

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA**

MAIZA DE AZEVEDO DANTAS

Aspectos fisiológicos e bioquímicos da morfogênese *in vitro* de *Dendrobium phalaenopsis* e *Cattleya labiata*

RECIFE-PE

2014

Maiza de Azevedo Dantas

Aspectos fisiológicos e bioquímicos da morfogênese *in vitro* de *Dendrobium phalaenopsis* e *Cattleya labiata*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Botânica

ORIENTADORA:

Dra. Terezinha Rangel Câmara

CO-ORIENTADORAS:

Dra. Claudia Ulisses de Carvalho Silva

Dra. Cintia Cavalcanti de Albuquerque

RECIFE-PE

2014

Ficha catalográfica

D192a Dantas, Maiza de Azevedo
Aspectos fisiológicos e bioquímicos da morfogênese *in vitro* de *Dendrobium phalaenopsis* e *Cattleya labiata*
/ Maiza de Azevedo Dantas. – Recife, 2014.
66 f. : il.

Orientadora: Terezinha Rangel Camara.
Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia,
Recife, 2014.
Inclui referências, anexo(s) e apêndice(s).

1. Micropropagação 2. *Dendrobium phalaenopsis*
3. *Cattleya labiata* 4. Superóxido dismutase 5. Ascorbato
peroxidase 6. Catalase I. Camara, Terezinha Rangel,
orientadora II. Título

CDD 581

MAIZA DE AZEVEDO DANTAS

Aspectos fisiológicos e bioquímicos da morfogênese *in vitro* de *Dendrobium phalaenopsis* e *Cattleya labiata*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica (PPGB), da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Botânica. Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Terezinha Rangel Camara
UFRPE

Examinadores:

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Membro Titular/UFRPE

Prof^a. Dr^a. Camila Souza Porto
Membro Titular/UFRPE

Prof. Dr^a. Lilia Gomes Willadino
Membro Titular/UFRPE

Data de aprovação: / / 2014

RECIFE

2014

Aos meus pais (José Alves Dantas e Iraci de Azevedo Dantas) e irmãos (Isabel, Maria de Fátima e José Alves) por todo apoio, confiança, amor e incentivo.

Ao meu esposo Eduardo Lima por seu amor, amizade, dedicação e companheirismo nas lutas diárias.

Com amor

DEDICO

“O caminho mais fácil e imediato para a felicidade é a gratidão” é o que diz o monge Beneditino David Steindl-Rast. É uma mensagem simples e poderosa que a neurociência confirma. David nos lembra de que “dar graças é parar por um instante para olhar ao redor e reconhecer as oportunidades que temos, e lembrar que, mesmo se algo dá errado, a vida nos dá a oportunidade de tentar de novo. Na pior das hipóteses, podemos ser gratos só por essa oportunidade de seguir adiante. Quando algo de bom acontece como resultado das nossas ações, ficamos orgulhosos; mas quando algo de bom acontece por ação alheia, ficamos gratos”. É com isso em mente que venho agradecer a todos os responsáveis pela minha felicidade.

Aos meus amados pais, *Dedé e Tica*, por se fazerem sempre presentes em minha vida, por me apoiarem e me incentivarem a seguir em busca da minha realização profissional e pessoal, por serem meu maior exemplo de amor e companheirismo e especialmente por me amarem de forma que nenhuma palavra possa expressar a dimensão.

A minha querida orientadora Terezinha Câmara, por todo apoio, confiança, acolhida, amizade, ensinamentos e contribuição para o meu crescimento profissional.

A minha querida co-orientadora Claudia Ulisses, por toda força, confiança, incentivo, amizade, dedicação e por me ensinar a amar e olhar para as orquídeas além da beleza.

Aos meus amados irmãos *Zé Filho e Bel* pelo carinho, incentivo e por fazerem de mim a irmã caçula protegida e amada.

A minha irmã *Fatinha (in memorian)* que me ensinou que não devemos desanimar frente às batalhas da vida e por mais que a situação não esteja ao nosso favor, nunca desistir e dar o nosso melhor em busca da realização dos nossos sonhos.

A minha linda sobrinha Stephanie por me fazer sentir a pureza do amor nos pequenos gestos e meu sobrinho Raul (que acaba de chegar ao mundo) por representar a esperança no início de um novo ciclo.

Ao meu amado esposo Eduardo, pelo amor, carinho, cuidado, proteção, por ser meu suporte emocional nessa jornada, me apoiando e me motivando e especialmente por acreditar e me fazer acreditar que tudo daria certo. Te amo e admiro demais.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco representado pela coordenadora Dra. Carmem Sílvia Zickel.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

A professora Lilia Willadino por sua contribuição nesse trabalho e pela leveza e alegria que sempre transmite.

A Kênia, secretaria do Programa de Pós-Graduação em Botânica, pelos serviços prestados, pela disponibilidade em ajudar de forma carinhosa.

A minha amiga Jéssica Marques por tão gentilmente ter me cedido a quitosana para que a realização deste trabalho fosse possível.

A minha amiga “irmã” Marília Gabriela, por sua amizade tão valiosa, pelo presente de fazer parte de sua vida, por ser minha ouvinte, conselheira e está do meu lado nos momentos de alegria e nas horas mais difíceis.

A toda a família “LCTV” (Simone, Marina, Marciana, Laís, Luciana, Gemima, Carla, Liliane, Marta, Wellington, Arquimedes, Ronaldo, Felipe, André, Claudinelly, João, Fernando, Lindomar e Marcela) por tornarem meus dias mais leves e descontraídos, pela ajuda na execução dos trabalhos, pelo conhecimento compartilhado, pela amizade e por serem tão especiais de diferentes formas.

Aos meus cunhados, Tássia e Edilson, con-cunhados, Jorge e Carol, e meus sogros Cassia e Edilson, por me acolherem tão carinhosamente como parte da família de vocês, especialmente me presenteando com sobrinhos maravilhosos (Laurinha, Dilton e Jorginho). Vocês são especiais para mim.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para que chegasse ao fim dessa jornada com êxito, **MUITO OBRIGADA!**

“Tente uma, duas, três vezes e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar aonde a maioria não chega, faça o que a maioria não faz”.

Bill Gates

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. Mercado Mundial de Flores	18
2.2. Família Orchidaceae	19
2.3. Gênero <i>Dendrobium</i>	20
2.4. Gênero <i>Cattleya</i>	20
2.5. Cultura de Tecidos Vegetais	21
2.6. Micropropagação no contexto comercial	22
2.7. Quitosana	23
2.8. Espécies reativas de oxigênio e sistema antioxidativo	25
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

Manuscrito – A ser enviado para a Revista Plant Cell, Tissue and Organ Culture

Promoção de crescimento e ação antioxidativa da quitosana no cultivo <i>in vitro</i> de <i>Dendrobium phalaenopsis</i> e <i>Cattleya labiata</i>	34
RESUMO	35
INTRODUÇÃO	36
MATERIAL E MÉTODOS	37
Local de realização das atividades	37
Material vegetal e condições de cultivo	37
Quitosana	38
Avaliações biométricas	38
Determinações enzimáticas	38
Delineamento experimental e estatística	39
RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
Avaliações biométricas	39
Determinações enzimáticas	47

SUMÁRIO (Cont.)

CONCLUSÕES.....	50
AGRADECIMENTOS.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXOS	55

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Promoção de crescimento e ação antioxidativa da quitosana no cultivo *in vitro* de *Dendrobium phalaenopsis* e *Cattleya labiata*

Tabela 1. Médias do número de brotos (NB), peso fresco (PF) e número de raízes (NR) em função do estado físico do meio (líquido e sólido) em *Dendrobium phalaenopsis* e *Cattleya labiata*..... 40

Tabela 2. Médias do número de brotos (NB), peso fresco (PF) e número de raízes (NR), em função das concentrações de quitosana (0, 15 e 20 mg.L⁻¹), em meio sólido, para *Dendrobium phalaenopsis* e *Cattleya labiata*. 41

Tabela 3. Médias do número de brotos (NB), peso fresco (PF) e número de raízes, em função das concentrações de quitosana (0, 15 e 20 mg.L⁻¹) em meio líquido para *Dendrobium phalaenopsis* e *Cattleya labiata*. 41

Tabela 4. Médias da atividade enzimática da SOD (U SOD mg⁻¹ proteína), APX (μmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína) e CAT (μmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína) para *Dendrobium phalaenopsis* em função do estado físico do meio (sólido e líquido) e concentrações de quitosana (0, 15 e 20,0 mg.L⁻¹). 48

Tabela 5. Médias da atividade enzimática da SOD (U SOD mg⁻¹ proteína), APX (μmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína) e CAT (μmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína) para *Cattleya labiata* em função do estado físico do meio (sólido e líquido) e concentrações de quitosana (0, 15 e 20,0 mg.L⁻¹)... 49

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Híbrido de <i>Dendrobium phalaenopsis</i>	20
Figura 2. <i>Cattleya labiata</i> (LUIZ, 2009)	21
Figura 3. Estruturas moleculares da quitina e da quitosana (DAMIAN et al., 2005).....	25

MANUSCRITO

Promoção de crescimento e ação antioxidativa da quitosana no cultivo *in vitro* de *Dendrobium phalaenopsis* e *Cattleya labiata*

Figura 1. <i>Dendrobium phalaenopsis</i> em meio sólido; (A, B e C) tratamento controle, meio MS sem quitosana; (D, E e F) tratamento com 15 mg.L ⁻¹ de quitosana; (G, H e I) tratamento com 20 mg.L ⁻¹ de quitosana	43
Figura 2. <i>Dendrobium phalaenopsis</i> em meio líquido; (A, B e C) tratamento controle, meio MS sem quitosana; (D, E e F) tratamento com 15 mg.L ⁻¹ de quitosana; (G, H e I) tratamento com 20 mg.L ⁻¹ de quitosana	43
Figura 3. <i>Cattleya labiata</i> em meio sólido; (A, B e C) tratamento controle, meio MS sem quitosana; (D, E e F) tratamento com 15 mg.L ⁻¹ de quitosana; (G, H e I) tratamento com 20 mg.L ⁻¹ de quitosana	44
Figura 4. <i>Cattleya labiata</i> em meio líquido; (A, B e C) tratamento controle, meio MS sem quitosana; (D, E e F) tratamento com 15 mg.L ⁻¹ de quitosana; (G, H e I) tratamento com 20 mg.L ⁻¹ de quitosana	44

Figura 5. Brotações em função do tempo de cultivo nos tratamentos controle (sem quitosana) e nas concentrações de 15 e 20 mg.L⁻¹ de quitosana nas espécies *D. phalaenopsis*, no meio líquido (A) e sólido (B), e *C. labiata*, em meio líquido (C)..... 46

RESUMO

As orquídeas destacam-se entre as ornamentais tropicais, devido à beleza exótica das flores, exuberância de cores e formas. Em virtude da alta demanda do mercado, depredação do habitat, baixa taxa de germinação das sementes em ambiente natural e o lento crescimento, a cultura de tecidos vem se apresentando como uma importante ferramenta para a produção de mudas de orquídeas em larga escala, em período reduzido de tempo e com maior qualidade das mudas em relação aos métodos convencionais. O polissacarídeo quitosana tem sido testado como aditivo no meio de cultura de algumas espécies por se destacar como promotor de crescimento e por sua ação como antioxidante. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência da suplementação de quitosana ao meio nutritivo no cultivo *in vitro* de *Dendrobium phalaenopsis* e *Cattleya labiata*, em meio líquido e sólido. Brotações provenientes de mudas *in vitro* de ambas as espécies foram inoculadas em frascos com 30 ml de meio MS com metade da força iônica. O experimento constou da combinação de três concentrações de quitosana (0, 15 e 20 mg L⁻¹ de quitosana) em meio nutritivo em estado sólido e líquido. Cada tratamento contou com quatro repetições, cada uma com duas plantas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial de 3x2 (concentrações de quitosana x estado físico do meio). Aos 50 dias avaliaram-se o peso fresco total, número de brotos e de raízes, e foram determinadas as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT). No cultivo em meio líquido, *D. phalaenopsis* apresentou maior peso fresco no tratamento com 20 mg.L⁻¹ de quitosana, enquanto o maior número de brotos foi observado em ambos os meios, nessa mesma concentração. *C. labiata* também exibiu maior peso fresco e número de brotos em meio líquido, porém na concentração de 15 mg.L⁻¹ de quitosana. O meio sólido favoreceu a emissão de raízes das duas espécies, mas inibiu a formação de brotos de *C. labiata*, independente das doses de quitosana. O melhor desenvolvimento das mudas das duas espécies em meio líquido coincidiu com aumento da atividade de SOD diretamente proporcional ao da concentração de quitosana. Essa ativação da SOD não foi acompanhada pelo aumento na atividade da APX nem da CAT, evidenciando a ação da quitosana na dismutação do superóxido sem formação de peróxido de hidrogênio. Em meio sólido, a ação da quitosana no mecanismo antioxidativo se deu pela ativação da APX e CAT. Constatou-se a prevalência do meio líquido para a micropropagação das espécies estudadas e confirmou-se a ação combinada da quitosana no controle dos níveis de espécies reativas de oxigênio, em ação conjunta com o sistema enzimático antioxidativo.

Palavras-chave: Micropropagação, orquídeas, superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, catalase, meio líquido.

ABSTRACT

Orchids stand out among the ornamental tropical due to the exotic beauty of flowers, exuberant colors and shapes. Due to the high market demand, depredation of habitat, low rate of seed germination in natural environment and slow growth, tissue culture has been presented as an important tool for the production of seedlings of orchids on a large scale, in a reduced period of time and with greater seedling quality over conventional methods. The polysaccharide chitosan has been tested as an additive in the culture medium of some species as it stand out as a growth promoter and by acting as an antioxidant. This study aimed to evaluate the influence of dietary supplementation of chitosan to the nutrient medium *in vitro* cultivation of *Dendrobium Phalaenopsis* and *Cattleya labiata* in liquid and solid medium. Shoots from *in vitro* seedlings of both species were inoculated into vials containing 30 ml of MS medium with half the ionic strength. The experiment consisted of the combination of three chitosan concentrations (0, 15 and 20 mg.L⁻¹) with nutrient medium in solid and liquid state. Each treatment had four replicates, each with two plants. The experimental design was completely randomized with a factorial scheme of 3x2 (chitosan concentration x physical state of the medium). For 50 days were evaluated the total fresh weight, number of shoots and roots, and were determined activities of superoxide dismutase enzyme (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT). In cultivation in liquid medium, *D. phalaenopsis* fresh weight showed higher treatment with 20 mg.L⁻¹ of chitosan as the highest number of shoots was observed in both media, at the same concentration. *C. labiata* also exhibited higher fresh weight and number of shoots in liquid medium, but at the concentration of 15 mg.L⁻¹ of chitosan. The solid medium favored the emission of roots in both species, but inhibited the formation of shoots of *C. labiata* regardless of the chitosan concentration. The best development of seedlings of both species in liquid medium coincided with increased activity of SOD directly proportional to the chitosan. This activation of SOD was not accompanied by an increase in the activity of APX or CAT, showing the action of chitosan in the dismutation of superoxide without forming hydrogen peroxide. On solid medium, the action of chitosan on the antioxidative mechanism is also provided by the activation of the APX and CAT. Verified the prevalence of the liquid medium for micropropagation of the species studied and confirmed the combination of chitosan in controlling levels of reactive oxygen species in joint action with the antioxidant enzyme system action.

Key-words: Micropropagation, orchids, superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, catalase, liquid medium.

1. INTRODUÇÃO

A floricultura brasileira é hoje uma atividade econômica importante no agronegócio do País. O potencial da atividade, voltada tanto para o mercado interno como externo, é considerável e oferece oportunidades promissoras. No entanto, com exceção de algumas culturas como rosas e crisântemos, a produção comercial de flores no Brasil ainda pode ser considerada amadora se comparada a países como Holanda, Estados Unidos e outros. Isso se deve, em sua maior parte, pela falta de tradição no cultivo de espécies com fins ornamentais, falta de investimentos e dedicação a pesquisas aplicadas na área (REIS, 2011).

O mercado de orquídeas tem aumentado progressivamente, devido à beleza, exotismo e fragrância de suas flores (NEVES, 2011). Seu cultivo movimenta um mercado de números expressivos (SEIDEL, 2004). Os gêneros de maior destaque econômico mundial são *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Miltoniopsis*, *Phalaenopsis* e *Zygopetalum*, os quais contribuem significativamente na economia dos países asiáticos (LOPEZ; RUNKLE, 2005).

O cultivo de orquídeas é um negócio que tem se consolidado como importante atividade econômica no Brasil (REIS, 2011), uma vez que as condições ambientais brasileiras são favoráveis ao desenvolvimento da orquidofilia, devido à posição geográfica privilegiada (STANCATO et al., 2001).

No Brasil ocorrem cerca de 200 gêneros e 2.500 espécies de orquídeas (SOUZA; LORENZI, 2005). O comércio de orquídeas nativas, entretanto, tem como prática a exploração predatória (extrativismo). As espécies nativas são alvo de colecionadores e comerciantes, que as coletam até mesmo em área de reserva (NEVES, 2011). Aliado à degradação ou destruição do hábitat, à baixa germinação das sementes e ao lento crescimento, muitas espécies de orquídeas estão correndo risco de extinção (SHEEHAN, 1992; MOREIRA; TOMBA; ZONETTI, 2007; ARRUDA et al. 2010)

As orquídeas podem ser facilmente reproduzidas artificialmente em laboratório, a partir de sementes, por meio de técnicas de micropropagação, geralmente atingindo a maturidade em dois a quatro anos. Espécies raras e ameaçadas vêm sendo reproduzidas com sucesso por alguns estabelecimentos (BELO, 2007). A micropropagação de orquídeas sempre exige um ajuste da técnica em função das peculiaridades de cada espécie e/ou híbrido existente (STANCATO et al., 2001). Diversas formulações de meios básicos, assim como diferentes concentrações e/ou combinações de fitorreguladores, fungicidas e antibióticos têm sido utilizadas nos meios de cultura (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990). Diversos tipos

de compostos aditivos ao meio de cultivo, como água de coco (NGE et al, 2006), extrato de malte (CALDAS, 1998), extrato de tomate (BRAHM et al., 2006), entre outros, têm sido testados visando adequá-los às necessidades de cada espécie vegetal para seu cultivo *in vitro*.

A quitosana, um biopolímero obtido pela desacetilação alcalina parcial da quitina, o principal componente do exoesqueleto de crustáceos e outros artrópodes (MALERBA; CROSTI; CERANA, 2012), vem se destacando como aditivo na cultura de tecidos de plantas que crescem e se multiplicam lentamente, como orquídeas, atuando como promotor de crescimento (NGE et al, 2006). A diferença no grau de desacetilação da quitosana e as concentrações têm efeitos sobre o crescimento e desenvolvimento das orquídeas cultivadas *in vitro* (UTHAIRATANAKIJ; SILVA; OBSUWAN, 2007).

Nos últimos anos, muita atenção tem sido dedicada à atuação da quitosana como um elicitador de respostas de defesa em plantas, que incluem a captação de Ca^{2+} citosólico, ativação de MAP quinases, explosão oxidativa, resposta de hipersensibilidade, síntese de ácido abscísico, jasmonato, fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (IRITI; FAORO, 2009; MALERBA; CROSTI; CERANA, 2012). Além disso, sua capacidade como molécula antioxidante tem sido descrita por vários mecanismos (PARKER; JE; KIM, 2004), os quais podem ser atribuídos à sua estrutura, que apresenta um grande número de grupos hidroxila e amino disponíveis para reagir com espécies reativas de oxigênio (Reactive Oxygen Species – ROS, em inglês) (FENG et al, 2009).

O presente trabalho objetivou analisar o efeito da quitosana no crescimento e desenvolvimento *in vitro* de plantas das espécies *Dendrobium phalaenopsis* e *Cattleya labiata*, assim como sua ação antioxidante, em duas condições de cultivo, meio líquido e sólido, e assim subsidiar o estabelecimento de protocolos de micropropagação mais eficientes para espécies da família Orchidaceae.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Mercado mundial de flores

O mercado mundial de flores vem apresentando crescimento significativo desde a década de 90, tornando-se um segmento econômico de grande importância no agronegócio global. Esse considerável aumento se deve principalmente à comercialização de espécies de origem tropical (LOGES et al, 2003). O mercado nacional de plantas ornamentais tem apresentado um aumento crescente, tanto no montante financeiro movimentado, quanto no volume de plantas comercializadas. No Brasil a produção de flores tropicais tem crescido significativamente, especialmente na região Nordeste. Nesta região, pequenos e médios produtores possuem vantagens competitivas devido às condições ambientais ideais para o cultivo das espécies mais atrativas no mercado (RODRIGUES, 2005).

No período de 2000 a 2008 o País viveu um processo ininterrupto de obtenção de recordes sucessivos nos embarques de flores e plantas para o exterior, tendo elevado seus resultados de US\$ 11,97 milhões, em 2000, para 35,5 milhões, em 2008. Porém, a partir do final de 2008, com a deflagração e posterior acirramento da crise econômica internacional, os resultados anuais não puderam se sustentar nos patamares conquistados e os valores exportados iniciaram uma trajetória descendente que se prolonga até os dias atuais (JUNQUEIRA; PEETZ, 2013). Em 2012, os resultados das exportações brasileiras de flores e plantas ornamentais confirmaram o ciclo de retração recentemente experimentado pela floricultura nacional, decaindo 7,76% em relação ao total vendido ao exterior em 2011 e exibindo fechamento no valor global de US\$ 26,01 milhões. Apesar dessa queda na exportação, as mudas de plantas ornamentais em 2012 somaram vendas externas de US\$ 8,801 milhões, com um crescimento de 0,36% em relação a 2011 (US\$ 8,769 milhões) (JUNQUEIRA; PEETZ, 2013).

O Estado de Pernambuco, por exemplo, tem se destacado como principal produtor nacional de flores tropicais e o quinto de flores de clima temperado. Possui cerca de 200 produtores, que exploram 125 hectares, sendo 70 hectares de flores tropicais e 55 hectares de flores de clima temperado (BATALHA; BUAINAIN, 2007).

Dentre as plantas ornamentais tropicais, as orquídeas se destacam devido à beleza exótica das suas flores e importância econômica. O cultivo de orquídeas é um negócio que tem se consolidado como importante atividade econômica no Brasil. O grande mercado consumidor e produtor é São Paulo, seguido do Rio de Janeiro (REIS, 2011).

As orquídeas são comercializadas em vasos ou como flor de corte. Os países que mais se destacam na produção em alta escala de orquídeas são a China, Alemanha, Japão, Holanda, Taiwan, Tailândia e Estados Unidos. Os gêneros de maior destaque econômico mundial são *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Miltoniopsis*, *Phalaenopsis* e *Zygopetalum*, os quais contribuem significativamente na economia dos países asiáticos (LOPEZ; RUNKLE, 2005). Os Estados Unidos se destacam como maior importador de orquídeas dos gêneros *Cattleya* e *Phalaenopsis* (GRIESBACH, 2002).

2.2 Família Orchidaceae

A família Orchidaceae está subdividida em mais de 1.800 gêneros e o número aproximado de espécies é de 35.000, excluindo os híbridos artificiais (WATANABE, 2002), sendo a maior família das Angiospermas e considerada por muitos botânicos como a mais evoluída das Liliopsidas (RAVEN et al., 2007).

Geograficamente, sua distribuição é cosmopolita (FELIX; CARVALHO, 2002), apresentando indivíduos de hábitos terrestres, epífitos, rupícolas (DELAUNAY-CARPETA, 1996), saprofíticos (ARDITTI, 1967) e subterrâneos (RAVEN et al., 2007). A ocorrência das orquídeas é maior nas áreas tropicais, onde muitas de suas espécies são epífitas (BRAGA, 1987), sem, no entanto, manter qualquer relação de parasitismo com o seu hospedeiro (ARDITTI, 1967). As orquídeas, além de serem essencialmente tropicais, também já foram encontradas em regiões temperadas e até mesmo alguns exemplares em regiões boreais (TOMBOLATO; COSTA, 1998).

No Brasil ocorrem cerca de 200 gêneros e 2.500 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005), pois as condições ambientais brasileiras são favoráveis ao desenvolvimento das espécies devido, principalmente, à posição geográfica privilegiada (STANCATO et al., 2001). Além disso, a coincidência climática de alguns países asiáticos com o Brasil permite o cultivo de espécies comerciais e ornamentais que tem origem na Ásia, como exemplo, pode-se citar os gêneros *Cymbidium*, *Dendrobium* e *Phalaenopsis*, atualmente cultivados em grande parte do mundo, com grande aceitação comercial, não apenas pela beleza que cerca suas flores, mas também pela sua fácil hibridação e reprodução, diversidade de cores e durabilidade das flores, possibilitando a comercialização e o transporte a longas distâncias (CARDOSO, 2007). Para o cultivo, como flor de corte, o gênero *Cattleya* é o mais importante, sendo considerado por Arditti e Ernst (1992) sinônimo de orquídea e, por Menezes (1987), a rainha das orquídeas, notadamente pela exuberância e tamanho de flor.

2.2.1 Gênero *Dendrobium*

As orquídeas do gênero *Dendrobium* são originárias da Índia, podendo ser encontradas na Ásia tropical e subtropical, prolongando-se para leste até as ilhas Fiji e sul da Austrália (SUTTLEWORTH; HEBERT; GORDON, 1994). Compreende mais de 1500 espécies, sendo um gênero complexo e amplo. Swartz em 1800 fez a primeira descrição do gênero (SHEEHAN; SHEEHAN, 1994). O florescimento ocorre geralmente na primavera, muitas delas necessitando de baixas temperaturas, no mínimo 10°C durante uma semana, para a indução do florescimento (SUTTLEWORTH et al., 1994). A espécie *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg. (Figura 1) normalmente apresenta flores largas, com labelo pontiagudo, pseudobulbos e folhas verde escuras. Podem ser epífitas ou litófitas, necessitam de umidade, alta luminosidade e boa drenagem ao redor das raízes para um bom desenvolvimento (SCHELPE; STEWART, 1990).

O interesse por esse gênero é devido à sua larga distribuição geográfica, crescimento em diferentes habitats e, principalmente, ao grande valor florístico de seus híbridos (JONES et al., 1998).

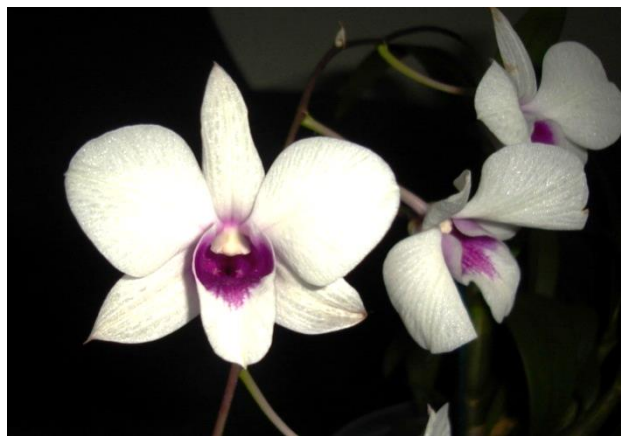


Figura 1: Híbrido de *Dendrobium phalaenopsis*.

2.2.2 Gênero *Cattleya*

Este gênero é originário das densas florestas da Bacia Amazônica e litoral do Brasil, principalmente Mata Atlântica, sendo ainda originário das encostas florestadas da Costa Rica e outros países da América Central, contemplando, aproximadamente, 70 espécies, todas epífitas, com proeminentes pseudobulbos, cujos tamanhos variam de 10 cm a 1,3 m. As flores são geralmente grandes, com a terceira pétala transformada em labelo, quase sempre com os bordos franjados. A parte basal, ligada ao resto da flor, normalmente é tubular, envolvendo a

coluna (BLACK, 1973). Seu florescimento ocorre normalmente no outono (VIEIRA, 2009). Entre as espécies, destaca-se a *Cattleya labiata* (Figura 2), nativa do Nordeste brasileiro e uma das mais apreciadas orquídeas do mundo (RAPOSO, 1993). A espécie está sob forte risco de desaparecimento na natureza em um futuro próximo, sendo reconhecida como espécie em extinção (BARROS et al. 2010).

O gênero *Cattleya*, de ocorrência natural no Brasil, é bastante popular e atinge altos preços no mercado interno e externo, procurado por colecionadores, orquidófilos, decoradores de ambiente e apreciadores em geral (SOARES et al., 2011).



Figura 2: *Cattleya labiata* (LUIZ, 2009)

2.3 Cultura de tecidos vegetais

O cultivo *in vitro* de plantas, abrange um conjunto de técnicas de grande impacto na produção de mudas saudáveis e vigorosas, além de facilitar estudos de variáveis anatômicas, fisiológicas, bioquímicas e genéticas. (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Dentre as técnicas do cultivo de plantas, a micropropagação é aquela que mais tem se difundido e encontrado aplicações práticas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; LIMA; MORAES, 2006)

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

A cultura de tecidos é frequentemente utilizada para a propagação clonal em massa de híbridos e espécies de orquídeas, possibilitando a obtenção de plantas de alta qualidade fitossanitária em curto período de tempo (ARDITTI; ERNST, 1992). Experimentos realizados ao longo de anos vêm evidenciando que, dentro da família Orchidaceae, as condições de cultivo são específicas para os gêneros e algumas vezes para espécies pertencentes ao mesmo gênero (MARTINI et al., 2001).

Os meios nutritivos utilizados para cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento vegetal e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998).

O estado físico desses meios pode ser líquido ou sólido (também dito semissólido). Este último resulta da adição de agentes gelificantes, como o ágar (polissacarídeo extraído de algas marinhas) ou de outros agentes como a goma gelana (polissacarídeo proveniente de fermentação bacteriana), conhecida comercialmente como Gelrite® ou Phytigel®. A maioria das espécies é cultivada em meios com consistência gelatinosa, uma vez que facilita o posicionamento dos explantes, que são mantidos estáticos e de forma vertical dentro dos frascos (MELO, 2011), entretanto, o uso de agentes gelificantes pode limitar a condutância hidráulica e conseqüentemente a disponibilidade de solutos para o tecido (ADELBERG, 2006). Já os meios líquidos possuem a vantagem de serem preparados com maior rapidez e menor custo do que os meios sólidos, além de apresentarem maior homogeneidade (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998), ausência de impurezas do agente de solidificante e maior eficiência na transferência de plantas para aclimatização. Já se demonstrou também que o meio líquido permite um crescimento mais rápido das plantas (KÄMÄRÄINEN-KARPPINEN et al. 2010).

2.4 Micropropagação no contexto comercial

Informações sobre a indústria da micropropagação são escassas e esporádicas (CARVALHO, 2012). Os levantamentos mais recentes revelam que é comercializado aproximadamente 1,5 bilhão de mudas obtidas por essa técnica, anualmente no mundo, sendo mais da metade de orquídeas (MASTACHE, 2007; CARVALHO, 2012). O mercado da micropropagação movimenta bilhões de dólares em todo o mundo, notadamente na Alemanha, Holanda, Inglaterra, Índia, Estados Unidos, entre outros países (CID, 2010). Como em qualquer negócio dependente do mercado, a indústria da micropropagação, que já alcançou um patamar multibilionário (MEHROTRA, et al, 2007), está sujeita a flutuações

quanto ao número de empresas envolvidas na atividade, devido ao encerramento de algumas, e à criação de novos laboratórios (WINKELMANN et al., 2006). As mudas de flores e plantas ornamentais são as mais produzidas no mundo inteiro (CARVALHO, 2012).

Entre as flores e plantas ornamentais, as principais espécies micropropagadas são as orquídeas, bromélias e aráceas (CARVALHO, 2012). Nesse grupo, a aplicação da micropropagação é significativa, pela repercussão direta na economia (BOSA et al., 2003), devido principalmente ao alto valor agregado ao produto final. A propagação *in vitro* de flores e plantas ornamentais continua sendo a principal aplicação prática da cultura de tecidos de plantas e a atividade de maior importância dos laboratórios comerciais de micropropagação (CARVALHO, 2012).

As orquídeas merecem destaque, seu cultivo remonta há mais de um século e vem sendo desenvolvido e aprimorado continuamente (NGE et al., 2006; SOPALUN et al., 2010; KANANONT et al., 2010). A família Orchidaceae desperta interesse por ser uma das maiores e mais diversificadas entre as plantas superiores, bem como por seu elevado valor ornamental (KERBAUY; CHAER, 2011).

Nos últimos dois anos, os gêneros mais micropropagados têm sido *Cattleya*, *Laelia*, *Oncidium*, *Phalaenopsis* e *Dendrobium*. Comparando-se esses gêneros com aqueles mais pesquisados em cultura de tecidos de orquídeas, no Brasil, de acordo com levantamento efetuado por Carvalho et al. (2009), constata-se uma correspondência dos três primeiros (*Cattleya*, *Laelia* e *Oncidium*) como os mais empregados nos trabalhos de pesquisa, bem como os mais produzidos em escala comercial (CARVALHO, 2012).

O número de biofábricas que produzem orquídeas no Brasil aumentou em 120% nos últimos cinco anos. Além disso, quase 60% dedica-se somente à produção dessa cultura (CARVALHO, 2012).

2.5 Quitosana

A quitosana, um biopolímero do tipo polissacarídeo derivado da quitina, é um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental (AZEVEDO et al., 2007). A quitosana foi isolada em 1859 pelo aquecimento da quitina em solução concentrada de hidróxido de potássio, resultando na sua desacetilação (DAMIAN et al., 2005). A quitina tem origem a partir das paredes celulares dos fungos,

exoesqueletos de crustáceos, cutículas de insetos e algumas algas (UTHAIRATANAKIJ; SILVA; OBSUWAN, 2007).

As estruturas da quitina e da quitosana são constituídas por unidades de 2- acetamido-2-desoxi-D-glicose e 2-amino-2-desoxi-D-glicose unidas por ligações glicosídicas $\beta(1-4)$. Entretanto, os polímeros diferem quanto à proporção relativa dessas unidades e quanto à solubilidade (AZEVEDO et al., 2007). A quitosana apresenta em maior proporção, na cadeia polimérica, unidades de $\beta(1-4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glicose e um menor número de unidades de $\beta(1-4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glicose, da quitina (Figura 3). Devido à presença dos grupos amínicos, a quitosana é considerada mais versátil e solúvel na faixa específica de pH 6, em solventes como ácidos orgânicos diluídos (acético e fórmico) e ácidos inorgânicos (DAMIAN et al., 2005).

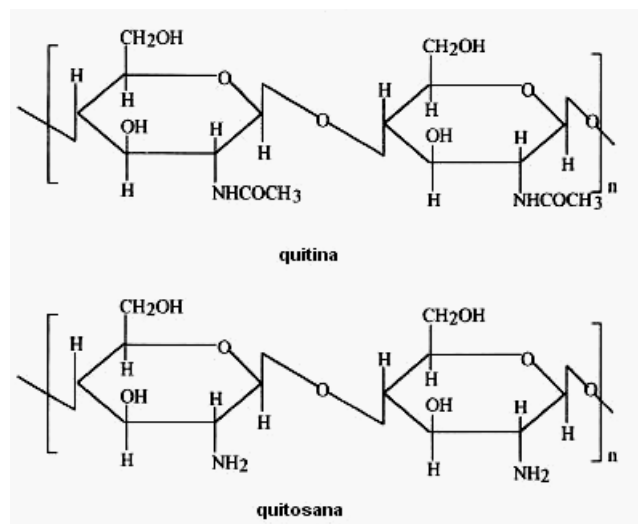


Figura 3: Estruturas moleculares da quitina e da quitosana (DAMIAN et al., 2005).

A quitosana possui propriedades que podem variar amplamente, tais como: pureza, viscosidade, grau de desacetilação, peso molecular e estrutura polimorfa devido às diversas variáveis de processamento da quitina, entre elas, temperatura, tempo de reação e composição dos reagentes (DAMIAN et al., 2005).

Diversos trabalhos tem destacado a atuação da quitosana como promotora de crescimento em plantas que crescem e se multiplicam lentamente, como as orquídeas (NGE et al., 2006; UTHAIRATANAKIJ; SILVA; OBSUWAN, 2007;) *Dendrobium phalaenopsis* (NGE et al., 2006), *Grammatophyllum speciosum* blume (SOPALUN; THAMMASIRI;

ISHIKAWA, 2010), *Dendrobium formosum* e *Dendrobium bigibbum* (KANANONT et al., 2010) e *Cymbidium insigne* (NAHAR; KAZUHIKO; HAQUE, 2012).

O grau de desacetilação (GD) é uma das características mais importantes da quitosana, pois determina o conteúdo de grupos amínicos livres no polissacarídeo diferenciando-o da quitina e influenciando principalmente a sua solubilidade (PETER, 1995). Os grupos amínicos também influenciam na capacidade antioxidante, uma vez que, de acordo com Park et al. (2004), a eliminação de radicais livres pela quitosana e seus derivados depende do seu grau de desacetilação, isto é, os grupos hidroxila e amino ativos nas cadeias poliméricas são a origem da capacidade de eliminação de radicais livres. Diversos mecanismos antioxidantes são descritos para a quitosana, como a capacidade de eliminação do radical superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) (SUN; XIE; XU, 2004) e sequestro do radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) (HARISH PRASHANTH et al 2007). Jabeen e Ahmad (2013) relatam que a quitosana pode favorecer a superação do estresse oxidativo grave através da redução da atividade de enzimas antioxidantes ao diminuir a disponibilidade de $\bullet\text{O}_2^-$. Por outro lado, há registros de aumento da atividade das enzimas antioxidativas em presença de quitosana, em plantas submetidas a estresse hídrico (YANG et al, 2009).

2.6 Espécies reativas de oxigênio e sistema antioxidativo

Durante o processo de micropropagação, as plantas ou os explantes são submetidos a condições ambientais incomuns, quando comparadas aos cultivos em casa de vegetação ou no campo (GASPAR et al., 2002). O estresse do ambiente *in vitro* apresenta-se na forma de estresse oxidativo, causado por um desequilíbrio na relação entre compostos antioxidantes e compostos pré-oxidantes que leva ao aumento do nível de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês: *reactive oxygen species*) (CASSELLS; CURY, 2001).

O aumento dos níveis intracelulares de ROS desencadeia na planta uma série de respostas metabólicas que se traduzem na ativação de mecanismos específicos de eliminação do excesso de ROS no interior das células de forma a obter um controle da sua acumulação, bem como a regulação da expressão genética para produção de metabólitos de sinalização (MARTINS; MOURATO, 2008).

As plantas desenvolveram mecanismos de defesa eficazes para combater o estresse oxidativo provocado pelo excesso de ROS. Enzimas e metabólitos antioxidantes podem ser mobilizados a fim de proteger a célula contra o excesso ou a produção inapropriada de

espécies reativas de oxigênio, formadas em decorrência de estresses e capazes de causar danos oxidativos (BULBOVAS et al., 2005).

Alguns dos mecanismos antioxidantes enzimáticos nas plantas incluem as enzimas: superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, 1.11.1.6), ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) e peroxidases (POD, EC 1.11.1.7) que participam diretamente na remoção das ROS ou que catalisam reações de formação/regeneração de moléculas para o sequestro das ROS (MARTINS; MOURATO, 2008).

A formação de ROS também traz efeitos benéficos a diversos processos metabólicos das plantas (MITTLER, 2002) sendo do interesse das células no controle rigoroso da sua concentração, sem recorrer à sua eliminação por completo (GRATÃO et al, 2005).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADELBERG, J. Agitated, thin-films of liquid media for efficient micropropagation. In: Dutta S.; Gupta, S.D.; Ibaraki (eds) **Plant tissue culture engineering**. Springer, Dordrecht, 2006. pp.101–117.
- ARDITTI, J. Factors affecting the germination of orchids seeds. **Botanica Review**, New York, v.33, n.1, p.1-97, 1967.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: J. Wiley, 1992. 682 p.
- ARRUDA, L.J.; CHEIB, A.L.; RANIERI, B.D.; NEGREIROS, D.; FERNANDES, G.W. Resgate e translocação de *Oncidium warmingii* (Orchidaceae), espécie ameaçada de extinção de campo rupestre ferruginoso. **Neotropical Biology and Conservation**, v.5, p.10-15, 2010.
- AZEVEDO, V.V.C.; CHAVES, S.A.; BEZERRA, D.C.; LIA FOOK, M.V.; COSTA, A.C.F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.2.3, p.27-34, 2007.
- BARKA, E.A.; EULLAFFROY, P.; CLEMENT, C.; VERNET, G. Chitosan improves development and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. **Plant Cell Reports**, v. 22, p. 608-614, 2004.

BARROS, F., VINHOS, F., RODRIGUES, V.T., BARBERENA, F.F.V.A., FRAGA, C.N. 2010. Orchidaceae. In: **Lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB011727>.

ATALHA, M.O.; BUAINAIN, A.M. **Cadeias produtivas de flores e mel**. Brasília: IICA: MAPA/SPA, 2007.

BELO, E. Flor & Cultura. **Barbacena on line**, Barbacena, set 2007. Disponível em: <<http://www.barbacenaonline.com.br/articuliastas/eltonbelo/130907.htm>>. Acesso em: 13 out. 2010.

BLACK, P.McK. **Orquídeas**. 1a ed. Hamlyn Publishing Group Limited. Tradução Maria Adelaide Freitas Soares. Livro Técnico S/A. Rio de Janeiro. 1973. 128p.

BOSA, N.; CALVETE, E.O.; NIENOW, A.A.; SUZIN, M. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de gipsofila. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.21, p.207-210, 2003.

BRAHM, R. Ü.; GOMES, J. C. C.; BOSENBEC-KER, V. K. Meios de cultura alternativos para o crescimento e desenvolvimento de orquídeas in vitro. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Cruz Alta, v.1, n.1, p.1.623-1.626, 2006.

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

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.) **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 1998. p.87-132.

CARDOSO, J.C. **Ácido giberélico (GA3) na indução do florescimento de orquídeas**. 2007. 50p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2007.

CARVALHO, A.C.P.P.; TOMBOLATO, A.F.C.; RODRIGUES, A. A. de J.; SANTOS, E. O.; SILVA, F. Panorama da micropropagação no Brasil com ênfase em flores e plantas ornamentais. In: JUNGHANS, T.G.; SOUZA, A.S. (Ed.). **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. p.13-42.

CARVALHO, A.C.P.P.; RODRIGUES, A.A.J.; SANTOS, E.O. Panorama da produção de mudas micropropagadas no Brasil. Fortaleza, **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2012.

CASSELLS, A.C.; CURY, R.F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 64, p.145-157, 2001.

CID, L.P.B. **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 303, 2010.

DAMIAN, C.; BEIRÃO, L.H.; FRANCISCO, A.; ESPÍRITO SANTO, M.L.P.; TEIXEIRA, E. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.16, p.195-205, 2005.

DELAUNAY-CARPETA, A.C. **Conservação de orquídeas do Sul da China através de cultura de plântulas in vitro**. 1996. 43f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Instituto Superior de Agronomia, Faculdade Técnica de Lisboa, Lisboa, 1996.

FÉLIX, L.P.; CARVALHO, R. Diversidade de orquídeas no Estado de Pernambuco. In: TABARELLI, M.; SILVA, J.M. **Diagnóstico da Biodiversidade de Pernambuco. Secretaria da Ciência e Tecnologia de Pernambuco**: Massagana, 2002. p.20-27.

GASPAR, T.; FRANCK, T.; BISBIS, B.; KEVERS, C.; JOUVE, L.; HAUSMAN, J.F.; DOMMES, J. Concepts in plant stress physiology: application to plant tissue cultures. **Plant growth regulation**, Dordrecht, v. 37, p.263-285, 2002.

GERALD, L.T.S.; LEE, L.L. Biofábrica de plantas: por que biorreator? In: GERALD, L.T.S. (Org.). **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas in vitro**. 1 ed. São Paulo: Atiqua, 2011. p.14-31.

GRATÃO, P.; POLLE, A.; PETER, L.; AZEVEDO, R. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, p.481-494, 2005.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.C. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecido de plantas**, Brasília: ABCTP, 1990. p.99-169.

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

GRIESBACH, R.J. Development of *Phalaenopsis* orchids for the mass market. In: Jainick, J.: Whipkey, A. (eds), **Trends in new Crops and New Uses**. ASHS Press, Alexandria, V.A. 2002.

HARISH PRASHANTH, K.V.; DHARMESH, S.M.; JAGANNATHA RAO, K.S.; THARANATHAN, R.N. Free radical-induced chitosan depolymerized products protect calf thymus DNA from oxidative damage. **Carbohydr Res**, v. 342, p.190–195, 2007.

IMERI, A.G.; KNORR, D. Effects of chitosan on yield and compositional data of carrot and apple juice. **Journal of Food Science**, v. 53, p.1707-1709, 1998.

IRITI, M.; FAORO, F. Chitosan as a MAMP, searching for a PRR. *Plant Signaling & Behavior*, v.4:1, p.66-68, 2009.

JABEEN, N.; AHMAD, R. The activity of antioxidant enzymes in response to salt stress in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings raised from seed treated with chitosan. **J Sci Food Agric**, v. 93, p. 1699–1705, 2013.

JONES, W.E.; KUEHNLE, A.R.; ARUMUGANATHAN, K. Nuclear DNA content of 26 orchid (Orchidaceae) genera with emphasis on *Dendrobium*. **Annals of Botany**. v.82, p.189-194, 1998.

JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M.S.; 2012: Balanço do comércio exterior da floricultura brasileira; Boletim de análise conjuntural do mercado de flores e plantas ornamentais no brasil. **Hórtica consultoria e treinamento**, p.1-7, 2013.

KERBAUY, G.B.; CHAER, L. Micropropagação comercial de orquídeas: conquistas, desafios e perspectivas. In: GERALD, L.T.S. (Org.). **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro***. 1 ed. São Paulo: Atiqua, 2011. p.178-205.

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

LIMA, J.D.; MORAES, W.S. Concentração de benzilaminopurina e avaliação de protocolo para multiplicação *in vitro* de genótipos de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 36, p. 13-19, 2006.

LOGES, V.; SOUZA, J.W.O.; PINHEIRO, P.G.L.; CASTRO, A.C.R. de; LIRA JÚNIOR, M.A. Desenvolvimento de inflorescências de *Etilingera elatior*, *Tapeinochilos ananasseeae* e *Zingiber spectabilis*. In: **Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, 14**.

- Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos**, 1. Lavras, 2003. Anais. Lavras: UFLA/FAEPE, 2003. p.395.
- LOPEZ, G.R; RUNKLE E.S. Environmental physiology of growth and flowering of orchids. **HORTSCIENCE**, v.40, p.1969–1973, 2005.
- LUIZ, J. Galeria de imagens Orquidário Cuiabá, jun. de 2009. Disponível em: <<http://www.orquidariocuiaba.com.br/galeria-imagens/escolha-a-orquidea-e-vote-na-enquete/>> Acessado em janeiro de 2014.
- KÄMÄRÄINEN-KARPPINEN, T.; VIRTANEN, E.; ROKKA, V.M.; PIRTTILA, A.M. Novel bioreactor technology for mass propagation of potato microtubers. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v.101, p.245–24, 2010.
- KANANONT, N.; PICHYANGKURA, R.; CHANPRAME, S.; CHADCHAWAN, S.; LIMPANAVECH, P. Chitosan specificity for the in vitro seed germination of two *Dendrobium* orchids (Asparagales: Orchidaceae). **Scientia Horticulturae**, v.124, p.239–247, 2010.
- MALERBA, M.; CROSTI, P.; CERANA, R. Defense/stress responses activated by chitosan in sycamore cultured cells. **Protoplasma**, v.249, p.89–98, 2012.
- MARTINI, P.C.; WILLADINO, L.; ALVES, G.D.; DONATO, V.M.T.S. Propagação de orquídeas *Gongora quinquenervis* por sementeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, p.1319-1324, 2001.
- MARTINS, L.; MOURATO, M. Alterações no metabolismo de plantas em meios contaminados por metais pesados: stresse oxidativo. **Revista Agros**, v. 8, 2008.
- MASTACHE, L.C.N. Large scale commercial micropropagation in Mexico: the experience of Agromond, S.A. de C.V. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 748, p.91-94, 2007.
- MEHROTRA, S.; GOEL, M.K.; KUKREJA, A.K.; MISHRA, B.N. Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. **African Journal of Biotechnology**. v. 6 (13):1484-1492, 2007.
- MELO, G.M. **Instabilidade fenotípica na variedade rb872552 de Cana-de-açúcar: marcadores issr e enzimas do sistema antioxidativo**. 2011. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético de Plantas) – Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2011.

- MENEZES, L.C. *Cattleya labiata* Lindley. **Orquídeas brasileiras**. 1a ed. Rio de Janeiro, Expressão e Cultura, 1987. 112 p.
- MOREIRA, B.MT; TOMBA, E.C.; ZONETTI, P.C. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea (*laelia Purpurata* lindl var venosa x *cattleya warneri* t. Moore alba) sob diferentes concentrações de sacarose e frutose. SaBios - **Rev. Saúde e Biol.**, v.2, p.16-21, 2007.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in plant Science**, v. 7, p.405-410, 2002.
- NAHAR, S.J.; KAZUHIKO, S.; HAQUE, S.M. Effect of Polysaccharides Including Elicitors on Organogenesis in Protocorm-like Body (PLB) of *Cymbidium insigne in vitro*. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v.2, p.1029-1033, 2012.
- NEVES, M.I.R.S. **Propagação in vitro de orquídeas nativas de Alagoas – Prosthechea fragrans e Maxillaria splendens**. 2011. Universidade Federal de Alagoas, Fevereiro de 2011.
- NGE, K.L.; NWE, N.; CHANDRKRACHANG, S.; STEVENS, W.F. Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. **Plant Science**, v.170, p.1185–1190, 2006.
- PARK, P.J.; JE, J.Y.; KIM, S.K. Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. **Carbohydr Polym**, v. 55, p. 17–22, 2004.
- PETER, M.G. Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. **Pure Appl. Chem.**, v.32, p.629-640, 1995.
- RAMOS, M.S.S. **A Orquídea e sua reprodução pela semente**. São Paulo. Ed. Saraiva. 1969. p.103.
- RAPOSO, J.G.C.M.F. **A etimologia a serviço dos orquidófilos**. São Paulo. Ave Maria Ltda. 1993.
- RAVEN, P.H., EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 7^a ed. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2007. 830p.
- REIS, J.N.P.; **CULTIVO DE ORQUÍDEAS: UMA OPÇÃO À AGRICULTURA FAMILIAR?**. In: **Encontro da Sociedade Brasileira de Economia Ecológica ECOECO**, 9, 2011, Brasília. Anais. Brasilia. Sociedade Brasileira de Economia Ecológica, p.4-8, 2011.

- RODRIGUES, P.H.V. *In vitro* establishment of *Heliconia rauliniana* (Heliconiaceae). **Scientia Agrícola**. v. 62, 2005. Piracicaba. Disponível em: <<http://www.periodicos.capes.gov.br/>>. Acesso em: 25 nov. 2006.
- SCHELPE, S.; STEWART, J. *Dendrobiums: an introduction to the species in cultivation*. Stour Provost: **Orchid Sundries**, 1990.
- SEIDEL, A. **Orquídeas e bromélias**. Lista de Preços. Nº 104. Disponível em: <http://seidel.com.br>, 2011.
- SHEEHAN, T.J. Orchids. In: Larson RA ed. **Introduction to floriculture**, 2a ed. Academic Press., San Diego, 1992. p.13-142.
- SHEEHAN, M.; SHEEHAN, T. **Ilustred survey of orchidg genera**. New York: Press Syndicate of University of Cambrige, 1994.
- SOARES, J.D.R.et al. Fontes de silício na micropropagação de orquídea do grupo *Cattleya*. **Acta Scientiarum: Agronomy**, Maringá, v.33, n.3, p.503-507, 2011.
- SOPALUN, K.; THAMMASIRI, K.; ISHIKAWA, K. Micropropagation of the Thai orchid *Grammatophyllum speciosum* blume. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v.101, p.143–150, 2010.
- SOUZA, V. C. LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Ed. Nova Odessa. SP. Instituto Plantarum, 2005.
- STANCATO, G.C.; BEMELMANS, P.F.; VEGRO, C.L.R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: Estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.7, p.25-33, 2001.
- SUN, T.; XIE, W.M.; XU, P.X. Superoxide anion scavenging activity of graft chitosan derivatives. **Carbohydr Polym**, v. 58, p. 379–382, 2004.
- SUTTLEWORTH, F.S.; HEBERT, S.Z.; GORDON, W.D. **Orquídeas: guia dos orquidófilos**. 5.ed. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 1994.
- TOMBOLATO, A.F.C.; COSTA, A.M.M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Boletim Técnico, Campinas, v.174, p.1-72, 1998.
- UTHAIRATANAKIJ, A.; SILVA, J.A.T.; OBSUWAN, K. Chitosan for Improving Orchid Production and Quality. **Orchid Science and Biotechnology**, v.1, p.1-5, 2007.

VIEIRA, J.G.Z.; UNEMOTO, L.K.; YAMAKAMI, J.K.; NAGASHIMA, G.T.; FARIA, R. T.; AGUIAR, R.S. Propagação *in vitro* e aclimatização de um híbrido de *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) utilizando polpa de banana e água de coco. **Científica**, Jaboticabal, v.37, n.1, p.48-52, 2009.

WATANABE, D. **Orquídeas: manual de cultivo**. 2. ed. São Paulo: AOSP. 2002. p.296.

WINKELMANN, T.; GEIER, T.; PREIL, W. Commercial *in vitro* plant production in Germany in 1985-2004. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.86, p.319-327. 2006.

YANG, F; HU, J; LI, J; WU, X; QIAN, Y. Chitosan enhances leaf membrane stability and antioxidant enzyme activities in apple seedlings under drought stress. **Plant Growth Regul**, v. 58, p. 131–136, 2009.

MANUSCRITO

Promoção de crescimento e ação antioxidativa da quitosana no cultivo *in vitro* de *Dendrobium phalaenopsis* e *Cattleya labiata*

Artigo a ser enviado ao Periódico **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**

**Promoção de crescimento e ação antioxidativa da quitosana no cultivo *in vitro* de
Dendrobium phalaenopsis e *Cattleya labiata***

Maiza de Azevedo Dantas¹; Terezinha Rangel Camara^{1*}; Claudia Ulisses¹; Cintia Cavalcanti
de Albuquerque².

1. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Botânica – Rua Dom Manoel de Medeiros, Dois Irmãos, CEP: 52171-900, Recife-PE, Brasil.

2. Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências Naturais - Rua Professor Antônio Campos, Bairro Costa e Silva, CEP: 59600-000, Mossoró-RN, Brasil.

* Autor para correspondência: Endereço de e-mail: teca.camara@gmail.com/ Tel.: +558133206364

RESUMO

A quitosana é um polissacarídeo que vem se destacando por sua ação como promotor de crescimento e antioxidante em plantas. Com o objetivo de avaliar a influência da quitosana no desenvolvimento *in vitro* de plantas de *Dendrobium phalaenopsis* e *Cattleya labiata*, brotações provenientes de mudas *in vitro* foram inoculadas em frascos com 30 ml de meio MS com metade da força iônica. O experimento constou da combinação de três concentrações de quitosana (0, 15 e 20 mg.L⁻¹ de quitosana) em meio nutritivo em estado sólido e líquido. Cada tratamento contou com quatro repetições, cada uma com duas plantas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial de 3x2 (concentrações de quitosana x estado físico do meio). Aos 50 dias avaliaram-se o peso fresco total (PF), número de brotos (NB) e de raízes (NR), e foram determinadas as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT). Em *D. phalaenopsis* a concentração de 20 mg.L⁻¹ de quitosana proporcionou maior PF e NB independente da consistência do meio, enquanto que para *C. labiata*, o maior PF e NB foram obtidos no meio líquido com 15 mg.L⁻¹ de quitosana. O meio sólido favoreceu a emissão de raízes das duas espécies, mas inibiu a formação de brotos de *C. labiata*, independente das doses de quitosana. Constatou-se a prevalência do meio líquido para a micropropagação das espécies estudadas e confirmou-se a ação combinada da quitosana no controle dos níveis de espécies reativas de oxigênio, em ação conjunta com o sistema enzimático antioxidativo.

Palavras-chave: Micropropagação, orquídeas, ascorbato peroxidase, catalase, superóxido dismutase, meio líquido.

INTRODUÇÃO

As orquídeas são plantas vasculares herbáceas e perenes, pertencentes à família Orchidaceae, provavelmente a maior Família entre as plantas superiores. Estão descritas aproximadamente 35.000 espécies distribuídas em 2.500 gêneros (Docha Neto 2005).

Devido a sua beleza, variedade de cores e formas, as orquídeas apresentam alto valor comercial, e são consideradas o mais antigo grupo cultivado entre as plantas ornamentais. Apesar de sua grande diversidade, muitas espécies se encontram ameaçadas de extinção, principalmente devido à diminuição de seu habitat natural e à coleta e comercialização indiscriminada (Moreira 2007, Arruda et al. 2010, Menini-Neto et al. 2009). Aliam-se a esses fatores o seu lento crescimento e a baixa taxa de germinação de suas sementes (Sheehan 1992).

As técnicas de cultivo de células e tecidos vegetais permitem a produção massal de grupos de plantas e podem ser aplicadas para as orquídeas (Nayak et al. 2002), sobretudo aumentando o índice de germinação *in vitro* (98 a 100 %) e acelerando o processo de crescimento e desenvolvimento, formando vitroplantas muito mais vigorosas e adaptáveis ao cultivo *ex vitro* (Martini et al. 2001).

A micropropagação de orquídeas exige um ajuste de protocolo em função das peculiaridades de cada espécie e/ou híbridos existentes (Stancato et al. 2001). Diversas formulações de meios básicos, assim como diferentes concentrações e/ou combinações de fitorreguladores, fungicidas e antibióticos têm sido utilizadas nos meios de cultura (Grattapaglia e Machado 1990), além de outros tipos de compostos aditivos como água de coco (Nge et al. 2006), extrato de banana (Stancato et al. 2008), extrato de tomate (Herrmann et al. 2011), entre outros, que têm sido testados visando atender às necessidades de cada espécie vegetal para seu cultivo *in vitro*.

O biopolímero quitosana obtido pela desacetilação alcalina parcial da quitina, o principal componente do exoesqueleto de crustáceos e outros artrópodes (Pongprayoon et al 2013), tem se destacado como aditivo na cultura de tecidos de plantas que crescem e se multiplicam lentamente, como orquídeas, atuando como promotor de crescimento (Nge et al. 2006). A diferença no grau de desacetilação da quitosana e as concentrações utilizadas têm efeitos sobre o crescimento e desenvolvimento das orquídeas cultivadas *in vitro* (Uthairatanakij et al. 2007).

A quitosana tem atraído mais atenção na última década devido aos registros de sua ação antioxidante (Park et al. 2004), como por exemplo o sequestro de espécies reativas de oxigênio (ROS) como os radicais ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila (OH^\bullet) (Harish Prashanth et al. 2007). O sequestro de radicais pela quitosana é atribuído principalmente aos seus grupos hidroxila e amina ativas abundantes, que podem reagir com as ROS e formar radicais macromoleculares estáveis e relativamente não tóxicos (Xie et al. 2001). Sun et al. (2004) relataram que a quitosana tem efeitos antioxidantes semelhantes aos da superóxido dismutase (SOD) e pode favorecer a superação do estresse oxidativo grave através da redução da atividade de enzimas antioxidantes ao diminuir a disponibilidade de O_2^- (Jabeen e Ahmad 2013). Por outro lado, há registros de aumento da atividade das enzimas antioxidativas em presença de quitosana, em plantas submetidas a estresse hídrico (Yang et al. 2009).

O presente trabalho objetivou analisar o efeito da suplementação do meio de cultura com quitosana no crescimento e desenvolvimento *in vitro* de plantas das espécies *Dendrobium phalaenopsis* e *Cattleya labiata*, assim como sua ação antioxidante, em cultivo em meio líquido e sólido, e assim estabelecer protocolos de micropropagação mais eficientes para as espécies estudadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de realização das atividades

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Campus de Dois Irmãos, em Recife, Brasil.

Material vegetal e condições de cultivo

Foram utilizadas plantas das espécies *Dendrobium phalaenopsis* e *Cattleya labiata* provenientes de semeadura *in vitro* com altura média de 1,5 cm e aproximadamente 300 dias de cultivo.

Foi utilizado o meio basal MS (Murashige e Skoog, 1962) com metade da força iônica, suplementado com sacarose (30 g.L^{-1}) e inositol ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$). Os tratamentos consistiram de meio líquido e sólido (Phytigel - $2,2 \text{ g.L}^{-1}$) com adição de 15 e 20 mg.L^{-1} de quitosana, além

de um tratamento controle com ausência de quitosana: T1 – 0,0 mg.L⁻¹ (Controle); T2 – 15,0 mg.L⁻¹ e T3- 20,0 mg.L⁻¹ de quitosana.

O pH do meio foi ajustado para 5,8 e a esterilização realizada em autoclave a $\pm 121^\circ\text{C}$ por 20 minutos. As plantas foram transferidas para frascos de vidro de 250 mL contendo 30 mL de meio e foram mantidas sob as mesmas condições em sala de crescimento com temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $42\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ durante o período de 50 dias. Os tratamentos com meio líquido permaneceram sob agitação constante em mesa agitadora com 100 ± 2 rpm.

Quitosana

A quitosana utilizada foi da Polymar LTDA., Brasil, com massa molar de $1,6\times 10^5$ g.mol (160 KDa) e grau de desacetilação de 88%. Para o preparo da solução, a quitosana em pó foi dissolvida numa solução de ácido acético a 2%, ficando sob agitação por 24 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, a solução foi filtrada em papel de filtro qualitativo para retirar o excesso de impurezas provenientes do processo de desacetilação.

Avaliações Biométricas

As variáveis biométricas avaliadas foram: número de brotos, peso fresco total (mg) e número de raízes. A cada 10 dias os experimentos foram avaliados e os dados referentes a brotações e raízes emitidas contabilizadas.

Determinações Enzimáticas

A concentração das proteínas totais foi determinada segundo o método de Bradford (1976), utilizando-se o BSA (Bovine Serum Albumin) como padrão. A reação foi realizada com adição de 100 μL de amostra a 2 mL do reagente de Bradford e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm.

As atividades das enzimas antioxidativas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) foram realizadas nas plantas inteiras coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer (-20°C) após as medidas biométricas aos 50 dias. Os ensaios foram realizados em triplicata e cada amostra constou de 0,1g de material vegetal que foi homogeneizada a frio em tampão fosfato (pH = 7.5 e 100mM) e polivinilpirrolidona, e centrifugado a $10.000 \times g$ a 4°C . As análises para SOD, APX e CAT,

seguiram as metodologias de Giannopolitis e Ries (1977), Nakano e Asada (1981) e Berris e Sizer (1952), respectivamente.

Delineamento experimental e Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x3 (2 estados físicos do meio x 3 concentrações de quitosana), com 4 repetições por tratamento. Cada repetição constou com duas plantas por frasco, totalizando 24 plantas por tratamento.

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa ASSISTAT (Silva 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliações Biométricas

Não foi observada interação positiva entre o estado físico do meio e as concentrações de quitosana em nenhuma das variáveis biométricas avaliadas em ambas as espécies. Para a espécie *D. phalaenopsis* não houve diferenças quanto ao número de brotos em decorrência do estado físico do meio, enquanto que para a espécie *C. labiata*, só foram observadas brotações no meio líquido (Tabela 1). Cada cultura, quando submetida a uma mesma composição de meio de cultura, alterando-se apenas a sua consistência física, pode apresentar comportamento completamente distinto sobre a taxa de crescimento de um explante (GEORGE, 1993). Sopalun et al (2010) trabalhando com a orquídea *Grammatophyllum speciosum* blume observaram maior percentagem de formação de protocormos (PLBs) em meio ½ MS líquido (93%) do que em meio sólido (16%). No entanto, o meio sólido foi melhor no desenvolvimento dos protocormos em brotos (73%), enquanto nenhum broto foi formado no meio líquido. Segundo Karasawa et al (2006), o estado físico do meio de cultura exerce efeito fundamental na morfogênese e no crescimento das brotações, podendo causar sérios transtornos no desenvolvimento do explante se as suas exigências básicas não forem atendidas.

O maior peso fresco das plantas *D. phalaenopsis* foi registrado no meio líquido, no entanto, não houve diferença em relação a essa variável para a *C. labiata*. O número de raízes foi maior no meio sólido em ambas as espécies (Tabela 1).

De acordo com Karasawa et al (2006) o comportamento fisiológico de estimular a produção de raízes é comum em plantas sempre que ocorre algum tipo de escassez no substrato. Os agentes gelificantes podem limitar a condutância hidráulica e, conseqüentemente, a disponibilidade de solutos para o tecido (ADELBERG, 2006). Incrementos expressivos na produção de raízes foram observados no cultivo *in vitro* de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum. cvs. Mineiro e Pioneiro) em meio nutritivo contendo Phytigel®, indicando uma possível escassez de nutrientes minerais, pois ao analisarem o aumento do número de brotações e o crescimento em altura, verificou-se crescimento constante (KARASAWA et al (2006). Comportamento semelhante foi observado na espécie *C. labiata* em meio sólido no presente estudo. Uma alternativa ao cultivo *in vitro* dessa espécie é a utilização do meio líquido para a fase de multiplicação e a adição de um agente gelificante ao meio de enraizamento, de maneira a explorar o potencial morfogênico da espécie em questão.

Tabela 1. Médias do número de brotos (NB), peso fresco (PF) e número de raízes (NR) em função do estado físico do meio (líquido e sólido) em *Dendrobium phalaenopsis* e *Cattleya labiata*.

Variáveis biométricas	<i>D. phalaenopsis</i>		<i>C. labiata</i>	
	Estado físico do Meio			
	Líquido	Sólido	Líquido	Sólido
NB	6,91 a	6,25 a	3,25 a	0,00 b
PF	0,39 a	0,30 b	0,27 a	0,27 a
NR	5,41 b	14,50 a	2,16 b	4,91 a

As médias seguidas pela mesma letra da mesma espécie nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Para a espécie *D. phalaenopsis* em meio sólido, o maior número de brotações foi observado com 20 mg.L⁻¹ de quitosana, contudo não houve diferenças significativas no peso da matéria fresca das plantas e no número de raízes entre as concentrações de quitosana avaliadas (Tabela 2). Para a *C. labiata* no meio sólido, não foram observadas brotações independentemente da dose de quitosana, enquanto o peso da matéria fresca foi maior em presença de quitosana e o número de raízes não diferiu em nenhuma das concentrações testadas (Tabela 2).

Tabela 2. Médias do número de brotos (NB), peso fresco (PF) e número de raízes (NR), em função das concentrações de quitosana (0, 15 e 20 mg.L⁻¹), em meio sólido, para *Dendrobium phalaenopsis* e *Cattleya labiata*.

Espécies	Variáveis Biométricas	Quitosana (mg.L ⁻¹)		
		0	15	20
<i>D. phalaenopsis</i>	NB	4,25 b	5,75 ab	8,75 a
	PF	0,265 a	0,228 a	0,409 a
	NR	15,25 a	11,25 a	17,00 a
<i>C. labiata</i>	NB	0,00 a	0,00 a	0,00 a
	PF	0,12 b	0,37 a	0,31 a
	NR	5,00 a	5,00 a	4,75 a

As médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No meio líquido, as plantas da espécie *D. phalaenopsis* tiveram maior número de brotações e maior peso da matéria fresca na concentração de 20 mg.L⁻¹ de quitosana. (Tabela 3). Para a espécie *C. labiata* em meio líquido, foi observado maior número de brotações nos tratamentos em presença de quitosana. Não houve diferença quanto ao peso da matéria fresca. Para ambas as espécies, em meio líquido, o número de raízes tendeu a ser maior nos tratamentos com quitosana, porém não foram observadas diferenças significativas entre as doses testadas (Tabela 3).

Tabela 3. Médias do número de brotos (NB), peso fresco (PF) e número de raízes, em função das concentrações de quitosana (0, 15 e 20 mg.L⁻¹) em meio líquido para *Dendrobium phalaenopsis* e *Cattleya labiata*.

Espécies	Variáveis Biométricas	Quitosana (mg.L ⁻¹)		
		0	15	20
<i>D. phalaenopsis</i>	NB	5,00 b	7,00 ab	8,75 a
	PF	0,259 b	0,377 ab	0,546 a
	NR	2,00 a	6,75 a	7,50 a
<i>C. labiata</i>	NB	1,25 b	4,50 a	4,00 a
	PF	0,22 a	0,33 a	0,28 a
	NR	0,75 a	2,50 a	3,25 a

As médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os resultados aqui apresentados para *Cattleya labiata* e *Dendrobium phalaenopsis* estão de acordo com outros trabalhos descritos na literatura sobre o efeito favorável da quitosana na promoção do crescimento e desenvolvimento de orquídeas (Nge et al. 2006; Sopalun et al. 2010; Kananont et al. 2010) e outras espécies de plantas (Yin et al. 2006; El-

Tanahy et al. 2012). No entanto, são poucos os trabalhos que trazem especificações da origem, peso molecular e grau de desacetilação da quitosana utilizada, o que dificulta uma comparação mais efetiva com os nossos resultados, uma vez que tais características influenciam diretamente na resposta da planta.

Os efeitos da quitosana de vários pesos moleculares e de diferentes origens no crescimento de protocormos (PLBs) de *Dendrobium phalaenopsis in vitro* foram estudados por Nge et al. (2006). Tais autores constataram que a aplicação de quitosana de camarão com peso molecular de 1 kDa (oligômero) acelerou o crescimento e o desenvolvimento do tecido meristemático da orquídea, em comparação aos tratamentos com quitosana de 10 e 100 kDa. A quitosana proveniente de fungo (10 kDa) e oligômero proveniente de camarão na concentração de 15 ppm foi a que apresentou melhor resultado em meio líquido, já em meio sólido a concentração de 20 ppm foi mais eficiente.

Para a orquídea *Grammatophyllum speciosum* blume altas taxas de crescimento de protocormos (PLBs) foram obtidas nas concentrações de 15 e 25 mg.L⁻¹ de quitosana em meio líquido e sólido, respectivamente. No entanto, não houve enraizamento em nenhuma das doses testadas (Sopalun et al. 2010). Para *Dendrobium formosum* a maior taxa de crescimento de protocormos foi obtida nas concentrações 10 e 20 mg.L⁻¹ usando um polímero de quitosana com nível de 70 % de desacetilação (Kananont et al. 2010). A aplicação foliar de diferentes doses de quitosana associada a aplicações de NPK também favoreceu o crescimento e a produtividade do feijão caupi (*Vigna unguiculata*) no campo, com os melhores resultados obtidos com a interação de quitosana a 5% com o fertilizante inorgânico NPK (El-Tanahy et al. 2012).

Na figura 1, pode-se observar na espécie *D. phalaenopsis* que o meio sólido além de favorecer a formação de raízes em relação ao meio líquido, as raízes cresceram e se desenvolveram mais, inclusive, no tratamento controle.

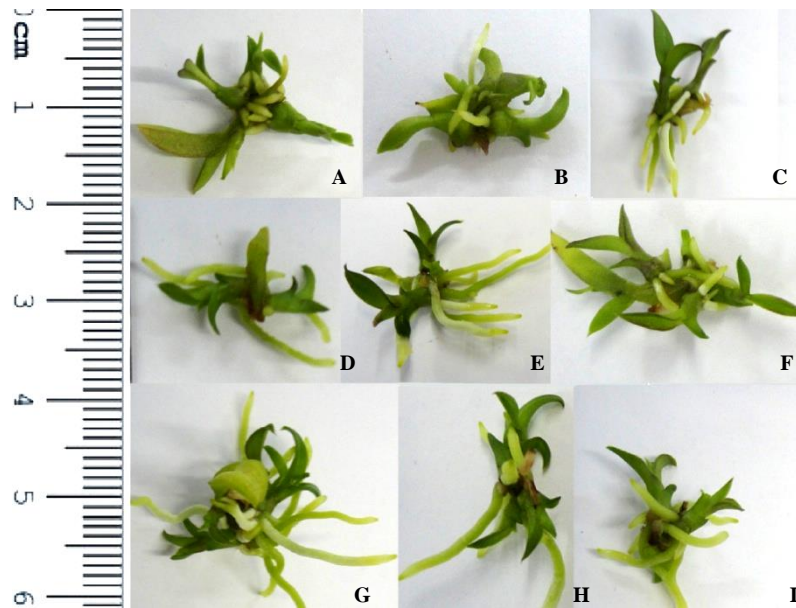


Fig 1. *Dendrobium phalaenopsis* em meio sólido; (A, B e C) tratamento controle, meio MS sem quitosana; (D, E e F) tratamento com 15 mg.L^{-1} de quitosana; (G, H e I) tratamento com 20 mg.L^{-1} de quitosana.

Na espécie *D. phalaenopsis*, em meio líquido, foi observado que além de incrementar o número de brotos em relação ao tratamento controle, observou-se um estímulo ao crescimento e desenvolvimento dos brotos, com emissão de folhas e raízes, enquanto que os brotos formados no tratamento controle apresentavam-se menores e em sua maioria em forma globular (Figura 1).

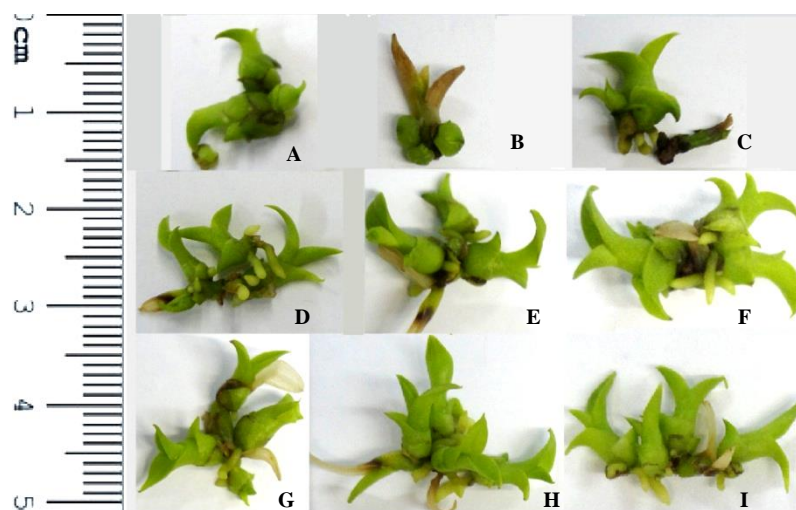


Fig 2. *Dendrobium phalaenopsis* em meio líquido; (A, B e C) tratamento controle, meios MS sem quitosana; (D, E e F) tratamento com 15 mg.L^{-1} de quitosana; (G, H e I) tratamento com 20 mg.L^{-1} de quitosana.

A espécie *C. labiata* foi a que apresentou maior diferença nas respostas em relação ao estado físico do meio. No meio sólido houve maior emissão de raízes quando comparado ao meio líquido, e foram observadas raízes maiores na presença do polissacarídeo (Figura 3 e 4).

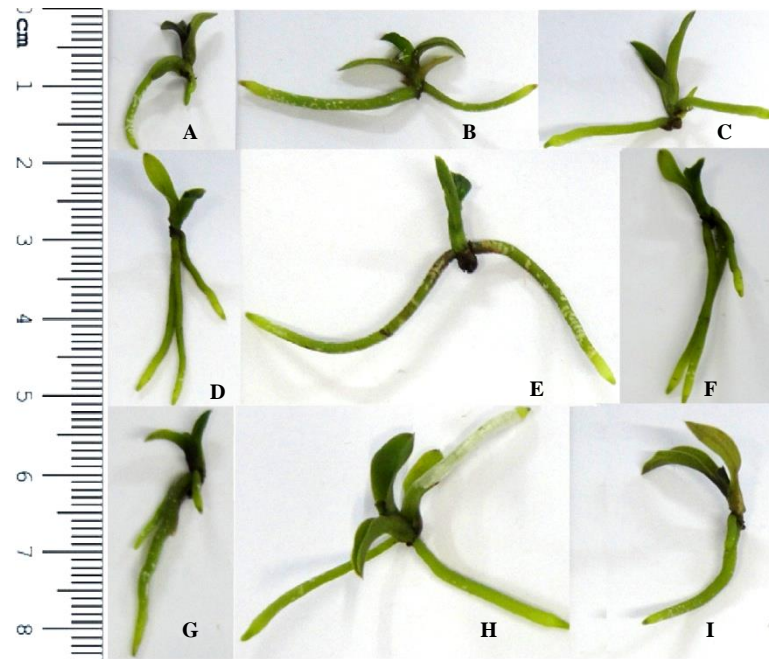


Fig 3. *Cattleya labiata* em meio sólido; (A, B e C) tratamento controle, meio MS sem quitosana; (D, E e F) tratamento com 15 mg.L^{-1} de quitosana; (G, H e I) tratamento com 20 mg.L^{-1} de quitosana.

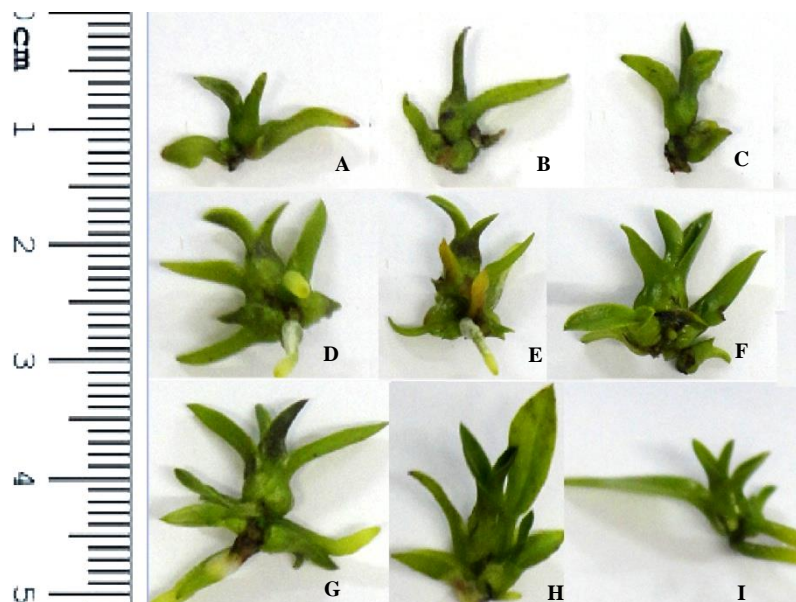


Fig 4. *Cattleya labiata* em meio líquido; (A, B e C) tratamento controle, meio MS sem quitosana; (D, E e F) tratamento com 15 mg.L^{-1} de quitosana; (G, H e I) tratamento com 20 mg.L^{-1} de quitosana.

Avaliando o comportamento das brotações ao longo do tempo de cultivo, foi observado em *D. phalaenopsis* no meio líquido, que após os 10 dias de cultivo, as emissões de brotos ocorreram proporcionalmente à dose de quitosana (Figura 5-A). Em meio sólido (Figura 5-B), após 10 dias de cultivo, as plantas do tratamento com 20 mg.L⁻¹ de quitosana passaram a emitir um número maior de brotos, seguindo uma tendência positiva até os 50 dias, enquanto o tratamento com 15 mg.L⁻¹ de quitosana cresceu igualmente ao controle até os 20 dias de cultivo, passando a emitir mais brotos após esse período. Para a espécie *C. labiata* em meio líquido, após 20 dias de cultivo, foi observado uma tendência positiva no aumento do número de brotações na concentração de 20 mg.L⁻¹ de quitosana, enquanto a concentração de 15 mg.L⁻¹ de quitosana passou a emitir mais brotos após 30 dias de cultivo (Figura 5-C).

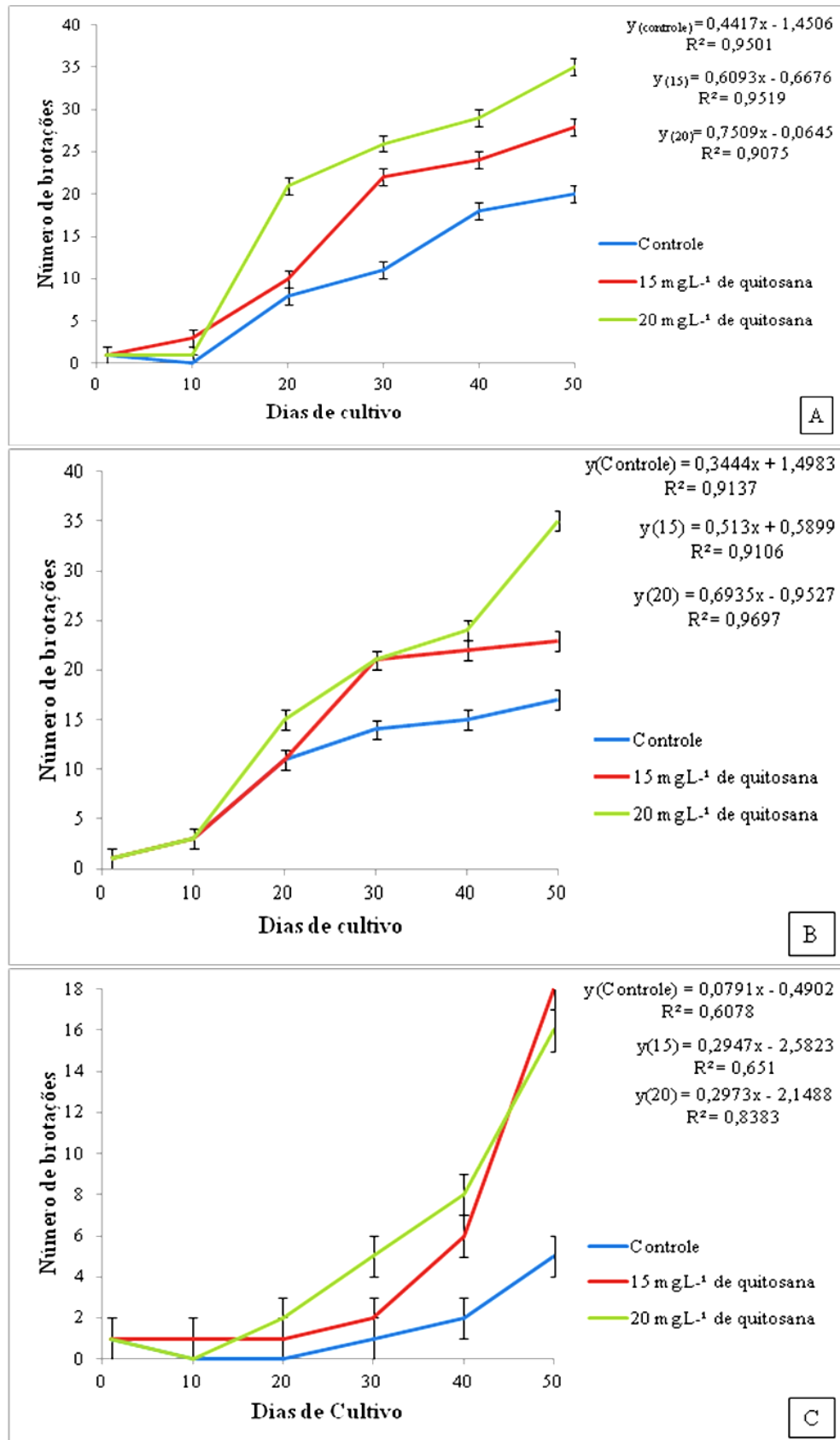


Fig 5. Brotações em função do tempo de cultivo nos tratamentos controle (sem quitosana) e nas concentrações de 15 e 20 mgL⁻¹ de quitosana nas espécies *D. phalaenopsis*, no meio líquido (A) e sólido (B), e *C. labiata*, em meio líquido (C).

Os mecanismos pelos quais a quitosana atua nos tecidos vegetais ainda não estão bem esclarecidos. Especula-se que seus efeitos são parcialmente dependentes de ações elicitoras que podem produzir estresse às culturas (Nahar 2012), assim como, pode ter um papel no aumento do crescimento e desenvolvimento das plantas pela via de sinalização de biossíntese da auxina através de uma via independente de triptofano (Uthairatanakij et al. 2007). Em *Brassica napus* observou-se que a quitosana provocou a expressão dos mesmos genes que são regidos por reguladores de crescimento de plantas como auxina e giberelina (Yin et al. 2006). De acordo com Boonlertnirun et al. (2008), o período de disponibilidade da quitosana em solo favorece um maior contato da planta e dos nutrientes do solo com as cargas positivas da quitosana que podem se ligar às cargas negativas dos nutrientes, facilitando sua absorção pelas plantas e contribuindo para o aumento da produtividade vegetal.

Por outro lado, El-Tanahy et al. (2012) relatam que os efeitos positivos da quitosana podem vir do fornecimento de alguns compostos amino necessários para o crescimento das plantas, que podem ser fornecidos pelos próprios componentes amino da molécula de quitosana ou pela maior capacidade da planta de absorver nitrogênio do solo quando a quitosana é degradada. A quitosana possui na sua constituição química entre 6,9 a 8,7% de nitrogênio, o que pode promover aumento no desenvolvimento em algumas plantas (Otha et al. 2000, Rabea et al. 2003). Segundo Abdel-Mawgoud et al. (2010), entretanto, mais estudos devem ser realizados para se entender detalhadamente a influência da quitosana na produtividade e crescimento das plantas.

Determinações enzimáticas

O efeito do estado físico do meio de cultura sobre as atividades das enzimas nas plantas de *D. phalaenopsis* apresentou interação significativa com as doses de quitosana (Tabela 4). Observou-se que, em meio sólido, a dose de quitosana não afetou a atividade da SOD e da CAT, enquanto que a APX teve sua maior atividade nas plantas com 15 mg.L⁻¹ de quitosana em comparação com as plantas dos demais tratamentos.

Tabela 4. Médias da atividade enzimática da SOD (U SOD mg⁻¹ proteína), APX (μmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína) e CAT (μmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína) para *Dendrobium phalaenopsis* em função do estado físico do meio (sólido e líquido) e concentrações de quitosana (0, 15 e 20,0 mg.L⁻¹).

Enzimas	Estado físico do Meio	Concentrações de quitosana		
		0	15	20
SOD	Sólido	14,66 aA	11,81 aA	12,23 aA
	Líquido	7,21 bB	13,21 aAB	15,64 aA
APX	Sólido	8.534,82 aB	16.141,73 aA	6.754,50 aB
	Líquido	5.866,43 bB	10.016,20 bA	2.877,57 bC
CAT	Sólido	260,02 aA	226,61 bA	273,74 aA
	Líquido	280,75 aA	285,44 aA	201,31 bB

As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

No cultivo em meio líquido, a atividade da SOD nas plantas de *D. phalaenopsis* tendeu a aumentar e foi maior em presença de 20,0 mg.L⁻¹ de quitosana do que no controle (Tabela 4). A ação da quitosana sobre a atividade da APX, porém, ocasionou um aumento nas plantas tratadas com 15 mg.L⁻¹, seguida de queda na atividade dessa enzima quando se dobrou a dose de quitosana no meio. A atividade da CAT também diminuiu nessa condição de cultivo (meio líquido com 20,0 mg.L⁻¹ de quitosana).

Apesar do aumento na atividade da SOD houve uma queda na atividade da APX e da CAT na maior concentração de quitosana. A presença da quitosana, que tem reconhecida capacidade de sequestrar eficientemente o radical superóxido (O₂⁻) sem geração de H₂O₂, deve ter prevenido o acúmulo dessa ROS, de maneira que a queda na atividade da APX e da CAT na maior concentração de quitosana representa um controle não enzimático do superóxido. Sun et al. (2004) destacam que a velocidade de eliminação do radical superóxido aumenta gradualmente com o aumento da concentração da quitosana e seus derivados.

Este papel conjunto das enzimas e da quitosana na defesa das plantas frente ao estresse inerente ao cultivo *in vitro*, importante na prevenção do acúmulo de ROS, traduziu-se no aumento de peso fresco e no número de brotações e raízes dessa espécie em relação ao controle.

Para *C. labiata*, a atividade enzimática explica bem a diferença na resposta morfogênica observada em função do estado físico do meio. No meio sólido, onde essa espécie apresentou falha na sua expressão morfogênica refletida pela ausência de brotos e pelo número e tamanho das raízes emitidas, a atividade da SOD foi maior no tratamento sem quitosana, com subsequente redução nos demais tratamentos, enquanto que a APX e a CAT tiveram seu pico de atividade no tratamento com maior dose de quitosana (Tabela 5).

Tabela 5. Médias da atividade enzimática da SOD (U SOD mg⁻¹ proteína), APX (μmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína) e CAT (μmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína) para *Cattleya labiata* em função do estado físico do meio (sólido e líquido) e concentrações de quitosana (0, 15 e 20,0 mg.L⁻¹).

Enzimas	Estado físico do Meio	Concentrações de quitosana		
		0	15	20
SOD	Sólido	128,00 aA	92,05 aB	63,99 aB
	Líquido	42,05 bB	81,42 aA	70,22 aAB
APX	Sólido	6.593,27 bB	6.720,80 aB	9.035,32 aA
	Líquido	7.799,05 aA	5.592,18 bB	2.377,27 bC
CAT	Sólido	212,64 bB	241,73 aB	480,71 aA
	Líquido	270,42 aA	272,16 aA	256,08 bA

As médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Observa-se no meio sólido, que o aumento da atividade das enzimas APX e CAT coincidiu com o aumento na concentração de quitosana no meio, e não em resposta à geração de peróxido de hidrogênio pela SOD, que teve sua atividade diminuída. Percebe-se neste caso, a versatilidade de atuação da quitosana frente ao estresse, primeiramente atuando no sequestro de radicais superóxido mediante a sua concentração e estimulando o sistema antioxidativo no sequestro do peróxido de hidrogênio produzido, evidenciado pela alta atividade de APX e CAT na concentração de 20 mg.L⁻¹. Yang et al (2009) demonstraram que a quitosana pode atenuar os efeitos do estresse através da promoção da atividade de enzimas antioxidantes, como a catalase.

No cultivo em meio líquido, a maior atividade da SOD foi registrada nas plantas cultivadas em presença de quitosana, enquanto que a atividade da APX reduziu significativamente nesses tratamentos (Tabela 5). A menor atividade da APX demonstra uma

reduzida atividade do ciclo do ascorbato-glutationa e consequente aumento na concentração de H_2O_2 , que é tido como a molécula de sinalização para as respostas à quitosana em plantas e proposto como um dos componentes-chave para o estímulo ao crescimento pela quitosana (Pongprayoon et al 2013).

A atividade da CAT permaneceu constante com o aumento da concentração de quitosana no meio (Tabela 5). Possivelmente, a quitosana atuou como antioxidante proporcionalmente a sua concentração, tornando as condições do meio mais favorável para a emissão de brotos, evidenciando seu papel como promotora de crescimento. Como discutido anteriormente, as plantas de *D. phalaenopsis* exibiram comportamento semelhante nesta mesma condição de cultivo. Ambas as espécies, portanto, responderam positivamente à presença de quitosana em meio líquido (Tabela 3).

Constatou-se, neste trabalho, a prevalência do meio líquido para a micropropagação das espécies de orquídeas estudadas e confirmou-se a ação combinada da quitosana na prevenção ao estresse oxidativo em ação conjunta com as enzimas do sistema antioxidativo.

CONCLUSÃO

A espécie *Cattleya labiata* não apresenta brotação em meio líquido, independente da presença de quitosana.

A quitosana estimula o crescimento e o desenvolvimento *in vitro* de plantas de *D. phalaenopsis* e *C. labiata*.

A ação da quitosana na promoção do crescimento na micropropagação das espécies *D. phalaenopsis* e *C. labiata* deve-se, em parte, ao seu papel frente ao sistema de defesa antioxidativo das plantas, proporcionando um ambiente redox favorável à expressão morfogênica das espécies.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Botânica pelo apoio; aos pesquisadores do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais pelas sugestões e auxílio na execução do projeto; e a CAPES pela bolsa de mestrado concedida ao primeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Mawgoud AMR., Tantawy AS, El- Nemr MA, Sassine YN (2010) Growth and yield responses of strawberry plants to chitosan application. *Europe an Journal of Scientific Research* 39:161-168.
- Adelberg J (2006) Agitated, thin-films of liquid media for efficient micropropagation. In: Dutta S, Gupta SD, Ibaraki (eds) *Plant tissue culture engineering*. Springer, Dordrecht, pp 101–117.
- Arruda LJ, Cheib AL, Ranieri BD, Negreiros D, Fernandes GW (2010) Resgate e translocação de *Oncidium warmingii* (Orchidaceae), espécie ameaçada de extinção de campo rupestre ferruginoso. *Neotropical Biology and Conservation* 5:10-15.
- Berris, LSJr, Sizer, IW (1952) A espectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of Biological Chemistry* 195:133-140.
- Boonlertnirun S, Boonraung C, Suwanasara R (2008) Application of chitosan in rice production. *Journal of Metals Materials and Minerals* 18:47-52.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Docha Neto A (2005) Orquídeas: introdução e história. Publicado em Mombu The Orquideas Forum. <http://www.mombu.com/orquideas>. Acessado em 10 de junho de 2010.
- El-Tanahy AMM, Mahmoud RA, Abde-Mouty MM, Ali AH (2012) Effect of chitosan doses and nitrogen sources on the growth, yield and seed quality of Cowpea. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 6:115-121.
- Grattapaglia D, Machado MA (1990) Micropropagação. In: Torres AC, Caldas LC (Ed.). *Técnicas e aplicações da cultura de tecido de plantas*, ABCTP, Brasília, pp 99-169.
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. *Plant Physiology* 59: 309-314.
- Harish Prashanth KV, Dharmesh SM, Jagannatha Rao KS, Tharanathan RN (2007) Free radical-induced chitosan depolymerized products protect calf thymus DNA from oxidative damage. *Carbohydr Res* 342:190–195.

- Herrmann MH, Freitas EM, Périco E (2011) Cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea em meio de cultura alternativo. R. Bras. Agrociência 17:1-4.
- Jabeen N, Ahmad R (2013) The activity of antioxidant enzymes in response to salt stress in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings raised from seed treated with chitosan. J Sci Food Agric 93:1699–1705.
- Kämäräinen-Karppinen T, Virtanen E, Rokka VM, Pirttilä AM (2010) Novel bioreactor technology for mass propagation of potato microtubers. Plant Cell Tiss Organ Cult 101:245–249.
- Kananont N, Pichyangkura R, Chanprame S, Chadchawan S, Limpanavech P (2010) Chitosan specificity for the *in vitro* seed germination of two *Dendrobium* orchids (Asparagales: Orchidaceae). Scientia Horticulturae 124:239–247.
- Martini PC, Willadino L, Alves G.A, Donato VMTS (2001) Propagação de orquídea *Gongora quinquenervis* por sementeira *in vitro*. Pesq. Agropec. Bras. 36:1319-1324.
- Menini Neto L, Alves RJV, Barros F, Forzza RC (2007) Orchidaceae do Parque Estadual de Ibitipoca, MG, Brasil. Acta Botanica Brasilica, 21:687-696.
- Moreira BMT, Tomba EC, Zonetti PC (2007) Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea (*laelia Purpurata* lindl var *venosa* x *cattleya warneri* t. Moore alba) sob diferentes concentrações de sacarose e frutose. SaBios-Rev. Saúde e Biol. 2:16-21.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapids growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497.
- Nahar SJ, Kazuhiko S, Haque SM (2012) Effect of Polysaccharides Including Elicitors on Organogenesis in Protocorm-like Body (PLB) of *Cymbidium insigne in vitro*. Journal of Agricultural Science and Technology 2:1029-1033.
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiology 22:1068-1072.
- Nayak NR, Sahoo S, Patnaik S, Rath SP (2002) Establishment of thin cross section (TCS) culture method for rapid micropropagation of *Cymbidium alaiifolium* (L.) Sw and *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae). Sci. Hortic. 94:107-116.
- Nge KL, Nwe N, Chandkrachang S, Stevens WF (2006) Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. Plant Science 170:1185–1190.

- Ohta k, Atarashi H, Shimatani Y, Matsumoto S, Asao T, Hosoki T (2000) Effect of chitosan with or without nitrogen treatments on seedling growth in *Eustoma grandiflorum*. J. Jpn. Soc. Hortic. Sci. 69:63.
- Park PJ, Je JY, Kim SK (2004) Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. Carbohydr Polym 55:17–22.
- Pongprayoon W, Roytrakul S, Pichayangkura R, Chadchawan S (2013) The role of hydrogen peroxide in chitosan-induced resistance to osmotic stress in rice (*Oryza sativa* L.). Plant growth regulation, Wasinee. 70:159-173.
- Rabea EI, Badawy MET, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W (2003) Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. Biomacromolecules 4:1457–1465.
- Sheehan T.J (1992) Orchids. In: Larson RA ed. Introduction to floriculture, 2a ed. Academic Press, San Diego, 13-142.
- Silva FAS (2008) Assistat 7.5 Beta, Deag-Ctrn-UFCG, Campina Grande.
- Sopalun K, Thammasiri K, Ishikawa K (2010) Micropropagation of the Thai orchid *Grammatophyllum speciosum* blume. Plant Cell Tiss Organ Cult 101:143–150.
- Stancato GC, Bemelmans PF, Vegro CLR (2001) Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: Estudo de caso. Revista Brasileira de Horticultura Ornamental 7:25-33.
- Stancato GC, Abreu MF, Furlani AMC (2008) Crescimento de orquídeas epífitas *in vitro*: adição de polpa de frutos. Bragantia 67:51-57.
- Sun T, Xie WM, Xu PX (2004) Superoxide anion scavenging activity of graft chitosan derivatives. Carbohydr Polym 58:379–382.
- Uthairatanakij A, Silva JAT, Obsuwan K (2007) Chitosan for Improving Orchid Production and Quality. Orchid Science and Biotechnology 1:1-5.
- Xie WM, Xu PX, Liu Q (2001) Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. BioorgMed Chem Lett 11:1699–1701.

Yang F, Hu J, Li J, Wu X, Qian Y (2009) Chitosan enhances leaf membrane stability and antioxidant enzyme activities in apple seedlings under drought stress. *Plant Growth Regul* 58:131–136.

Yin H, Li S, Zhao X, Du Y, Ma X (2006) cDNA microarray analysis of gene expression in *Brassica napus* treated with oligochitosan elicitor. *Plant Physiol Biochem* 44:11-12.

Anexos

Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)

Instructions for Authors

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

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

Permissions

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

Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

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

Keywords

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

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

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

Footnotes

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

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

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

REFERENCES

Citation

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

Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).

This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).

This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

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

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

Journal article

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

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

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

Article by DOI

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

Book

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

Book chapter

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

Online document

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

Dissertation

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

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

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

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

[EndNote style \(zip, 3 kB\)](#)

TABLES

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

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

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

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

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

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

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

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

Permissions

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

Accessibility

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

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.

If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4”.

Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

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

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material

Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in.

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

AFTER ACCEPTANCE

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

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

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

[Springer Open Choice](#)

Copyright transfer

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

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

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

Proof reading

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

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

Online First

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

—