In: Bajaj IPS (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, v.21, p. 187-206, 1993.

INBRAFLOR. Instituto Brasileiro de floricultura. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com/>> Acesso em: 15 mai.2014.

JUNAID, A., MUJIB, A., SHARMA, M.P. Cell and tissue culture of *Dracaena sanderiana* Sander ex Mast- a review *Hamdard Medical*, v.52 n. 4, p.31–36, 2010.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Perfil da Cadeia Produtiva de Flores Ornamentais do Distrito Federal: Exportações brasileiras de flores e plantas ornamentais [S.l.]: Hórtica Consultoria e Treinamento, p.121, 2005. Disponível in: <Biblioteca Sebrae virtual: http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/solucoes_online/Biblioteca-Sebrae:-publica%C3%A7%C3%B5es,-cartilhas-e-guias>. Acesso em: 9 mai. 2014.

LU, P.L. MORDEN, C. Phylogenetics of the plant genera *Dracaena* and *Pleomele* (Asparagaceae). *Botanica Orientalis*, v. 7, p. 64-72, 2010.

MILLER H.J., QUIN C.E. e GRAHAM D.C. A strain of *Erwinia herbicola* pathogenic on *Gypsophila paniculata*. *Netherland Journal Plant Pathogenic*, v.87, p.167-172, 1981.

PAEK, K.Y.; CHAKRABARTY, D.; HAHN, E.J. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, v.81, p. 287-300, 2005.

PAEK, K.Y.; HAHN, E.J.; SON, S.H. Application of bioreactors of large scale micropropagation systems of plants. *In Vitro Cellular Developmental Biology Plant*, v.37, p.149-157, 2001.

PASQUAL, M.; SANTOS, F.C.; FIGUEIREDO, M.A.; JUNQUEIRA, K.P.; REZENDE, J.C.; FERREIRA, E.A. Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. *Horticultura Brasileira*, v. 26, n. 1, p. 45-49, 2008.

PATI, P.K.; RATH, S.P.; SHARMA, M.; SOOD, A.; AHUJA, P.S. *In vitro* propagation of rose-a review. *Biotech Advances*, v.94, p. 114, 2005.

PATRO, A. Bambu-da-sorte-*Dracaena sanderiana*. Disponível em:
<http://www.jardineiro.net/br/banco/dracaena_sanderiana.php>. Acesso em 18 mai. 2014.

RADMANN, E.B.; BRAGA, E.J.B.; KARAN, M.A.L.; POSADA, M.A.C.; PETERS, J.A. Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de plantas micropropagadas de *Gypsophila paniculata* L. Revista Brasileira de Agrociência, v. 7, n. 3, p. 171-175, 2001.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. Plant Physiology, n.101, p.7-12, 1993.

SUBHASHINI R.M.B.; AMARATHUNGA N.L.K.; KRISHNARAJAH S.A.; EESWARA J. P. (2011) Effect of benzyl aminopurine, gibberellic acid, silver nitrate and silver thiosulphate, on post harvest longevity of cut leaves of *Dracaena*. Ceylon Journal of Science, v. 40, n. 02, p. 157-162, 2011.

VEILING-HOLAMBRA. Flores e Plantas Ornamentais. Disponível em:
<<http://www.veiling.com.br/>>. Acesso em: 18 mai.2014.

WANG, S. M.; PIAO, X.C.; PARK, S.Y.; LIAN, M.L. Improved micropropagation of *Gypsophila paniculata* with bioreactor and factors affecting ex vitro rooting in microponic system. In Vitro Cellular Developmental Biology Plant, v.49, p.70–78, 2013.

CAPÍTULO I

Micropropagação de *Gypsophila paniculata* pelos métodos convencional e Biorreatores com Sistemas de Imersão Temporária (SITs)

1. INTRODUÇÃO

A *Gypsophila paniculata* é considerada uma das principais flores de corte cultivada, sendo apontada como terceiro produto mais comercializado no mercado atacadista de São Paulo (ABAFEP, 2011). No Rio Grande do Sul, os meses de maior consumo das flores são maio, junho e novembro, quando o mercado local não consegue suprir a demanda. Dessa forma, o aumento da produção nesses meses seria de grande importância para a economia do estado e o incremento do agronegócio na floricultura, já que a sua produção local é vantajosa.

A *G. paniculata* é uma angiosperma que pertence à família Cariofilaceae, popularmente conhecida como Mosquitinho, sendo originária da Europa. Suas inflorescências são formadas por flores pequenas e brancas, as quais são comercializadas para serem utilizadas na confecção de arranjos e buquês (LORENZI; SOUZA, 1995). Seu manejo é fácil, podendo ser cultivada durante todo o ano e seu desenvolvimento pode ser dividido em quatro estádios: vegetativo, indução do florescimento, alongação caular e florescimento (DANZIGER, 1995), os quais podem ser afetados diretamente pela luminosidade, pois dias longos são necessários para que a planta passe do estágio vegetativo para o reprodutivo. Dessa forma, o comportamento da espécie está fortemente influenciado pelo clima, e especialmente pela duração do dia e da temperatura. Segundo González (1988), é uma planta tipicamente de dia longo (14 a 16 horas de sol), não florescendo quando os dias são curtos e as temperaturas inferiores a 10°C, sendo que nestas condições mantém a forma de roseta e permanece em estágio vegetativo. Portanto, justifica-se a importância da manipulação de sua propagação, para que suas flores sejam disponibilizadas o ano todo.

As plantas comercializadas desta espécie possuem geralmente flores estéreis e sem sementes, provenientes de programas de melhoramento (SHILLO; HALEVY 1982), e baixa taxa de enraizamento, dificultando a propagação durante o estágio vegetativo. Segundo a Veiling Holambra, são considerados defeitos graves o ataque e a infecção por pragas e doenças que depreciam a aparência e desvalorizam a

qualidade das flores, sendo que essas doenças podem evoluir durante a comercialização. Com tantas exigências do mercado, que cresce a cada ano, é necessário que sejam projetadas alternativas e técnicas possibilitando aprimorar a produção de mudas com qualidade, para um incremento na produção.

Devido a essas condições, a micropropagação de mudas de muitas espécies vegetais de interesse econômico tornou-se favorável, do ponto de vista produtivo e comercial, substituindo os métodos de propagação por sementes ou estacas (WANG et al., 2013).

Tendo em vista os problemas de propagação da *G. paniculata*, a cultura de tecidos pode ser utilizada como uma ferramenta biotecnológica para aprimorar a produção de mudas. A micropropagação consiste na produção de um grande número de plantas, em curto espaço de tempo e em área reduzida, podendo ser realizada durante o ano todo, com a produção de mudas de alta qualidade sanitária, (CARVALHO et al., 2011). O sucesso do método de micropropagação depende de vários fatores, como reguladores de crescimento acrescentados aos meios, genótipos das plantas e tipo de explantes (PATI et al., 2005). Além disso, a deficiência ou imobilidade de nutrientes minerais, o tipo dos meios (semissólidos ou líquidos) e variações de pH durante a cultura podem resultar em diversos distúrbios fisiológicos (BAIRU et al., 2009; DE KLERK; TER BRUGGE, 2011). O fornecimento de nutrientes pode afetar o crescimento de calos, a organogênese e embriogênese da cultura (EVENS, 2008).

Muito esforço tem sido despendido para reduzir custos na produção de plantas comerciais através da micropropagação, incluindo a utilização de diversos meios de cultura, com diferentes concentrações de sais e vitaminas de acordo com as necessidades da espécie ou cultivar, podendo ser geleificados com diferentes agentes (BELL; REED, 2002; LUCYSZYN et al., 2006; BELL et al., 2009). Além disso, uma maneira de diminuir a automação é a utilização de meios líquidos, que podem ser utilizados para a propagação de várias espécies (LIAN et al., 2003; KURIA et al., 2008; ABDULLATEEF et al., 2009; RODEVA et al., 2009) .

Redução significativa dos custos na micropropagação pode ser alcançada utilizando biorreatores com sistemas de imersão temporária (SITs), o que indica que a tecnologia pode ser otimizada para produção em massa de várias espécies importantes (DEBNATH, 2009), inclusive em ornamentais de corte, como a *G.*

paniculata (ZHANG et al., 2007), espécies de orquídeas (YANG et al., 2010; MOREIRA et al., 2013), folhagens como *Xanthosoma sagittifolium* (NIEMENAK et al., 2013). Convém salientar que a grande maioria dos estudos com biorreatores envolvem culturas como cana-de-açúcar, banana, inhame, batata e abacaxi (PIAO et al., 2003; GONZÁLEZ-OLMEDO et al., 2005; MORDOCCO, et al., 2009; POLZIN et al., 2013; ARAGÓN et al., 2014), entre outras. Portanto, pesquisas com as mais variadas espécies têm evidenciado a eficiência dos SITs, para a produção de mudas. Desta forma, é necessário que esta tecnologia seja testada e aplicada a mais espécies ornamentais, para que se obtenha a eficiência no processo de propagação, tendo em vista o aumento de sua demanda e importância na economia.

A cultura de tecidos, como salientado acima, embora possa ser utilizada num sistema de produção comercial de plantas, pode apresentar alguns distúrbios fisiológicos na micropropagação, sendo os mais comuns a hiperidricidade, necrose na ponta dos brotos e formação de calos (REED et al. 2013). A hiperidricidade é um distúrbio comum na propagação *in vitro*, que resulta na alteração morfológica e fisiológica das brotações, muitas vezes dando-lhes uma aparência vítrea, devido ao acúmulo de água apoplástica, podendo causar a necrose das brotações (ASCOUGH; FENNELL, 2004). Segundo observado por Aragón et al.(2010), a utilização do meio líquido nos processos de imersão temporária faz com que a planta absorva nutrientes e água por toda a sua superfície, o que pode acentuar este processo. Outros fatores como a luminosidade e temperatura podem influenciar a eficiência da micropropagação. Segundo estudos realizados por Radmann et al. (2001), a luminosidade e a temperatura do ambiente da sala de crescimento estão estritamente relacionadas às respostas das plantas micropropagadas, tendo influência direta sobre a taxa de multiplicação e crescimento. Assim, o controle de possíveis distúrbios fisiológicos é indispensável para que as brotações não sofram danos indesejáveis e possam produzir plantas viáveis para a fase de aclimação e posterior comercialização.

O objetivo do presente estudo foi realizar uma análise comparativa entre a multiplicação de *Gypsophila paniculata in vitro*, pelo método convencional e biorreatores (SITs), visando a otimização da técnica para possibilitar a eficiência na automação e produção de mudas da espécie para fins comerciais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Estabelecimento e multiplicação do material

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Universidade Federal de Pelotas. Para o estabelecimento *in vitro* utilizaram-se explantes constituídos por microestacas contendo duas gemas axilares e meristemas apicais retirados de ramificações de plantas *in vivo* de *Gypsophila paniculata*. Os explantes foram inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), contendo 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 7 g L⁻¹ de ágar, sem reguladores de crescimento (RADMANN et al. 2001). O pH foi ajustado para 5,8 antes da adição do ágar e foram distribuídos 30 mL de meio por frasco e autoclavados durante 20 minutos a 120°C e 1,5 atm. Foram colocados 5 explantes por frasco e transferidos para sala de crescimento com densidade de fluxo de fótons de 48 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ em fotoperíodo de 16 horas, durante 30 dias.

2.2 Experimentos

Após a obtenção de material suficiente para o início dos experimentos, 120 explantes, constituídos por microestacas contendo duas gemas axilares, foram inoculados em 24 frascos contendo meio semissólido, conforme acima citado, sendo assim, montado em sistema convencional.

Os biorreatores com sistema de imersão temporária (SIT) foram montados em frascos de policarbonato da Raln® (Figura 1), em estantes na sala de crescimento (Figura 2). Foram feitas estacas com duas gemas axilares, retiradas do meio de cultivo semissólido (Figura 3A), e transferidas 30 para cada um dos SITs (Figura 3B), em mesmo meio utilizado no sistema semissólido, porém sem a adição de ágar. O número de imersões foi ajustado para oito imersões em 24 horas, com três minutos de imersão em cada período de tempo. Os dois experimentos foram realizados em sala de crescimento, nas mesmas condições que as anteriormente especificadas.



Figura 1. Modelo do biorreator com sistema de imersão temporária (SIT), utilizado para experimento com *G. paniculata*. UFPel, 2014.



Figura 2. Biorreatores (SIT) montados na sala de crescimento no Laboratório de Cultura de Tecidos: A- Controladores de tempo; B- Válvulas, que controlam entrada e saída de ar do sistema, que estão ligadas a um compressor de ar; C- Frascos de polycarbonato com os explantes e frascos com o meio líquido; D- Biorreatores (SIT) em funcionamento. UFPel, 2014.

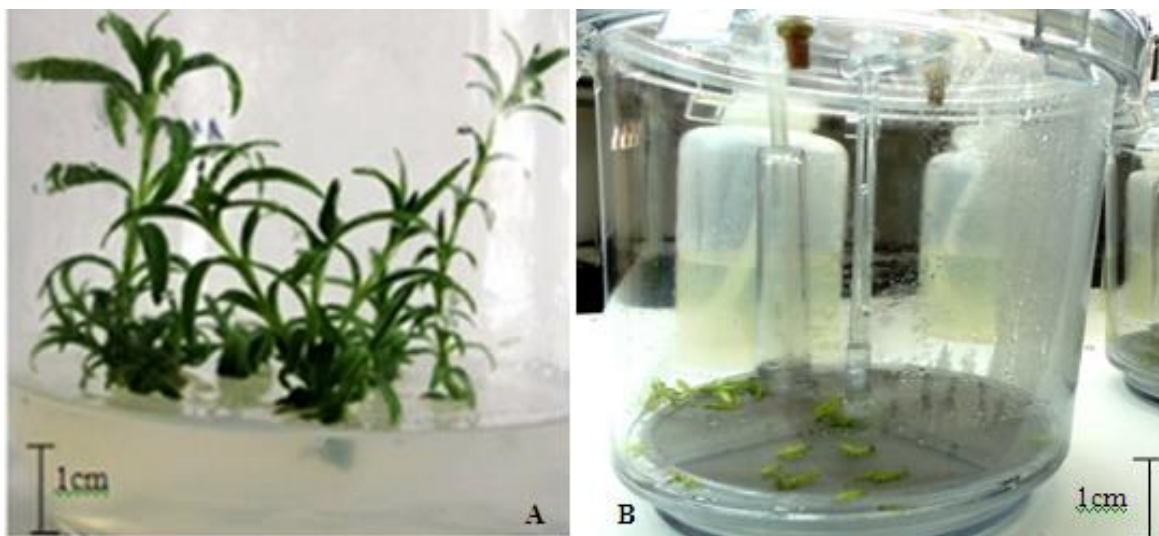


Figura 3. A- Brotações desenvolvidas em meio semissólido que foram utilizadas como explantes para o biorreator; B- Explantes transferidos para biorreator. UFPel, 2014.

2.3 Avaliações

Após 30 dias de cultivo em sistema convencional e SITs, foram avaliadas as seguintes variáveis: hiperidricidade, presença de raiz, número médio de brotações, número médio de folhas e altura das brotações.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, onde os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% e 1% de probabilidade de erro, com a utilização do software Statistix 9.0 (ANALYTICAL SOFTWARE, 2009).

3. RESULTADOS

De acordo com a análise de variância, não houve diferença estatística significativa para a altura das brotações, entre os dois tratamentos (Tabela 1). Dos explantes inicialmente inoculados no meio semissólido, 22,5% desenvolveram brotações que produziram raízes, ou seja, formaram plantas inteiras, sendo este sistema mais eficiente que o SIT, no qual não ocorreu a formação destes órgãos. Por outro lado, o SIT apresentou 100% de hiperidricidade e apenas 6,5% das brotações desenvolvidas em meio semissólido (Tabela 1). Tal distúrbio pode ter ocasionado a não formação de raízes, visto que as alterações induzidas por este distúrbio fisiológico pode ter alterado a produção e translocação de auxinas, necessárias para a indução destes órgãos. Em relação ao número de brotos, houve diferença significativa entre os dois sistemas, com um aumento médio de 5,53 no

sistema SIT, ficando evidente a maior proliferação no meio líquido (Figura 4). Além do aumento no número de brotações, observou-se também incremento no número de folhas no SIT, sendo esta resposta 31,8% superior ao obtido no meio semissólido (Tabela 1). Mesmo com a presença da hiperidricidade, o número médio das brotações e folhas, foram maiores em SIT, comparando com o cultivo em meio semissólido (Figura 4 e 5) e (Tabela 1).

Tabela 1. Variáveis analisadas em *Gypsophila paniculata*, multiplicadas em meio semissólido e biorreatores com SITs. UFPel, 2014.

Tratamentos	Nº médio de brotos	Nº médio de folhas	Altura (cm)	Presença de Raízes (%)	Hiperidricidade (%)
SITs	5,53a**	23,34a *	2,76 ^{ns}	0,00 a*	100a**
Semissólido	1,52 b	17,71 b	2,16	22,5b	6,5b

Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (* $\alpha=0,05$ e ** $\alpha=0,01$)

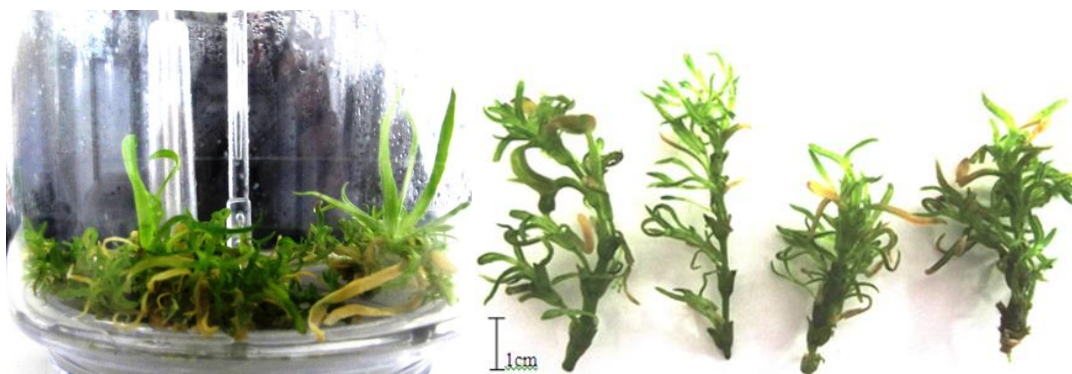


Figura 4. Brotações de *Gypsophila Paniculata*, em meio MS líquido nos biorreatores (SIT), após 30 dias de cultivo. UFPel, 2014.



Figura 5. Plantas de *Gypsophila paniculata* em meio MS semissólido (sistema convencional), após 30 dias de cultivo. UFPel, 2014.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo ficou evidente a maior eficiência dos biorreatores (SIT) em relação ao meio semissólido, quanto ao número médio de brotações e folhas de *G. paniculata* (Tabela 1). Zhang et al. (2007), demonstraram a eficiência dos biorreatores para a propagação em grande escala de mudas de *G. paniculata*, porém em seu estudo utilizaram $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de densidade de fluxo de fótons, quando comparado a este trabalho que utilizou $48 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Mesmo com essa diferença no fluxo de fótons, foram observados resultados semelhantes neste trabalho com a mesma espécie, principalmente quanto à taxa de multiplicação, quando as culturas foram submetidas a imersões periódicas de três minutos por oito vezes num período de 24 horas, mesmo com o desenvolvimento de alguns distúrbios fisiológicos.

Dentre estes distúrbios, a hiperidricidade foi a mais evidente, atingindo 100% das brotações desenvolvidas no SIT. Esta alteração pode ter sido ocasionada pelo tempo e frequência das imersões, visto que como mostrado por vários autores, estas podem variar em função da espécie em estudo (ZHANG, 2007; ARAGÓN et al., 2010; IVANOVA; VAN STADEN, 2011; WANG, et al. 2013). A *G. paniculata* é uma espécie propensa a esta alteração fisiológica, mesmo quando utilizados meios semissólidos e com baixas concentrações de reguladores de crescimento, e principalmente quando em meio líquido, podendo apresentar até 80% de hiperidricidade em condições comerciais ou experimentais (GRIBBLE et al., 1996).

Segundo Snyman et al.(2011), uma forma de evitar ou diminuir esse distúrbio seria através da manipulação dos tempos de imersão e consequentemente na disponibilidade de nutrientes aos explantes em meios líquidos.

Já no sistema convencional, ou seja, com meio semissólido a porcentagem de hiperidricidade obtida neste trabalho foi de 6,5% (Tabela1 e Figura 5). Tal resposta pode ser atribuída à baixa solubilidade dos nutrientes e vitaminas quando utilizado ágar como gelificante. Estudos realizados por Radmann et al. (2001) com esta mesma espécie, mostraram que o aumento da concentração de ágar (10gL^{-1}) e a utilização do meio MS sem reguladores de crescimento, possibilitaram a produção de plantas com alta qualidade, sem o desenvolvimento deste distúrbio.

Por outro lado, quanto à utilização de meios líquidos e as substancias que compõem os mesmos, estão em contato direto com toda a superfície do explante, a absorção de nutrientes e substâncias orgânicas é mais intensa, mesmo que a imersão ocorra por curto período de tempo. Portanto, é possível que a concentração de nutrientes e reguladores no meio possa causar distúrbios que prejudiquem a multiplicação e o desenvolvimento, como a hiperidricidade e morte celular (IVANOVA; VAN STADEN, 2011). Assim, a redução de alguns nutrientes minerais dos meios de cultura, como NH_4^+ , NO_3^- e CaCl_2 , entre outros, podem diminuir estas anomalias (DEBERGH, et al., 1992; IVANOVA; VAN STADEN, 2009). Desta maneira, a constituição de cada meio de cultivo deve ser baseada nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, para atender suas necessidades específicas, em vista que os minerais exercem papel importante, não apenas no crescimento, mas também na regulação da morfogênese (RODRIGUEZ et al., 1991; BELL et al., 2009; HASSANEN; GABR, 2012). Tendo em vista tais considerações, os protocolos de micropropagação que resultem em qualquer desordem fisiológica podem estar associados a um desequilíbrio de nutrientes no meio de cultura utilizado (REED, et al., 2013).

A baixa incidência de hiperidricidade nas brotações desenvolvidas em meio semissólido pode ter determinado, por outro lado, o desenvolvimento de raízes em 22,5% das mesmas, incrementando o crescimento das plantas formadas (Figura 5). Tais órgãos não foram induzidos nas brotações desenvolvidas no SIT (Figura 4), que apresentaram, por outro lado, alto índice de hiperidricidade. Aragón et al. (2010),

relataram que o aumento na hiperidricidade em meio líquido foi observado na maioria dos estudos em processos de automação das mais variadas culturas.

Embora estes resultados sejam os primeiros obtidos com SIT no laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Botânica da UFPel com *G. paniculata* e, mesmo com a ocorrência de alterações fisiológicas (Figura 4), este sistema se mostrou eficiente para a multiplicação e o aumento do número de folhas na referida espécie. Moreira et al. (2013), em seus estudos com propagação de *Cattleya walkeriana* em biorreatores mostraram que o SIT promoveu um crescimento maior da parte aérea e do sistema radicular, melhorando ainda o controle da perda de água das plantas, tendo em vista que o material vegetal propagado por imersão temporária pode ter um melhor desempenho durante a fase de aclimação das plantas (ETIENNE; BERTHOULY, 2002).

Acredita-se na possibilidade de um protocolo eficiente para a propagação de *G. paniculata* em biorreatores com imersão temporária, o que facilitará a produção de mudas em grande escala. Novos estudos são necessários para testar outros tempos e frequências de imersão, bem como pesquisas mais detalhadas sobre as necessidades fisiológicas de nutrientes à espécie, para que seja possível aperfeiçoar os protocolos de propagação a serem utilizados em biorreatores (SITs).

5. CONCLUSÕES

Conclui-se com os resultados obtidos neste trabalho, nas condições no momento de sua realização, que a multiplicação de *G.paniculata* em biorreator com SIT pode ser mais eficiente do que no sistema tradicional (meio semissólido), pois mesmo com a indução de hiperidricidade, os explantes apresentaram maior proliferação de brotações e maior número de folhas. No entanto, são necessários que sejam realizados novos experimentos, envolvendo principalmente, número e tempos de imersões, bem com a composição dos meios de cultura.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAFEP. Associação Brasileira do Agronegócio em Flores e Plantas, 2011. Disponível em: < <http://www.abafep.com.br/>>. Acesso em: 23 set. 2014.

ABDULLATEEF, S.; PINKER, I.; BÖHME, M. Potato micropropagation using advanced biotechnology: effect of liquid media on potato shoot quality. *Acta Horticulture*, v.830, p.135-141, 2009.

ANALYTICAL SOFTWARE. STATISTIX 9.0. User's Manual Analytical Software. Florida State University Tallahassee, Florida, USA. 2009. Disponível em: < <http://www.statistix.com>>. Acesso em: 21 jul. 2014.

ARAGÓN, C. E.; SÁNCHEZ, C.; GONZALEZ-OLMEDO, J.; ESCALONA, M.; CARVALHO, L. Comparison of plant in plantlets propagated in temporary immersion bioreactors and gelled medium during *in vitro* growth and acclimatization. *Biologia Plantarum*, v.58, n.1, p.29-38, 2014.

ARAGÓN, C.E.; ESCALONA, M.; RODRIGUEZ, R.; CAÑAL, M.J.; CAPOTE, I.; PINA, D.; GONZÁLEZ, O. J. Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cell Developmental Biology Plant*, v.46, p.89–94, 2010.

ASCOUGH, G.D.; FENNELL, C.W. The regulation of plant growth and development in liquid culture. *African Journal of Botany*, v. 70, p.181-190, 2004.

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

BELL, R. L.; SRINIVASAN, C.; LOMBERK, D. Effect of nutrient media on axillary shoot proliferation and preconditioning for adventitious shoot regeneration of pears. *In Vitro Cell Developmental Biology Plant*, v.45, p.708-714, 2009.

BELL, R.L.; REED, B.M. In vitro tissue culture of pear: advances in techniques for micropropagation and germplasm preservation. *Acta Horticulture*, v.596, p. 412-418. 2002.

CARVALHO, A.C.P.P.; TORRES, A.C.; BRAGA, E.J.B.; LEMOS, E.P. de; SOUZA, F.V.D.; PETERS, J.A.; WILLADINO, L.; CÂMARA, T.R. Glossário de Cultura de Tecidos de Plantas. *Plant Cell Culture and Micropropagation*, v. 07, p. 30-60, 2011.

DANZIGER, D. Flower Farm. *Gypsophila: Cultivation in Israel*. Beit Dagan, Israel, p.45, 1995.

DEBNATH, S.C. Characteristics of strawberry plants propagated by in vitro bioreactor culture and ex vitro propagation method. *Eng Life Science*, v.9, p. 239-246, 2009.

DEBERGH, P.;AITKEN-CHRISTIE, J.; COHEN, D.; GROUT, B.; VON ARNOLD, S.; ZIMMERMAN, R.; ZIV, M. Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, v.30, p.135-140, 1992.

DE KLERK, G.J.; TERBRUGGE, J. Micropropagation of dahlia instatic liquid medium using slow-release tools of medium ingredients. *Science Horticulture*, v. 127, p. 542-547, 2011.

ETIENNE, H. ; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *.Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.69, p.215-231, 2002.

GONZALEZ, A; BAÑÓN, S.; FERNANDEZ, J.A. Cultivos Ornamentales para complementos Del ramo de flor. Ed.Mundi Prensa, Madrid, cap.II: *Gypsophila*, p.79-118,1998.

GONZÁLEZ-OLMEDO,J.L.;FUNDORA,Z.; MOLINA, L.A.;ABDULNOUR,J.; DESJARDINS,Y.; ESCALONA, M. New contributions to propagation of pineapple (*ananas comosus*) in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cell Developmental.Biology Plant*, v.41, p.87-90, 2005.

GRIBBLE, K.; SARAFIS, V.; NAILON, J.; HOLFORD, P.; UWINS, P. Environmental scanning electron microscopy of the surface of normal and vitrified leaves of *Gypsophila paniculata* (Babies Breath) cultured in vitro. *Plant Cell Reports*, v. 15, p. 771-776, 1996.

HASSANEN, S.A.; GABR, M.R. In vitro propagation of pear *Pyrus betulae folia* roots tock. *American-Eurasian Journal of Agricola an Environmental Science*, v.12, n.4, p.484-489, 2012.

INBRAFLOR. Instituto Brasileiro de floricultura. Disponível em: < <http://www.ibraflor.com/>>Acesso em: 15 mai.2014.

IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricityin *Aloe polyphylla*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, v.104, p.13- 21, 2011.

IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Nitrogen source, concentration, and $\text{NH}_4\text{:NO}_3$ ratio influence shoot regeneration and hyperhydricity in tissue cultured *Aloe polyphylla*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, v. 99, p.167-174, 2009.

KURIA, P.; DEMO, P; NYENDE, A.B.; KAHANGI, E.M. Cassava starch asan alternative cheap gelling agent for the *in vitro* micropropagation of potato (*Solanumtu berosum L.*). *African Journal Biotechnologic*, v.7, p.301-307, 2008.

LIAN M. L.; CHAKRABARTY D.; PAEK, K.Y. Growth of *Lilium Oriental Hybrid* 'Casablanca' bulblet using bioreactor culture. *Science Horticulture*, v.97, p.41-48, 2003.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. *Plantas ornamentais do Brasil - Arbustivas herbáceas e trepadeiras*. Plantarum, p.720, 1995.

LUCYSZYN, N.; QUOIRIN, M.; RIBAS, L.L.F.; KOEHLER, H.S.; SIERALOWSKI, M.R. Micropropagation of 'Durondeau' pear in modified-gelled medium. *In Vitro Cell Developmental Biology Plant*, v. 42, p. 287-290, 2006.

MORDOCCO, A.M.; BRUMBLEY, J.A.; LAKSHMANAN, P. Development of a temporary immersion system (RITA®) for mass production of sugarcane (*Saccharum spp.* interspecific hybrids).Doi: 10.1007/s11627-013-9556-2. *In Vitro Cell Developmental Biology Plant*, v.45, p. 450-457, 2009.

MOREIRA, A.L.; DA SILVA, A.B.; SANTOS, A.; DOS REIS, C.O. LANDGRAF, P.R.C. *Cattleya walkeriana* growth in different micropropagation systems. *Ciência Rural*, v.43, n.10, p.1804-1810, 2013.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantrarum*, v. 15, n. 3, p. 473- 497, 1962.

NIEMENAK, N.; NOAH, A.M.; OMOKOLO, D.N. Micropropagation of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) in temporary immersion bioreactor. *Plant Biotechnolgy*, v.7 n.3, p.383-390, 2013.

PATI, P.K.; RATH, S.P.; SHARMA, M.; SOOD, A.; AHUJA, P.S. *In vitro* propagation of rose-a review *Biotech Advances*, v.94, p.114, 2005.

PETRY, C. *Plantas Ornamentais-Aspectos para a produção*. Ed. Universidade Federal de Passo Fundo, 201 p., 2008.

PIAO, X.C.; CHAKRABARTY, D.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. A simple method for mass production of potato microtubers using a bioreactor system *Current Science*, v. 84, n.8, 25, 2003.

POLZIN, F.; SYLVESTRE, I.; DÉCHAMP, E.; ILBERT, P.; ETIENNE, H.; ENGELMANN, F. Effect of activated charcoal on multiplication of African yam (*Dioscorea cayenensis-rotundata*) nodal segments using a temporary immersion bioreactor (RITA®). *Plant Tissue Culture*, v. 50; p. 210-216, 2014.

RADMANN, E.B.; BRAGA, E.J.B. ; KARAN, M.A.L.; POSADA, M.A.C.; PETERS, J.A. Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de plantas micropropagadas de *Gypsophila paniculata* L. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 7, n. 3, p. 171-175, 2001.

REED, B.M.; WADA, S.; DENOMA, J. Randall P. NIEDZ, R.P. Mineral nutrition influences physiological responses of pear in vitro. *In Vitro Cell Developmental Biology Plant*, v.49, p. 699-709, 2013.

REVISTA SEBRAE DE AGRONEGOCIOS-2005. Disponível em:
<[http://201.2.114.147/bds/BDS.nsf/F97237DF2663566E032570CB0047765B/\\$File/NT000AD51E.pdf](http://201.2.114.147/bds/BDS.nsf/F97237DF2663566E032570CB0047765B/$File/NT000AD51E.pdf)>. Acesso em: 15 mai. 2014.

RODEVA, V.GROZEVA, S, K. Micropropagation of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) on solid and liquid media. Acta Horticulture, v.830, p.291-295, 2009.

RODRIGUEZ, R.; DÍAZ-SALA, C.; CUOZZO, L.; ANCORA, G. Pear *in vitro* propagation using a Double-phase culture system. Science Horticulture, v.26, n. 1, p. 62-64, 1991.

SHILLO, R; Halevy, A. H. Interaction of photoperiod and temperature in flowering-control of *Gypsophila paniculata* L. Science Horticulture, v.16, p. 385-393, 1982.

SNYMAN,S.J.; P.D. NKWANYANA,P.D.; M.P. WATT,M.P. Alleviation of hyperhydricity of sugarcane plantlets produced in RITA® vessels and genotypic and phenotypic characterization of acclimated plants. African Journal of Botany, v. 77, p.685-692, 2011.

YANG, J.F.; PIAO, X.C.; SUN,D.; LIAN,M.L. Production of protocorm-like bodies with bioreactor and regeneration in vitro of *Oncidium* ‘Sugar Sweet’. Science Horticulture, v.3626, 2010.

WANG, S. M.; PIAO,X.C.; PARK,S.Y.; LIAN, M.L. Improved micropropagation of *Gypsophila paniculata* with bioreactor and factors affecting ex vitro rooting in microponic system .In Vitro Cell &Developmental Biology Plant, v.49, p.70-78, 2013.

ZHANG, C.H.; PIAO, X.C.; LIAN, M.L.; WANG, S.M. Application of bioreactors in rapid propagation of *Gypsophila paniculata*. Bull Bot, v.24, p.526-531, 2007.

CAPÍTULO II

Estabelecimento, indução à multiplicação e estresse oxidativo de *Dracaena sanderiana* (bambu-da-sorte) *in vitro*

1. INTRODUÇÃO

A *Dracaena sanderiana*, conhecida como Bambu-da-sorte é atualmente uma das plantas de vaso mais populares em todo o mundo, tornando-se uma das mais conhecidas entre as ornamentais (PATRO, 2012). É nativa da África Ocidental e encontrada nas áreas tropicais e subtropicais da África e da Índia (SUBHASHINI et al., 2011). É uma planta de interiores conhecida por sua aparência e facilidade de cultivo em ambientes de temperatura amena (acima dos 15°C), meia-sombra e bastante umidade (DAQUINTA et al., 2010). Sua propagação geralmente é feita por estacas, mas seu crescimento é lento, o que faz com que estudos sobre a espécie, bem como a sua propagação *in vitro*, possam auxiliar a produção de mudas em um período mais curto de tempo. As plantas de *D. sanderiana* propagadas vegetativamente são sensíveis a várias doenças bacterianas, fúngicas e virais adquiridas a partir do ar, solo e insetos-vetores (ANON.,1996).Apesar da importância da espécie como ornamental, não existem muitos estudos com *D. sanderiana* em condições *in vitro* (ASLAM et al., 2010). Isso justifica a realização de novos estudos, mais detalhados sobre a manipulação e propagação da espécie.

Devido às características da tecnologia da cultura de tecidos, a micropropagação de mudas de muitas espécies vegetais de interesse econômico tornou-se favorável, do ponto de vista produtivo e comercial, substituindo os métodos de propagação por sementes ou estacas (WANG et al., 2013). Assim, a cultura de tecidos pode ser uma ferramenta aplicada à propagação de mudas desta espécie, aumentando sua multiplicação e consequentemente a produção. No entanto, a mesma apresenta alguns problemas como: contaminação por fungos e bactérias, necrose dos explantes ou brotos durante o estabelecimento e multiplicação, ocorrência de variações somaclonais, baixa porcentagem de enraizamento e sobrevivência durante a fase de aclimatização (NEGI; SAXENA, 2011; SINGH et al., 2013).

Vários protocolos de propagação vegetativa *in vitro* foram publicados com diferentes espécies de bambu: *Bambusa edulis* (LIN et al., 2005), *Bambusa balcooa*

(MUDOI; BORTHAKUR, 2009), *Dracaena sanderiana* (GRADAILLE et al., 2010), *Bambusa nutans* (NDIAYE et al., 2006; MEHTA et al., 2011), *Bambusa vulgaris* (NEGI; SAXENA, 2011), sendo em geral, utilizado o meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com diferentes concentrações e combinações de diversos fitorreguladores. Para a desinfestação dos explantes, foram utilizados hipoclorito de sódio e cloreto de mercúrio, em concentrações variadas e até mesmo associados a fungicidas e antibióticos em todos os estudos anteriormente mencionados.

Na natureza as plantas estão sujeitas a condições adversas, como temperatura, alta luminosidade, exposição a herbicidas, salinidade, presença de patógenos, déficit hídrico (MITTLER, 2006). Essas condições podem levar à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que normalmente são controlados por sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático (APPEL et al., 2004). Na cultura de tecidos, também ocorre o estresse oxidativo, que pode levar a um aumento nas atividades destas enzimas antioxidantes. De fato, é de supor que ocorrerá um aumento do estresse no momento do estabelecimento, devido à retirada dos explantes da planta matriz, na sua desinfestação e adaptação ao ambiente *in vitro*. Dentre as principais EROs que causam danos celulares, destacam-se o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlete (1O_2) e o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) (MCKERSIE et al., 1994; PASTORI et al. 2002; APPEL et al., 2004). As plantas desenvolveram diversos mecanismos altamente eficientes, para que suas células superem a toxicidade das EROs, entre eles estão os mecanismos antioxidantes enzimáticos, onde se destacam a importância da Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Ascorbato Peroxidase (APX), que são as principais enzimas envolvidas nesse tipo de reação (MITTLER, 2002; SCANDALIOS, 2002).

Entre as várias enzimas envolvidas na eliminação das EROs, a SOD pode ser considerada uma enzima chave, sendo, geralmente, a primeira linha de defesa ao estresse oxidativo (ZANANDREA et al., 2010; AMADOR et al., 2012). A SOD, além de remover o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), é capaz de controlar outras EROs, sendo o produto de sua reação o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). É a única enzima cuja atividade controla a concentração de $O_2^{\bullet-}$ no interior das células sendo, portanto, central no mecanismo de defesa, prevenindo, desse modo, a formação do radical

OH[•] (LEÓN et al., 2002). Contudo, o H₂O₂, produto de sua ação, é também tóxico para a célula e deve ser detoxificado pela catalase.

A CAT é uma enzima pertencente à família das oxirredutases presente universalmente nos organismos, se encontra nos peroxissomas, onde promove a decomposição do H₂O₂ em H₂O e O₂, a uma taxa extremamente elevada (MORITA et al., 1994). Entre as enzimas que degradam o H₂O₂, a CAT é a única que consegue catalisar este substrato sem consumir equivalentes redutores, constituindo, assim, um mecanismo eficiente de remoção de H₂O₂ (SCANDALIOS, 2005; GECHEV; BREUSEGEM, 2006). A CAT presente nos peroxissomos remove o H₂O₂ gerado durante a fotorrespiração e a β -oxidação dos ácidos graxos.

A APX caracteriza-se por possuir uma elevada especificidade pelo ascorbato, sendo o seu doador de elétrons para reduzir H₂O₂ em H₂O (SHIGEOKA et al., 2002). De acordo com Polle (2001), este ciclo é uma via eficiente para a eliminação do H₂O₂ em compartimentos onde a CAT não está presente, como nos cloroplastos (MILLER, 2002). O H₂O₂, em baixas concentrações, atua como uma molécula sinalizadora, desencadeando vários processos relacionados aos estresses, enquanto que em concentrações elevadas pode levar à morte celular programada (GILL; TUTEJA, 2010). Por isso o seu acúmulo pode causar a peroxidação de membranas celulares, prejudicando a sua função e integridade, com danos, frequentemente irreversíveis, para o funcionamento da célula (DEUNER et al., 2011).

Os parâmetros que determinam a contribuição das diferentes enzimas na eliminação do efeito nocivo são a afinidade pelo substrato, taxa de reação e concentração da enzima, nos diversos compartimentos celulares (MITTLER et al., 2004). Existem vários estudos que avaliaram *in vitro* (PETRIC et al., 2014) e *ex vitro* (DEUNER et al., 2011; ALVES et al., 2013), a atividade do mecanismo antioxidante enzimático e não enzimático, com a indução de diversos tipos de estresse. Porém, são inexistentes os estudos que analisam o nível da atividade dessas enzimas na fase inicial do estabelecimento de culturas *in vitro*, que pode ser específica para cada espécie e assim afetar a taxa de sobrevivência inicial dos explantes. Na cultura de tecidos o estresse oxidativo é benéfico e requerido a um nível baixo, para desencadear uma determinada rota morfogênica (OBERT et al., 2005; BLASQUEZ et al., 2009). Esse estresse pode ser induzido por concentrações mais elevadas de

nutrientes e reguladores de crescimento, tornando possível a diferenciação celular e o desencadeamento do processo de embriogênese somática (PASTERNAK, 2002). Levando em conta, os diversos fatores que podem aumentar os níveis de estresse *in vitro*, a etapa inicial da cultura de tecidos deve ser considerada como um fator importante, devido aos danos provocados pela excisão dos tecidos ou órgãos e aos compostos utilizados para a desinfestação, como o álcool, o hipoclorito de sódio, cloreto de mercúrio, ou outros agentes, que podem causar danos irreversíveis e até morte dos explantes.

Os objetivos do presente estudo foram: 1) determinar um protocolo eficiente de estabelecimento *in vitro* visando posterior multiplicação de *Dracaena sanderiana*; 2) avaliar as atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX, e quantificar o H_2O_2 durante a fase inicial do estabelecimento.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Desinfestação, estabelecimento e Indução de gemas

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Universidade Federal de Pelotas. As plantas de *Dracaena sanderiana* foram cultivadas em casa de vegetação (Figura 6), das quais foram retiradas estacas para o desenvolvimento de gemas e brotações axilares (Figura 7).

Para o estabelecimento *in vitro* foram testados inicialmente os seguintes explantes: entrenós caulinares (Figura 8A); nós caulinares (Figura 8B); folhas jovens (Figura 8C) e brotos axilares jovens inteiros (Figura 8D e 8E). No entanto, em função das altas contaminações obtidas nos primeiros experimentos, foram realizados testes de desinfestação, utilizando discos caulinares contendo nós e entrenós. Estes explantes foram submetidos a diferentes tratamentos: hipoclorito de sódio a 1% (T1), por 15 minutos; hipoclorito de sódio a 1,5% (T2), por 15 minutos; hipoclorito de sódio a 2% (T3), por 15 minutos; e cloreto de mercúrio 0,6% (T4), por 3 minutos. Posteriormente, em função dos resultados iniciais, utilizou-se como regra a desinfestação com o tratamento T3 (hipoclorito de sódio a 2%).

Os explantes foram inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), semissólido suplementado com 2 gL^{-1} de gelrite (Figura 3D) ou meio líquido (Figura 3E) sob agitação permanente (100 rpm), ambos contendo um mL^{-1} de PPM (Plant

Preservative Mixture), que é um conservante e biocida que impede ou reduz a contaminação. Foram realizados 33 tratamentos, com combinações de reguladores de crescimento descritos na tabela 2, onde foram inoculados, ao final do experimento, aproximadamente 1.800 explantes. Devido á alta taxa de contaminação obtida em todos os tratamentos especificados acima, após seis meses do início dos experimentos, os novos explantes que foram inoculados passaram a ser submetidos a uma lavagem com Cetazima 250 mgL⁻¹, por 10 minutos, antes da inoculação nos meios de cultura.



Figura 6. Plantas de *Dracaena sanderiana* (bambu-da-sorte), cultivadas em casa de vegetação da Universidade Federal de Pelotas. UFPel, 2014.



Figura 7. Estacas obtidas a partir das plantas cultivadas em casa de vegetação, com brotações axilares utilizadas como explantes para o estabelecimento e análises enzimáticas de *Dracaena sanderiana*. UFPel, 2014.

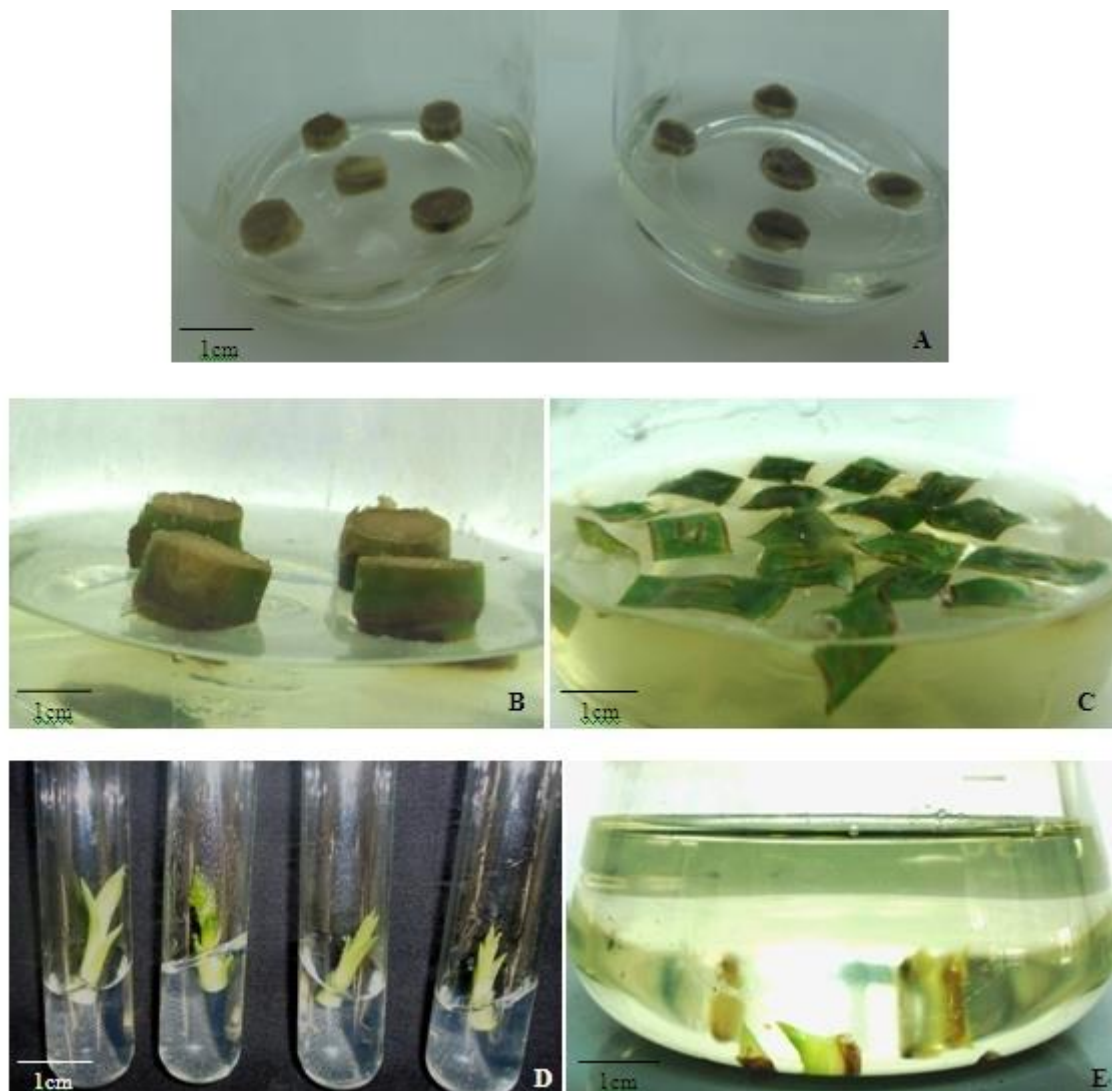


Figura 8. Explantes e meios de cultura utilizados para estabelecimento *in vitro* e análises enzimáticas de *Dracaena sanderia*. Meio semissólido: A- discos de entrenós; B-disco de nós caulinares. C- folhas jovens; D-brotos inteiros em meio semissólido; E- brotos inteiros em meio líquido. UFPel, 2014.

Tabela 2. Tratamentos utilizados para estabelecimento *in vitro* de *Dracaena sanderiana*. UFPel, 2014.

Tratamento	BAP mg/L	2,4D mg/L	2iP mg/L	ANA mg/L	AIA mg/L	AIB mg/L	TDZ mg/L	PICLORAN mg/L	GA3 mg/L
T1	0,5								
T2	1								
T3	1,5								
T4			0,5						
T5			1,5						
T6		0							
T7		1							
T8		1,5							
T9		2							
T10	0		0						
T11	1		0						
T12	1		1						
T13	0		1						
T14	2		1						
T15	0,5						5		
T16		2		0,5					
T17		3		0,5					
T18		4		0,5					
T19			10		0,4				
T20	5			0,5					5
T21			10		0,5				
T22			10			0,5			
T23			12		0,5				
T24			12			0,5			
T25			15		0,5				
T26			15			0,5			
T27		20							
T28								10	
T29								2	
T30					0,5		5		
T31					0,5		10		
T32					0,5		15		
T33			2		0,5				

2.2 Análises enzimáticas e bioquímicas

Para as análises enzimáticas foram utilizados brotos axilares desenvolvidos em estacas (Figura 2), os quais foram inicialmente submetidos, logo após a excisão, as seguintes etapas durante o processo de desinfestação: 1ª - Álcool 70% por um minuto; 2ª - Hipoclorito de sódio 2% por 15 minutos; 3ª - Lavagem tripla com água destilada e esterilizada, por cinco minutos cada. Posteriormente os brotos foram inoculados em tubos de ensaio contendo 20 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 10mgL^{-1} de 2iP (isopentenil adenina) e $0,5\text{ mg L}^{-1}$ de AIA (ácido 3-indolil acético) (Figura 8D). A este meio, foram adicionados 2 gL^{-1} de gelrite e 1mL^{-1} de PPM. Foram realizados dois experimentos, sendo que no primeiro, os tubos contendo os explantes inoculados foram mantidos no escuro por 20 dias, e no segundo, foram colocados diretamente na luz, pelo mesmo período, com densidade de fluxo de fótons de $48\text{ }\mu\text{mol m}^2\text{ s}^{-1}$, com fotoperíodo de 16 horas.

As análises enzimáticas foram realizadas em tecido foliar dos brotos após as seguintes etapas e períodos na cultura: 1- explantes logo após a coleta (controle); 2- explantes após tratamento com álcool; 3- explantes após tratamentos com álcool e hipoclorito de sódio 2%; 4- explantes após tratamentos com álcool, hipoclorito de sódio 2% e lavagem com água; 5- explantes cultivados *in vitro* por cinco dias; 6- explantes cultivados *in vitro* por 10 dias; 7- explantes cultivados *in vitro* por 15 dias; 8- explantes cultivados *in vitro* por 20 dias.

Para cada análise foram utilizados 200mg de tecido foliar, macerados em com 50% de polivinilpirolidona (PVP) e homogeneizado em 1,5 mL do seguinte tampão de extração: fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8, EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 10 mM. Após centrifugação a 13.000 g por 10 minutos, a 4° C, o sobrenadante foi coletado. O eluato foi utilizado para avaliar a atividade das enzimas e a quantificação das proteínas pelo método de Bradford (1976).

Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), em um meio de reação composto por fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8, metionina 14 mM, EDTA 0,1 μM , NBT 75 μM e riboflavina 2 μM . Os tubos com o meio de reação e a amostra foram iluminados por 7 minutos, com uma lâmpada fluorescente de 20W. Para o controle, o mesmo meio de reação sem a amostra foi iluminado. O branco foi mantido no escuro. As leituras

foram realizadas em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 560 nm e o cálculo da enzima foi feito pela seguinte equação: % de inibição = (A560 amostra com extrato enzimático - A560 controle sem enzima) / (A560 controle sem enzima). Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotoredução do NBT nas condições de ensaio, (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977).

Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada conforme descrito por Azevedo et al., (1998), com pequenas modificações. Sua atividade foi monitorada pelo decréscimo na absorbância a um comprimento de onda de 240 nm, durante 90 segundos em um meio de reação incubado a 28°C, contendo tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0 e H₂O₂ 12,5 mM.

Ascorbato Peroxidase (APX)

A atividade da APX foi realizada segundo Nakano; Asada (1981), utilizando-se tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, ácido ascórbico 0,5 mM e H₂O₂ 0,1 mM, monitorando-se a taxa de oxidação do ascorbato a um comprimento de onda de 290 nm e o resultado expresso em $\mu\text{mol ASA min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$.

Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

Para a quantificação de peróxido de hidrogênio, 200mg de tecido foliar foram macerados e homogeneizados em 5 mL de TCA e centrifugados a 12.000 g por 15 minutos, a 4°C. O H₂O₂ foi determinado medindo-se a absorbância a um comprimento de onda de 390 nm, em um meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, 500 μL do extrato e 1 mL de iodeto de potássio (VELIKOVA et al., 2000). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g de massa fresca}^{-1}$.

3. RESULTADOS

3.1 Estabelecimento e indução de gemas

Foi observada alta taxa de contaminação em todos os explantes submetidos à desinfestação, com 100% nos tratamentos T1e T2, 85,2% no tratamento T3, e 93,1% no tratamento T4, independente do explante (Figura 9). Após seis meses do início do experimento, por consequência dos resultados observados, foi adicionada aos novos explantes inoculados uma lavagem de 10 minutos com o antibiótico Cetazima 250 mgL^{-1} na desinfestação e também quando os explantes foram

transferidos para meio novo. No entanto, tal procedimento determinou apenas uma pequena redução na contaminação das culturas, o que possibilitou que alguns explantes se desenvolvessem, porém em pequeno número, pois as taxas de contaminação continuaram a ser elevadas, principalmente por bactérias, provavelmente de origem endógena.

Em relação aos 33 tratamentos utilizados para estabelecimento e indução de gemas, com diferentes explantes, apenas o tratamento com 15 mgL^{-1} de 2iP e $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de AIA em meio MS semissólido (T25), apresentou resultado positivo, com nós e brotos jovens inteiros. Os nós emitiram brotações após três meses de cultura (Figura 10A), as quais depois de separadas dos explantes originais e transferidas para meio MS, suplementado de 2 mg L^{-1} de 2iP e $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de AIA (T33), emitiram raízes, ou seja, desenvolveram tanto parte aérea como radicular ao final de 180 dias *in vitro* (Figura 10B). Somente com a formação das raízes é que foi observado um aumento mais acentuado, principalmente da parte aérea (Figura 10C). Já os explantes oriundos de brotos jovens deram origem a pequenas protuberâncias na parte basal após 90 dias de cultura (Figura 11), com diferenciação das células na região dos cortes, indicando possível desenvolvimento de gemas. Aos 120 dias, as protuberâncias inicialmente formadas desenvolveram-se, ficando evidente a proliferação de pequenas brotações aéreas (Figura 12).

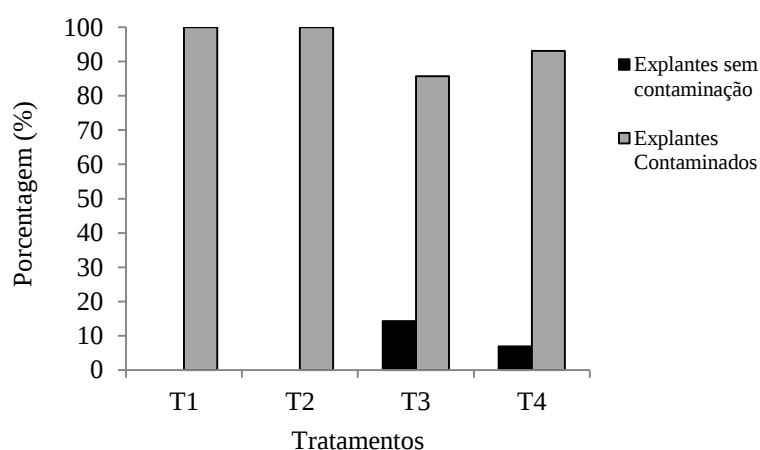


Figura 9. Porcentagem de contaminação de explantes (nós e entrenós) de *Dracaena sanderiana* submetidos a diferentes procedimentos de desinfestação. T1-hipoclorito 1%; T2-hipoclorito 1,5%; T3-hipoclorito 2%; T4- Cloreto de mercúrio 0,6%. UFPel, 2014.

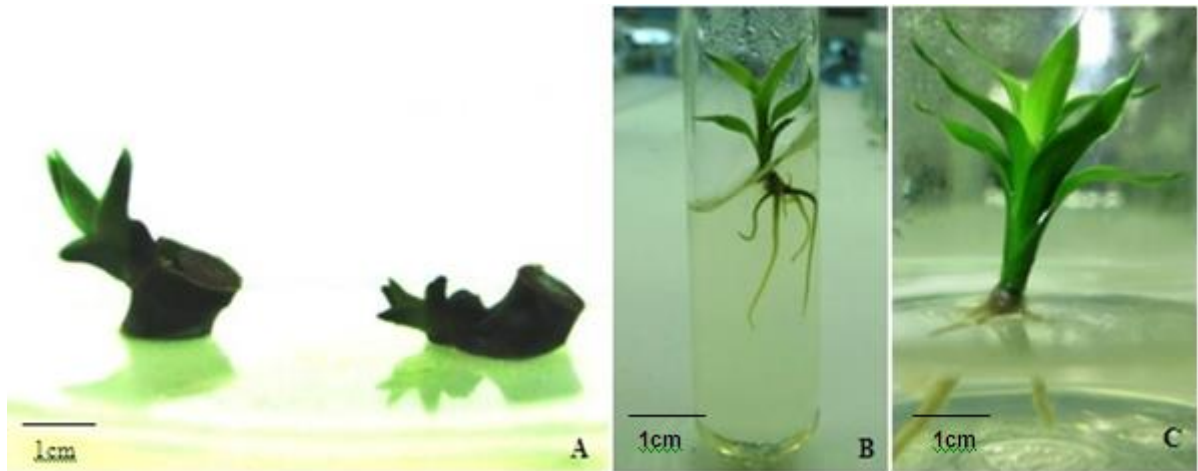


Figura 10. A-Brotações de *Dracaena sanderiana*, após 90 dias em meio semissólido com 15 mgL^{-1} de 2iP e $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de AIA (T 25) oriundas de segmentos nodais; B-brotação enraizada após 180 dias em meio semissólido contendo 2 mgL^{-1} de 2iP e $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de AIA (T 33); C- Planta após 240 dias em meio semissólido com 2 mgL^{-1} de 2iP e $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de AIA (T 33) . UFPel, 2014.

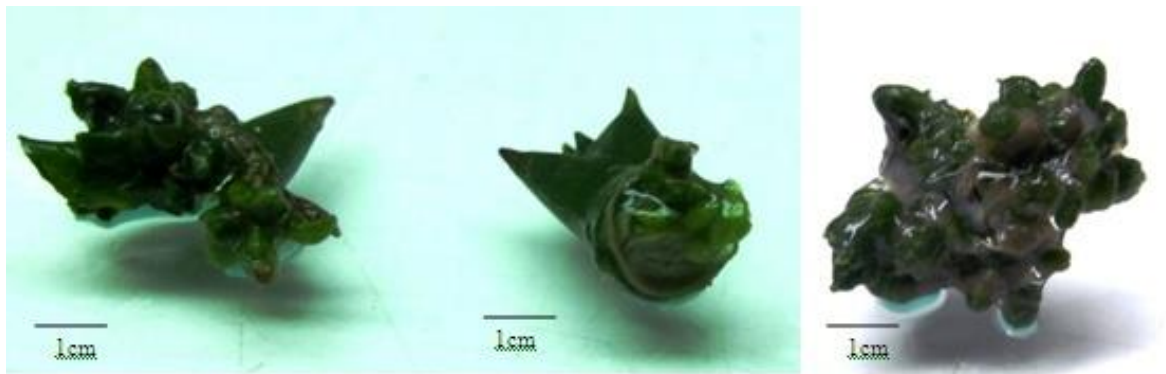


Figura 11. Gemas basais provenientes de brotos jovens de *Dracaena sanderiana* inoculados, em meio semissólido com 15 mgL^{-1} de 2iP e $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de AIA após 90 dias em cultura. UFPel, 2014.



Figura 12. Gemas desenvolvidas e pequenas brotações basais provenientes de brotos jovens de *Dracaena sanderiana* inoculados, em meio semissólido com 15 mgL^{-1} de 2iP e $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de AIA, após 120 dias em cultura. UFPel, 2014.

3.2 Análises enzimáticas e bioquímicas

No primeiro experimento (explantes cultivados por 20 dias no escuro), verificou-se o aumento na atividade da SOD somente no quinto tratamento (5 dias *in vitro*), com valor 38,7% maior que na primeira coleta, ou seja, no momento em que os explantes foram retirados das plantas matrizes. A atividade desta enzima continuou aumentando até o sexto tratamento, diminuindo no sétimo (57,2% e 42%, respectivamente). Na última coleta, observou-se uma diminuição significativa na atividade da SOD alcançando no final do período de cultura valores menores que os iniciais (Figura 13A).

As atividades da CAT (Figura 13B) e da APX (Figura 13C), enzimas que atuam em sequência a SOD, apresentaram comportamento semelhante, aumentando linearmente a partir do segundo até o quinto tratamento, permanecendo constante do quinto até o sétimo, e diminuindo bruscamente no último, chegando a valores semelhantes ao dos brotos recém excisados. No terceiro tratamento a atividade da CAT e APX tiveram um aumento de 41% e 37,5%, respectivamente, em relação ao primeiro, sendo que no quinto tratamento as atividades atingiram valores três vezes maiores para a CAT e duas vezes maiores para a APX, quando comparado ao início das avaliações.

Em relação aos níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), verificou-se o aumento a partir do terceiro tratamento, permanecendo com valores elevados até o sétimo e diminuindo no final do ensaio (Figura 13D).

Quando os explantes foram cultivados diretamente na luz, a atividade da SOD aumentou no terceiro tratamento, com valores 23,6% maiores que o controle (Figura 14A). A atividade dessa enzima continuou aumentando até o quinto tratamento (05 dias *in vitro*) e diminuindo no oitavo tratamento, cuja atividade foi semelhante ao controle. A atividade da CAT (Figura 14B) aumentou a partir do terceiro tratamento até o quinto, diminuindo nos tratamentos posteriores, atingindo no oitavo tratamento valores inferiores ao controle. Cabe ressaltar que o incremento na atividade desta enzima foi grande, chegando a valores três vezes maiores que os iniciais, no quinto tratamento (Figura 14B). Em relação à atividade da APX, houve aumento linear desde a coleta dos explantes (tratamento um) até a quinta avaliação, na qual a atividade foi quatro vezes superiores ao controle (Figura 14C). A partir daí os valores diminuíram, alcançando no último tratamento valor similar ao controle. Os níveis de

H_2O_2 aumentaram nos tratamentos 4, 5 e seis, sendo que a partir daí voltaram a ficar semelhantes ao controle. A diferença em relação ao controle do tratamento com maior atividade foi de 11,51% (Figura 14D).

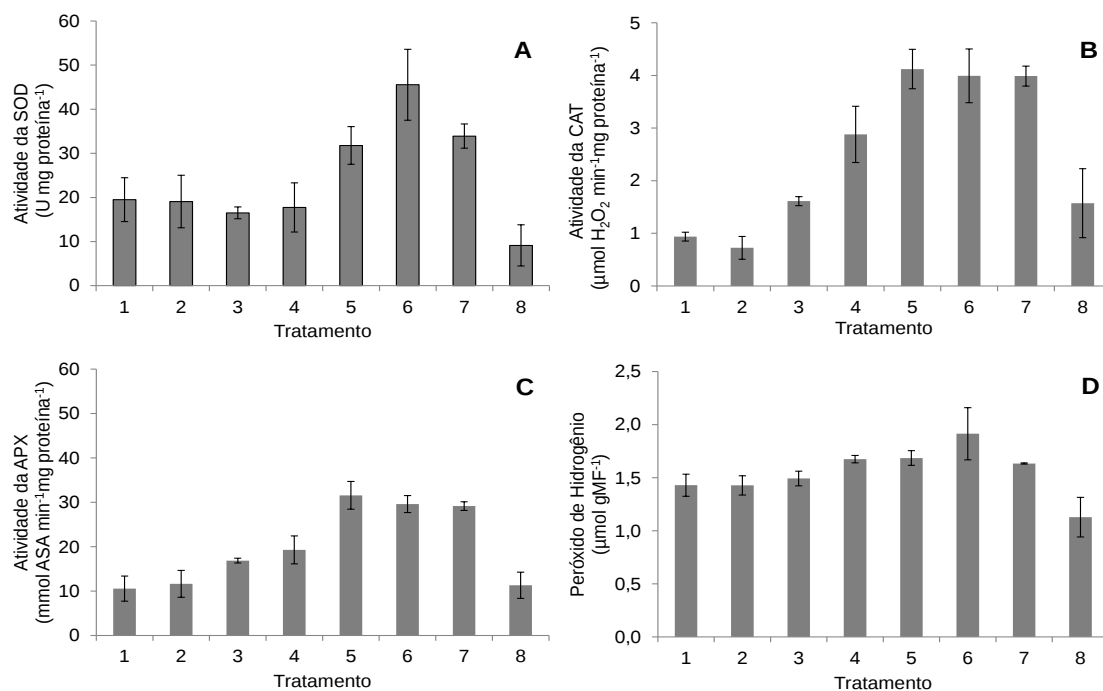


Figura 13. Atividades das enzimas SOD (A), CAT (B) e APX (C) e concentrações de peróxido de hidrogênio (D) em explantes de bambu-da-sorte cultivados no escuro. 1- controle, brotos logo depois de retirados da planta; 2- lavagem com álcool 70%; 3- desinfestação com hipoclorito de sódio a 2% por 15 minutos; 4- lavagem com água por 5 minutos; 5- cinco dias após a inoculação em meio de multiplicação; 6- dez dias, após inoculação; 7- quinze dias após inoculação; 8- vinte dias após a inoculação. UFPEl, 2014.

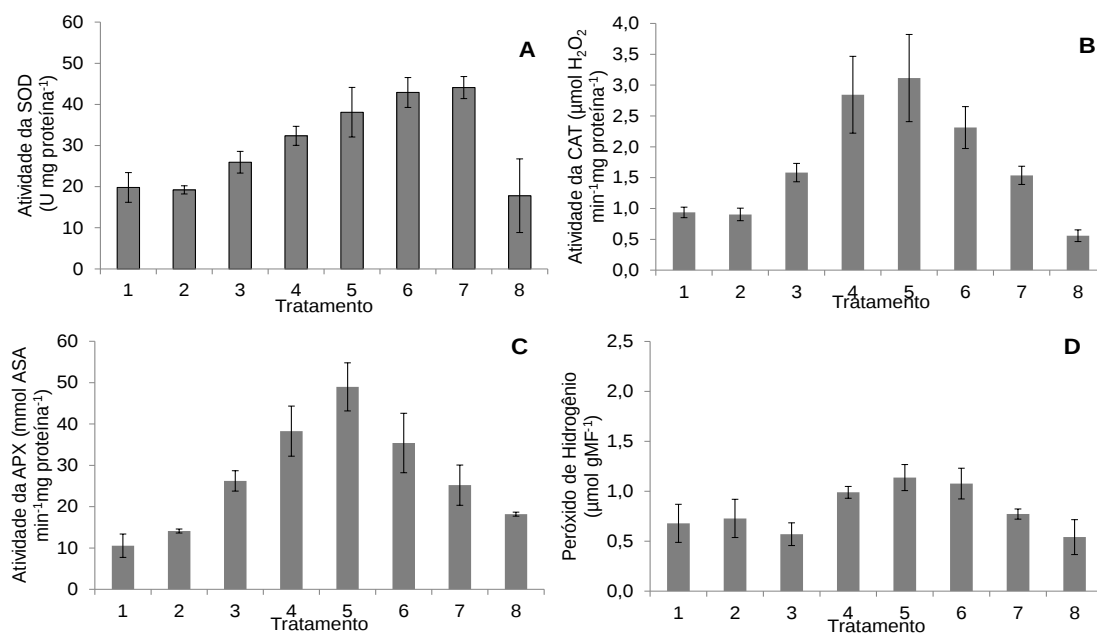


Figura 14. Atividades das enzimas SOD (A), CAT (B) e APX (C) e concentrações de peróxido de hidrogênio (D) em explantes de bambu-da-sorta cultivados na luz. 1- controle, brotos logo depois de retirados da planta; 2- lavagem com álcool 70%; 3- desinfestação com hipoclorito de sódio a 2% por 15 minutos; 4- lavagem com água por 5 minutos; 5- cinco dias após a inoculação em meio de multiplicação; 6- dez dias, após inoculação; 7- quinze dias após inoculação; 8- vinte dias após a inoculação. UFPel, 2014.

4. DISCUSSÃO

4.1 Estabelecimento e indução de gemas

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, observou-se uma grande dificuldade em se obter órgãos ou tecidos de bambu, livres de agentes contaminantes. Para todos os explantes utilizados, as taxas de contaminação foram elevadas, tanto com o uso de hipoclorito de sódio, quanto de cloreto de mercúrio, independente das concentrações empregadas. Somente nos tratamentos T3 e T4, a contaminação não foi total (Figura 9), sendo que o tratamento T4, com hipoclorito de sódio apresentou menores percentuais de contaminação.

A cultura de tecidos pode ser influenciada por inúmeros fatores, entre eles o mais determinante para o sucesso ou não do cultivo *in vitro* é a contaminação microbiana, sendo responsável por perdas severas em biofábricas e laboratórios de pesquisa (DONATO et al., 2005). Para isso são utilizados diversos agentes desinfestantes visando a eliminação superficial de microorganismos que possam comprometer o material vegetal a ser micropropagado. Vários autores relatam a utilização do hipoclorito de sódio e cloreto de mercúrio como agentes desinfestantes,

variando as concentrações e tempos de lavagens de acordo com a espécie (BERUTO et al.; BHATT et al., 2004; GRADAILLE et al. 2010). No presente estudo, a concentração utilizada de cloreto de mercúrio, não se mostrou mais eficiente do que o hipoclorito de sódio (Figura 4). Dessa forma, considerando estes resultados, prosseguiu-se com a utilização do hipoclorito de sódio a 2%, visto que este não gera resíduos tóxicos para descarte e não é cumulativo como o cloreto de mercúrio que é considerado um agente potencialmente tóxico por oferecer grande risco de contaminação ambiental e ao ser humano (AZEVEDO, 2003).

As altas contaminações em todos os tipos de explantes, independente das substâncias desinfestantes utilizadas, evidenciam a presença de bactérias endógenas nos tecidos e células excisadas das estacas, obtidas das plantas cultivadas em casa de vegetação, visto que a presença de contaminações por fungos foram mínimas, principalmente quando usados antibiótico nas lavagens e PPM adicionado ao meio. Assim, com estes procedimentos adotados, alguns explantes, foram estabelecidos *in vitro*, o que possibilitou o seu desenvolvimento e a formação de plantas completas (Figuras 5B e 5C). Em estudos com micropropagação de *Cordyline sp.*, Chinnu, et al. (2012) utilizaram tratamento com antibiótico e fungicida, em seguida lavagem com Cloreto de Mercúrio a 0,1%, por 5 minutos, obtendo resultados positivos no controle da contaminação. Isso justifica a associação de antibióticos e fungicidas na desinfestação, que podem promover menores perdas de material devido às contaminações por microrganismos. No entanto, tal procedimento é bastante incerto, pois normalmente após a retirada do antibiótico as bactérias passam a se desenvolver com maior intensidade infectando novamente as culturas.

Em relação aos explantes utilizados, os nós caulinares e brotos axilares foram os que apresentaram melhores resultados para o estabelecimento e indução de gemas quando cultivados em meio MS semissólido com 15 mgL^{-1} de 2iP e $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de AIA (Figura 10A e 11). Liu et al.(2010), também utilizaram segmentos nodais como explantes e obtiveram respostas positivas em seus estudos. Entre os tratamentos testados por estes autores, a utilização de alta concentração de 2iP foi o único que apresentou respostas positivas para possível multiplicação, indicando que esta citocinina seja, talvez, a mais indicada para esta espécie. As brotações laterais emitidas dos nós, quando separadas e colocadas em meio MS com 2 mgL^{-1} de 2iP e

0,5mgL⁻¹ de AIA, desenvolveram-se, formando raízes e dando origem a plantas completas após 180 dias em mesma cultura (Figuras 10B e 10C). As gemas oriundas dos brotos cresceram lentamente em 90 dias (Figura 11), sendo que aos 120 dias no mesmo meio (Figura 12), foi possível diferenciar gemas e pequenas brotações. Porém, em nenhum dos explantes houve a formação de estruturas calogênicas, o que pode estar associado ao comportamento da espécie.

Liu et al. (2010), utilizaram segmentos nodais e gemas como explantes em meio MS suplementado com as mesmas concentrações de reguladores utilizados no presente trabalho, e ao contrário dos resultados obtidos no presente estudo, conseguiram estabelecer um protocolo eficiente para indução de calos em *Dracaena surculosa* com 15 mgL⁻¹ de 2iP e 0,5 mgL⁻¹ de AIA, o que leva a crer que, para cada espécie as respostas das concentrações hormonais podem ser diferentes, e no caso de *D. sanderiana* as concentrações de hormônios utilizadas não produziram a mesma resposta que em *D. surculosa*. Para os tecidos cultivados, o requisito de hormônios exógenos depende do nível endógeno dos tecidos/células da planta, que varia de acordo com os órgãos, genótipo e a fase de crescimento da planta (CHAND; SINGH, 2004). Pode ser considerado que o 2iP, como uma citocinina de ocorrência natural, é mais eficaz do que os homólogos sintéticos, na indução da morfogênese de *D. surculosa* (LIU et al., 2010). Devido a essas evidências, pode ser que o 2iP tenha sido mais eficiente que os outros reguladores utilizados, levando assim a indução de gemas em *D. sanderiana*, considerando que foi o único tratamento que induziu alguns explantes a uma resposta de morfogênese.

Os estudos de Aslam, et al. (2013), com *D. sanderiana*, demonstraram que dentre os vários tipos de explantes utilizados, os segmentos nodais foram mais efetivos na formação de calos, com adição de 2,4-D em meio MS. Esses pesquisadores estabeleceram um protocolo de regeneração eficiente para *D. sanderiana*, o qual necessitou de 16 semanas, a partir da inoculação dos explantes no meio e início da regeneração das plantas. Porém no presente estudo, foi utilizado o mesmo protocolo, com as mesmas concentrações de 2,4-D, e não foi obtido sucesso na obtenção de calos, visto que os explantes foram perdidos nas primeiras três semanas de inoculação, por contaminação ou oxidação. Esses resultados podem estar associados ao tempo necessário para que se inicie o processo de diferenciação das células, tendo em vista que ocorreram contaminações durante as

cinco primeiras semanas em cultura e desta forma o material foi descartado, não permitindo o desenvolvimento do processo.

Sendo o bambu chinês uma planta adaptada a viver em água, diversos estudos demonstraram que os sistemas de imersão temporária também induziram o aumento de brotações *in vitro* (SAARE-SURMINSKI; PISOWOTZKI et al., 2008). Assim, foram obtidos melhores resultados, em culturas de *D. sanderiana* em meio líquido, sob agitação permanente (GRADAILLE et al., 2010). Tal resposta positiva não foi obtida no presente estudo, visto que os brotos e gemas utilizados como explantes oxidaram e houve contaminação total após 4 semanas na cultura em meio líquido sob agitação permanente. Os resultados mostraram que a dificuldade de se obter material livre de microorganismos, principalmente de bactérias endógenas é o principal obstáculo a ser superado para a micropropagação da espécie.

4.2 Análises enzimáticas e bioquímicas

A produção de mudas em escala comercial está relacionada com o sucesso da multiplicação *in vitro*, que é influenciada por diversos fatores, como a composição do meio de cultura, a utilização de reguladores de crescimento e as condições ambientais que os explantes são submetidos (SOTIROPOULOS et al., 2006). Todos esses fatores podem elevar o nível de estresse oxidativo das células, que está relacionado a uma complexa rede de sinalização metabólica, responsável pelo controle da percepção de sinais, da geração de mensageiros secundários e de sinais de transdução (SHAO et al., 2007). As reações formadoras de EROs ocorrem no metabolismo normal das plantas, a partir da fotossíntese, respiração e fotorrespiração, bem como por processos induzidos durante estresses abióticos (POLLE, 2001; MITTLER, 2002). É o caso do estabelecimento e desenvolvimento *in vitro*, onde os explantes estão sujeitos a um aumento no estresse, principalmente nas fases iniciais da cultura. No entanto, os níveis de estresse que os explantes sofrem durante o estabelecimento *in vitro*, desde o momento da sua retirada da planta matriz, desinfestação e até a sua adaptação no novo ambiente são pouco estudados. A dificuldade maior na desinfestação dos explantes é se obter explantes que não apresentem níveis de contaminação que possam levá-los a morte. A contaminação por microorganismos é um dos principais problemas para a aplicação

da micropropagação, podendo inclusive ser um fator limitante, para o estabelecimento e cultivo *in vitro* de certas espécies (RIBAS et al., 2003).

As etapas de desinfestação do material normalmente iniciam com lavagem dos explantes com o álcool, que possui ação germicida e é utilizado em concentrações de 70 a 80%, por apenas alguns segundos, pois acima dessas concentrações pode desidratar os tecidos (PASQUAL, 2001). Nos experimentos aqui realizados, o material foi imerso em álcool 70%, por um minuto, levando a crer que esse tempo não foi suficiente para que os explantes produzissem qualquer tipo de EROs em quantidades elevadas que pudessem desencadear alguma resposta de defesa, pois as atividades das enzimas antioxidantes foram baixas no segundo tratamento (Figura 13). No entanto, após a lavagem com hipoclorito de sódio 2%, houve o aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX. Essa é uma fase delicada para os explantes, pois a manipulação, a utilização dos agentes desinfestantes, pode causar o aumento do estresse oxidativo.

O hipoclorito de sódio (NaClO) é um agente antimicrobiano utilizado para a desinfestação, cuja concentração a ser utilizada vai depender da espécie e do explante. Possui atividade biocida contra bactérias, fungos e vírus, além do fato de ser um produto relativamente barato (EMMANUEL et al., 2004). Porém, pode gerar reações oxidativas, como inativação enzimática irreversível e a degradação de lipídios e ácidos graxos (ESTRELA et al., 2002), podendo causar o aumento acelerado do estresse oxidativo. Levando em conta essa afirmativa, é necessário que seja desenvolvido um protocolo seguro para o estabelecimento de cada espécie.

Existem muitos estudos, com as mais variadas espécies, sobre as enzimas do mecanismo antioxidativo *ex vitro*, como exemplo, em experimentos com diferentes concentrações de Cádmio (Cd) em *Populus canescens*, em sistema hidropônico Daí et al. (2012), verificaram que o Cádmio induziu o aumento no teor de H₂O₂, em todos os tecidos, que coincidiu com o aumento na atividade das enzimas SOD, CAT e APX, indicando que as plantas respondem ao estresse por Cd pela ativação do sistema de defesa, tanto em nível de atividade enzimática, como de transcrição das enzimas. No presente estudo, a concentração de hipoclorito de sódio utilizada, não foi tóxica para desinfestação, pois todos os explantes sobreviveram até os 20 dias, mas foi notável, que a partir da lavagem com o produto, os valores das atividades

enzimáticas aumentaram (Figura 13). A homeostase entre as atividades da SOD, APX e CAT nas células é crucial para determinar os níveis de equilíbrio dos radicais superóxido e peróxido de hidrogênio (CHAO et al., 2010). Em ambos os experimentos aqui realizados, ficou evidente que no vigésimo dia de inoculação esse equilíbrio talvez tenha sido alcançado, já que todas as atividades das enzimas avaliadas diminuíram. Desta forma, a fase de desinfestação aumenta somente momentaneamente o estresse oxidativo, e com o passar do tempo os explantes se adaptam ao meio de cultura.

As enzimas do mecanismo antioxidante podem atuar aumentando a sua atividade durante as primeiras semanas de indução de morfogênese nas culturas *in vitro*. Esse estresse pode ser induzido por concentrações mais elevadas de nutrientes e reguladores de crescimento, tornando possível a diferenciação celular e o desencadeamento do processo de embriogênese somática (PASTERNAK, 2002). Porém, em estudo realizado com bulbos de *Fritillaria meleagris in vitro*, Petric et al.(2014), observaram que a atividade das enzimas antioxidantes durante a morfogênese, não tiveram alterações significativas em relação ao uso de reguladores de crescimento, indicando que o processo de morfogênese é estritamente definido, independentemente dos reguladores de crescimento utilizados. Já Pfeiffer; Höftberge (2001) relataram que auxinas podem induzir drasticamente aumento da geração de EROs nas células dos tecidos. Mas cada espécie deve ser estudada com cautela, no momento em que se deseja estabelecer e desenvolver plantas *in vitro* com sucesso.

No presente estudo a atividade da SOD, no primeiro experimento, aumentou aos 5 dias da inoculação *in vitro* (Figura 13A), permanecendo alta até os 15 dias, indicando que nesse período houve a produção de superóxido em quantidades mais elevadas nas células dos tecidos. Petrić et al. (2014) obtiveram resultados semelhantes em seu trabalho onde a maior atividade da SOD foi observada aos sete dias de cultivo em todos os tratamentos. Kairong et al. (2002), perceberam uma correlação entre o aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio e indução de células na embriogênese somática, que ocorria concomitantemente com o aumento da atividade da SOD. Foi observado que no segundo ensaio, as concentrações de H₂O₂ foram mais baixas que no primeiro ensaio, e mesmo assim foram suficientes para ativação enzimática da CAT e APX. Isso pode ser explicado devido ao Km

(constante de Michaelis-Menten) da CAT variar de 2,4 a 225 mM, enquanto que o da APX é de 60 a 1000 μ M, sendo que o baixo K_m na reação da APX reflete uma maior afinidade desta enzima ao H_2O_2 (SINGH et al., 2008). No escuro (Figura 7B), a atividade da CAT aumentou a partir do terceiro tratamento, mantendo-se alta até o sétimo, o mesmo ocorrendo com a atividade da APX. Já, quando os mesmos foram diretamente para luz (Figura 14), as atividades enzimáticas também começaram a aumentar no terceiro tratamento, porém, as mesmas mantiveram-se altas até o sexto, diminuindo somente no último tratamento (20 dias em cultura). É importante destacar que no primeiro ensaio os níveis de H_2O_2 produzidos foram maiores que no segundo ensaio, o que pode estar relacionado à condição nutricional da planta matriz, à incidência luminosa e à temperatura, pois os ensaios foram realizados em momentos distintos, onde houve variação da temperatura ambiente. As médias de temperatura no momento das coletas do experimento um e dois foram de 25,2°C e 19,2°C respectivamente (EMBRAPA- CLIMA TEMPERADO, 2014).

Até os 15 dias *in vitro* a taxa de estresse foi alta, tanto na luz como no escuro, o que pode justificar esse período como crítico para os explantes no estabelecimento *in vitro*. A partir dos 15 dias, os tecidos provavelmente diminuiram a produção EROs, diminuindo a atividade das enzimas antioxidantes, levando a crer que a partir de 15 dias de inoculação, os explantes já começam a se adaptar ao novo ambiente. Convém salientar que as atividades das enzimas, bem como os teores de H_2O_2 foram iguais ou menores no último tratamento, ou seja, após 20 dias em cultura, quando relacionados ao primeiro tratamento (controle).

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que o procedimento de desinfestação mais promissor para *D. sanderiana* é com hipoclorito de sódio a 2% por 15 minutos e lavagens de 10 minutos com Cetazima 250 mgL^{-1} , com adição de PPM ao meio de cultura. Os explantes sobreviventes, quando inoculados em meio MS semissólido suplementado com 15 mgL^{-1} de 2ip e 0,5 mgL^{-1} AIA e posteriormente transferidos para meio com 2 mgL^{-1} de 2ip, apresentam diferenciação celular com indução de gemas e brotações axilares insipientes. Quanto às análises enzimáticas, conclui-se que após os 20 dias de inoculação, os explantes já apresentam uma adaptação ao ambiente *in vitro* independente de serem expostos à luz ou ao escuro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, J. D.; ZANANDREA, I.; DEUNER, S.; GOULART, P. F. P.; SOUZA, K. R. D. & SANTOS, M. S. Antioxidative responses and morpho-anatomical adaptations to waterlogging in *Sesbania virgata*. *Trees*, v. 27, p. 717-728, 2013.
- AMADOR, M.L.; SANCHO, S.; BIELSA, B.; GOMES-APARISI, J. & RUBIO-CUBETAS, M.J. Physiological and biochemical parameters controlling water logging stress tolerance in *Prunus* before and after drainage. *Physiologia Plantarum*, v.144, p. 357-368, 2012.
- ANONYMOUS. In: The Wealth of India: A Dictionary of Indian Raw Materials and Industrial Products, vol. VIII. Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, p. 303-305, 1986.
- APEL, K; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review*, v.55, p.373-399, 2004.
- ASLAM, J.; MUJIB, A.; SHARMA, M. P. In vitro micropropagation of *Dracaena sanderiana* Sander ex Mast: An important indoor ornamental plant. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v.20, p.63–68, 2013.
- ASLAM, J., MUJIB, A., SHARMA, M.P. Cell and tissue culture of *Dracaena sanderiana* Sander ex Mast- a review. *Hamdard Medical*, v.52, n.4, p.31- 36, 2010.
- AZEVEDO, F. A. Toxicologia do mercúrio. São Carlos, ed. RiMa, 1ª ed., 2003.
- AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Response from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation in leaves and roots of wild type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiologia Plantarum*, v. 104, p. 280-292, 1998.
- BERUTO, M., L. LANTERI, C. PORTOGALLO. Micropropagation of tree peony (*Paeoniasuf fruticosa*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.79, p. 249-255, 2004.
- BHATT, I. D.; DHAR, U. Factors controlling micropropagation of *Myrica esculenta* bunch. - Ham. Ex D Don: a high value wild edible of Kumaun Himalaya. *African Journal of Biotechnology*, v. 3, n.10, p.534-540, 2004.
- BLAZQUEZ, S.; OLMOS, E.; HERNÁNDEZ, J.A.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, N.; FERNÁNDEZ, J.A.; PIQUERAS, A. Somatic embryogenesis in saffron (*Crocus sativus*). Histological differentiation and implication of some components of the antioxidant enzymatic system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.97, n.1, p.49-57, 2009.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 48-254, 1976.

CHAND, S. & SINGH, A.J. In vitro shoot regeneration from cotyledonary node explants of a multipurpose leguminous tree, *Pterocarpus marsupium* roxb. *In Vitro Cell Dev.Biol.Plant*, v.40, p.167-170, 2004.

CHINNU, J.K.; MOKASHI, A.N.; HEGDE, R.V.; PATIL, V.S.; KOTI, R.V. *In vitro* shoot multiplication and *ex vitro* rooting of cordyline (*Cordyline* sp.). *Journal of Agricultural Science*, v.25, n.2, p. 221-223, 2012.

DAI, H.; SHAN, C.; LU, C.; JIA, G.; WEI, A.; WENQING, S.; ANG, A. Response of antioxidant enzymes in *populus × canescens* under cadmium stress. *Pakistan Journal of Botany*, v.44, n. 6, p. 1943-1949, 2012.

DAQUINTA, M.G.; RODRÍGUEZ, D.P.; MÁZ, Y.L.; TORRIJO, F.S. Propagación *in vitro* de bambu chino (*Dracaena sanderiana* L.). *Ciencia y Tecnología*, v. 3, n. 1, p. 7-13, 2010.

DEUNER, S.; ALVES, J.D.; ZANANDREA, I.; LIMA, A. A.; GOULART, P. F. P.; SILVEIRA, N. M.; HENRIQUE, P. C. & MESQUITA, A. C. Stomatal behavior and components of the antioxidative system in coffee plants under water stress. *Scientia Agricola*, v.55, n.1, p.77-85, 2011.

DONATO, V.M.T.S.; ANDRADE, A.G.; TAKAKI, G.M.C. MARIANO, R.L.R. & MACIEL, G.A. Plantas de cana-de-açúcar cultivadas in vitro com antibióticos. *Ciência e Agrotecnologia*, v.29, p.134-141, 2005.

EMBRAPA CLIMA TEMPERADO- Disponível em:
<http://www.cpact.embrapa.br/agromet/online/Current_Monitor.htm> Acesso em: 10 mai. 2014.

EMMANUEL, E., KECK, G., BLANCHARD, J., VERMANDE, P., PERRODIN, Y. Toxicological effects of disinfection using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. *Environment International*, v. 30, p. 891-900, 2004.

ESTRELA, C., ESTRELA, C. R. A., BARBIN, E. L., SPANÓ, J. C. E., MARCHESAN, M. A., PÉRCORA, J. D. Mechanism of action of Sodium Hypochlorite. *Journal of Dentistry*, v.13, n.2, p. 113-117, 2002.

GECHEV, T.S.; BREUSEGEM, F.V. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bio Essays*, v.28, p. 1091-1101, 2006.

GIANNOPOLITIS, C. N. & RIES, S. K. Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, v.59, n.2, p. 309-314, 1977.

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

GRADAILLE, M.D; RODRÍGUEZ, D.P.; MÁS, Y.L. TORRIJO, F. S. Propagación in vitro de bambú chino (*Dracaena sanderiana* L.). Ciencia y Tecnología, v.3, n.1, p.7-13, 2010.

KAIRONG, C.; JI, L.; GENGMEI, X.; JIANLONG, L.; LIHONG, W.; YAFU, W. Effect of hydrogen peroxide on synthesis of proteins during somatic embryogenesis in *Lycium barbarum*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, v.68, p. 187- 193, 2002.

LEÓN, A. M.; PALMA, J. M.; CORPAS, F. J.; GOMEZ, M.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; CHATTERJEE, D.; MATEOS, R. M.; DEL RIO, L. A.; SANDALIO, L. M. Antioxidative enzymes in cultivars of peppers plants with different sensitivity to cadmium. Plant Physiology and Biochemistry, v. 40, p. 813-820, 2002.

LIN, C. S., LIN, C. C., WEI-CHIN CHANG, W. C. Shoot regeneration, re-flowering and post flowering survival in bamboo inflorescence culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.82, p. 243–249, 2005.

LIU, J.; DENG, M.; HENNY, R.J.; CHEN, J. Regeneration of *Dracaena surculosa* Through Indirect Shoot Organogenesis. Horticultural Science, v.45, n.8, p. 1250-1254, 2010.

MEHTA, R; SHARMA, V; SOOD, A; SHARMA, M; SHARMA, R.k. Induction of somatic embryogenesis and analysis of genetic fidelity of in vitro-derived plantlets of *Bambusa nutans* Wall., using AFLP markers. . *European Journal of Forest Research*, v.130, p.729-736, 2011.

MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. Trends in Plant Science, v. 11, p. 15-19, 2006

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. Trends in Plant Science, v.9, n.10, p. 490-498, 2004.

MITTLER, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science, v. 7, n.9, p. 405-410, 2002.

MORITA, S.; TASAKA, M.; FUJISAWA, H.; USHIMARU, T.; TSUJI, H. A. cDNA encoding a rice catalase isozyme. Plant Physiology, v. 105, p. 1015-1016, 1994.

MUDOI, K. D., BORTHAKUR, M. *In vitro* micropropagation of *Bambusa balcooa* Roxb. through nodal explants from field-grown culms and scope for upscaling. *Current Science*, v.96, n.7, p. 962-966, 2009.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, n. 3, p. 473- 497, 1962.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

NDIAYE, A., DIALLO, M. S., NIANG, D., GASSAMA-DIA, Y. K. *In vitro* regeneration of adult trees of *Bambusa vulgaris*. *African Journal of Biotechnology*, v.5, n.13, p. 1245-1248, 2006.

NEGI, D., SAXENA, S. *In vitro* propagation of *Bambusa nutans* Wall. ex Munro through axillary shoot proliferation. *Plant Biotechnology*, v.5, p. 35-43, 2011.

OBERT, B.; BENSON, E.E.; MILLAN, S.; PETROVÁ, A.; BREMNER, D.H. Moderation of morphogenic and oxidative stress responses in flax *in vitro* cultures by hydroxynonenal and desferrioxamine. *Journal of Plant Physiology*, v.162, n.5, p.537-547, 2005.

PASTERNAK, T.P.; PRINSEN, E.; AYAYDIN, F.; MISKOLCZI, P.; POTTERS, G.; ASARD, H. V.; ONCKELEN, H.A.; DUDITS, D.; FEHER, A. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiology*, v.129, p.1807-1819, 2002.

PASTORI, G. M.; FOYER, C. H. Common components, networks and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiology*, v. 129, p. 460-468, 2002.

PATRO, A. Bambu-da-sorta- *Dracaena sanderiana*. Disponível em: <http://www.jardineiro.net/br/banco/dracaena_sanderiana.php> Acesso em: 18 mai. 2014.

PETRIĆ, M.; JEVREMOVIĆ, S.; TRIFUNOVIĆ, M.; TADIĆ, V.; MILOŠEVIĆ, S.; SUBOTIĆ, A. Activity of antioxidant enzymes during induction of morphogenesis of *Fritillaria meleagris* in bulb scale culture. *Turkish Journal of Biology*, v.38, p.328-338, 2014.

PFEIFFER, W.; HÖFTBERGER, M. Oxidative burst in *Chenopodium rubrum* suspension cells: Induction by auxin and osmotic changes, *Plant Physiology*, v.111, p. 144-150, 2001.

PISOWOTZKI, C.; SAARE-SURMINSKI, K.; LIEBEREJ, R. Micropropagation of *Phalaenopsis*-hybrids in Temporary Immersion System (TIS). Effect of exudated phenolic substances on plant development. *Propagation of Ornamental Plants*, v.8 n.1, p. 221-223, 2008.

POLLE, A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione pathway by metabolic modeling: computer analysis as a step towards flux analysis. *Plant Physiology*, v.126, p. 445-462, 2001.

RIBAS, L.L.; ZANETE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M. P. Estabelecimento de culturas assépticas de *Aspidos permapoli* neurin. *Revista Ciência Florestal*, v. 13, n.1, p.115-122, 2003.

SAARE-SURMINSKI, K.; PISOWOTZKI, C.; LIEBEREI, R. Shoot propagation of ornamental Gentian in a Temporary Immersion System- Effect of culture parameters on plant quality. *Propagation of Ornamental Plants*, v.8, n.4, p. 210-214, 2008.

SACANDALIOS, J. C. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant genes defenses. *Brasilian Journal of Medical and Biological Research*, v.38, n.7, p. 995-1014, 2005.

SHAO, H.B.; GUO, Q.J.; CHU, L.Y.; ZHAO, X.N.; SU, Z.L.; HU, Y.C.; CHENG, J.F. Understanding molecular mechanisms of higher plant plasticity under abiotic stress. *Science Direct*, v. 54, p. 37-45, 2007.

SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T.; TAMOI, M.; MIYAGAWA, Y.; TAKEDA, T.; YABUTA, Y.; Yoshimura, K. Regulation and Function of Ascorbate Peroxidase Isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, v.53, p.1305-1319, 2002.

SINGH, A.K.; PAKRASI, B. M.; ELVITIGALA, T.; GHOSH, B.; RAJEEV, A.; PAKRASI, H.B. A systems level analysis of the effects of light quality on the metabolism of a cyanobacterium. *Plant Physiology Preview*, n.144824. 109 p., 2009.

SINGH, S. R., SINGH, R., KALIA, S., DALAL, S., DHAWAN, A. K., KALIA, R. K. Limitations, progress and prospects of application of biotechnological tools in improvement of bamboo - a plant with extraordinary qualities. *Physiology and Molecular Biology Plants*, v.19, n.1, p. 21- 41, 2013.

SOTIROPOULOS, T. E.; FOTOPOULOS, S.; DIMASSI, K.N.; TSIRAKOGLU, V.; THERIOS, I. N. Responses of the pear rootstock to boron na salinity in vitro. *Biologia Plantarum*, v.50, n.4, p.779-781, 2006.

SUBHASHINI R.M.B.; AMARATHUNGA N.L.K.; KRISHNARAJAH S.A.; EESWARA J. P. Effect of benzyl amino purine, gibberellic acid, silver nitrate and silver thiosulphate, on postharvest longevity of cut leaves of *Dracaena*. *Ceylon Journal of Science (Biology Science)*, v. 40, n. 2, p. 157-162, 2011.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, v.151, n.1, p.59-66, 2000.

WANG, S. M.; PIAO, X.C.; PARK, S.Y.; LIAN, M.L. Improved micropropagation of *Gypsophila paniculata* with bioreactor and factors affecting ex vitro rooting in microponic system. *In Vitro Cellular & Developmental. Biololgy Plant*, v.49, p.70-78, 2013.

ZANANDREA, I.; ALVES, J.D.; DEUNER, S.; GOULART, P.F.P.; HENRIQUE, P. C & SILVEIRA, N. M. 2010. Tolerance of *Sesbania virgata* plants to flooding. *Australian Journal of Botany*, v.57, n. 8 p. 661-669, 2010

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As pesquisas com espécies de plantas ornamentais são de grande importância, levando em conta o crescimento do setor na economia, bem como pela necessidade do aumento na sanidade e qualidade das plantas. Atualmente, em função do desenvolvimento de novos processos e sistemas, o uso de biorreatores pode tornar a técnica mais barata e eficiente, possibilitando assim a diminuição dos custos de produção. No entanto, as condições para uma propagação mais eficiente, através destes equipamentos, precisam ser determinadas, visto que as exigências, tanto nutricionais como de reguladores de crescimento podem variar consideravelmente dependendo da espécie. Para a *Gypsophila paniculata* os testes preliminares realizados neste estudo, embora tenham induzido maior taxa de multiplicação, mostraram a incidência acentuada de uma anomalia fisiológica, denominada hiperidricidade. Assim, novos testes deverão ser realizados, incluindo alterações na composição do meio mineral, na concentração de reguladores de crescimento e, finalmente nos tempos de imersão das culturas no período de 24 horas. Os estudos com *Dracaena sanderiana*, demonstraram um número muito baixo de explantes estabelecidos *in vitro*, porém os que sobreviveram e se desenvolveram podem ser a base para que novos estudos sejam realizados. Considerando a dificuldade em se obter material livre de contaminações, é necessário que se adotem novas medidas para que não haja grandes perdas, como as que ocorreram no presente trabalho.

Quanto às atividades enzimáticas antioxidantes, verificou-se que os explantes se adaptam às condições *in vitro*, sendo o estresse maior durante os primeiros dias após transferência para o meio de cultivo e serem submetidos aos tratamentos de desinfestação. No entanto, as células e tecidos que compõem os explantes, nas repicagens subsequentes, podem apresentar um aumento do estresse oxidativo, mesmo que os mesmos não passem por todo o processo de desinfestação dos explantes primários. Desta maneira seria interessante acompanhar a resposta das células por um período mais longo durante o cultivo *in vitro*. De qualquer forma os estudos realizados com as duas espécies de ornamentais, trazem subsídios para que novas pesquisas sejam feitas a partir dos resultados obtidos neste trabalho.