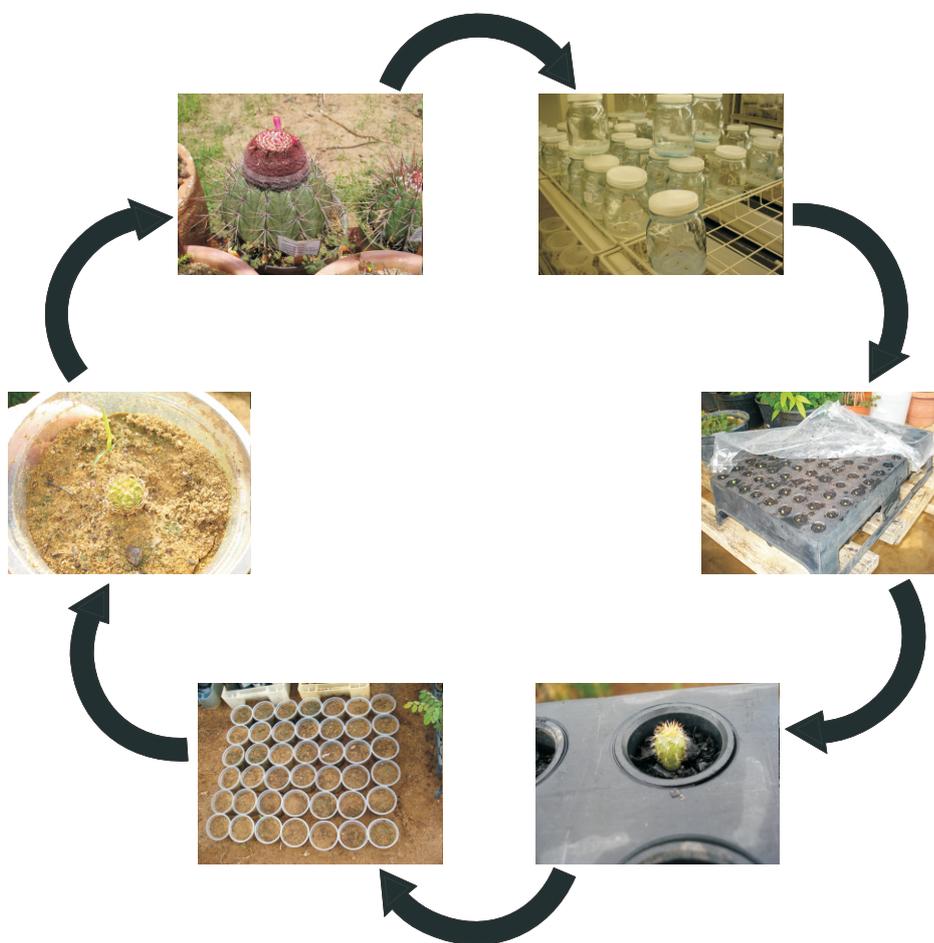


**Produção in vitro de mudas de coroa-de-frade
(*Melocactus oreas* Miq. - Cactaceae): uma
espécie nativa da Caatinga de Potencial
Ornamental**



ISSN 1808-9968

Julho, 2012

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Semiárido
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 94

Produção In Vitro de Mudanças de Coroa-de-Frade (*Melocatus oreas* Miq. - Cactaceae): uma Espécie Nativa da Caatinga de Potencial Ornamental

Ana Valéria Vieira de Souza

Danilo Diego de Souza

Nerimar Barbosa Guimarães da Silva

Flávio José Vieira de Oliveira

Embrapa Semiárido
Petrolina, PE
2012

Esta publicação está disponibilizada no endereço: www.cpatosa.embrapa.br

Embrapa Semiárido

BR 428, km 152, Zona Rural
Caixa Postal 23 CEP 56302-970 Petrolina, PE
Fone: (87) 3866-3600 Fax: (87) 3866-3815
sac@cpatsa.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Maria Auxiliadora Coelho de Lima
Secretário-Executivo: Anderson Ramos de Oliveira

Membros: Ana Valéria Vieira de Souza

Andréa Amaral Alves
Gislene Feitosa Brito Gama
José Maria Pinto
Juliana Martins Ribeiro
Magna Soelma Beserra de Moura
Mizael Félix da Silva Neto
Patrícia Coelho de Souza Leão
Sidinei Anunciação Silva
Vanderlise Giongo
Welson Lima Simões

Supervisão editorial: Sidinei Anunciação Silva
Revisão de texto: Sidinei Anunciação Silva
Normalização bibliográfica: Sidinei Anunciação Silva
Tratamento de ilustrações: Nivaldo Torres dos Santos
Editoração eletrônica: Nivaldo Torres dos Santos
Foto(s) da capa: Ana Valéria Vieira de Souza

1ª edição (2012): formato digital

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

É permitida a reprodução parcial do conteúdo desta publicação desde que citada a fonte.

**CIP. Brasil. Catalogação na Publicação
Embrapa Semiárido**

Produção in vitro de mudas-de-coroa- de-frade (*Melocatus oreas* Miq. - Cactaceae): uma espécie nativa da Caatinga de potencial ornamental / Ana Valéria Vieira de Souza [et al.]... – Petrolina: Embrapa Semiárido, 2012.

29 p. (Embrapa Semiárido. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 94).

1. Bioma Caatinga. 2. Cactaceae. 3. Propagação de plantas. 3. Regulador de crescimento.
I. Título. II. Série.

CDD 631.52

© Embrapa 2012

Sumário

Resumo	4
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	11
Conclusões	24
Referências	25

Produção In Vitro de Mudanças de Coroa-de-Frade (*Melocactus oreas* Miq. - Cactaceae): uma Espécie Nativa da Caatinga de Potencial Ornamental

Ana Valéria Vieira de Souza¹; Danilo Diego de Souza²; Nerimar Barbosa Guimarães da Silva³; Flávio José Vieira de Oliveira⁴

Resumo

Melocactus oreas é uma cactaceae nativa da Caatinga que apresenta potencial ornamental. Considerando-se o risco de extinção e a crescente demanda comercial, objetivou-se com este trabalho iniciar os estudos de micropropagação a fim de otimizar um protocolo para a produção de mudas em escala comercial. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia, casa de vegetação e viveiro de mudas da Embrapa Semiárido. Para o estabelecimento in vitro, foram utilizadas sementes desinfestadas e inoculadas em meio de cultura MS/4 sólido. Os experimentos de multiplicação foram realizados em meio de cultura MS/2 sólido suplementado com diferentes concentrações de BAP ou KIN. Para aclimatização, as brotações foram transferidas para tubetes contendo substrato comercial e posteriormente para potes plásticos contendo solo da Caatinga. Na germinação das sementes, observou-se que os resultados diferiram estatisticamente entre as semanas avaliadas e os maiores valores foram obtidos a partir da terceira semana. Na multiplicação in vitro, na presença de BAP e KIN, não houve a indução de múltiplas brotações,

¹Engenheira-agrônoma, D.Sc. em Horticultura, pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, ana.valeria@cpatsa.embrapa.br.

²Estudante de Biologia, estagiário da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, danilodiegos@hotmail.com.

³Bióloga, mestranda em Recursos Genéticos Vegetais (UEFS), Feira de Santana, BA, nerimargirls@hotmail.com.

⁴Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Ciências do Solo, Professor da UNEB, Juazeiro, BA, fvoliveira@uneb.br.

mas somente na regeneração dos brotos, que já apresentaram raízes. Na aclimatização observou-se 100% de sobrevivência das plantas. Pode-se afirmar que a micropropagação é uma técnica que pode ser utilizada na produção de mudas de *M. Oreas*.

Palavras-chave: cabeça-de-frade, extinção, micropropagação, regulador vegetal, aclimatização.

In vitro Production of Coroa-de-Frade (*Melocactus oreas*) seedlings - Cactaceae: a Caatinga Native Species Caatinga of Potential Ornamental

Ana Valéria Vieira de Souza; Danilo Diego de Souza; Nerimar Barbosa Guimarães da Silva; Flávio José Vieira de Oliveira;

Abstract

Melocactus oreas is a cactus native to the Caatinga featuring ornamental potential. Considering the risk of extinction and the growing demand for marketing, the aim of this work was to begin studies of micropropagation in order to optimize a protocol for the production of seedlings on a commercial scale. The experiments were performed at the Biotechnology Laboratory, greenhouse and plant nursery at Embrapa Semi-Arid. For the in vitro establishment, sterilized seeds were used and inoculated in the MS/4 solid. The multiplication experiments were performed in culture medium MS/2 solid supplemented with different concentrations of BAP or KIN. For acclimation, the shoots were transferred to tubes containing commercial substrate and then to plastic pots containing soil of the Caatinga. Seed germination, it was observed that the results differed among the week evaluated and the highest values were obtained from the third week. In vitro multiplication in the presence of BAP and KIN, no induction of multiple shoots, but only in the regeneration of shoots, which already had roots. In the acclimatization showed 100% survival of plants. It can be argued that micropropagation is a technique that can be used in the production of seedlings of *M. Oreas*.

Keywords: cabeça-de-frade, extinction, micropropagation, growth regulators, acclimatization.

Introdução

A família Cactaceae, endêmica do continente americano, é constituída por 125 gêneros e, aproximadamente 1.900 espécies, distribuídas nas regiões temperadas e tropicais em ampla variedade de habitats, desde regiões áridas até florestas úmidas (ARECES, 2004; GIBSON; NOBEL, 1986; HUNT; TAYLOR, 1990). No Brasil estão registrados 35 gêneros e um total de 160 espécies. Quatorze gêneros apresentam espécies endêmicas (BARBOSA et al., 1996; BARROSO et al., 1978; ORTEGA-BAES; GODINEZ-ALVEZ, 2006).

O gênero *Melocactus* (L.) Link e Otto possui 37 espécies xerófilas, que ocorrem desde o México até o Estado do Rio de Janeiro, sendo a maior concentração na Região Nordeste do Brasil, considerada o centro de diversidade primária deste gênero. No Bioma Caatinga podem ser encontradas várias espécies de *Melocactus* sp., conhecidas popularmente como cabeça-de-frade ou coroa-de-frade, amplamente utilizadas pela população local para diversas finalidades, desde a culinária e medicina popular (ANDRADE et al., 2006), até a exploração do potencial forrageiro e, principalmente, paisagístico (ROCHA et al., 2002).

Porém, ainda não se conhece sistemas de produção já estabelecidos para o cultivo dessas espécies e toda coleta das plantas neste ecossistema tem sido feita de forma extrativista, o que tem levado a uma drástica redução das populações naturais. Resende (2010) afirma que este fato torna o país uma área prioritária para a conservação das espécies de *Melocactus*, principalmente pelo risco de erosão genética a que estão submetidas. De acordo com Fonseca (2004), o impacto da coleta extrativista irracional torna-se mais significativo porque as plantas são removidas inteiras da natureza e um dos fatos que pode contribuir de modo expressivo para a extinção é o crescimento lento das plantas (DAS et al., 1998; MACHADO, 2009). Considerando-se o risco de erosão genética decorrente da coleta extrativista, a valoração do potencial ornamental e o crescente interesse paisagístico pelas coroas-de-frade, torna-se cada vez mais urgente e relevante o desenvolvimento de pesquisas que viabilizem a conservação e a

produção de mudas em larga escala, que poderão ser utilizadas para recompor áreas, bem como ser comercializadas para atender a demanda do mercado paisagístico nacional. A justificativa mais relevante para o estabelecimento de programas voltados à produção e conservação, deve-se ao alto grau de endemismo, associado a fatores como exploração de areais, degradação de habitats, queimadas na Caatinga e coleta indiscriminada das plantas para comercialização em feiras livres e beiras de estradas.

A produção de plantas in vitro representou no século passado um avanço considerável para a obtenção e comercialização de mudas de plantas frutíferas, florestais e principalmente ornamentais. Por causa das vantagens que apresenta, como a possibilidade de obtenção de elevado número de plantas, com excelentes condições fitossanitárias, em curto período de tempo e espaço reduzido, essa técnica também vem sendo realizada com êxito em pesquisas com espécies nativas de potencial comercial e passíveis de extinção. Além da produção de mudas, a micropropagação também é uma das técnicas de cultura de tecidos vegetais mais utilizadas em estudos de conservação, uma vez que possibilita, conseqüentemente, a preservação de espécies ornamentais nativas, por minimizar a coleta das plantas no seu habitat (RESENDE, 2010).

Todavia, os estudos sobre micropropagação de espécies do gênero *Melocactus*, seja para produção de mudas para comercialização ou para conservação ex situ, ainda são incipientes. Os protocolos já estabelecidos precisam ser ajustados para otimizar a multiplicação e reduzir o tempo de obtenção das plantas, não deixando de considerar as características peculiares de reprodução, crescimento e desenvolvimento da espécie.

Considerando-se que ainda não existem pesquisas relacionadas à micropropagação de *M. oreas* Miq., objetivou-se com este trabalho iniciar os estudos para a obtenção de plantas in vitro, a fim de otimizar, posteriormente, um protocolo para a produção de mudas em escala comercial.

Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia, em casa de vegetação e viveiro de mudas da Embrapa Semiárido. Para o início do cultivo in vitro, foram utilizadas sementes coletadas em uma planta da espécie mantida na coleção de cactáceas da mesma instituição. A planta matriz de *M. oreas* Miq. foi coletada em Morro do Chapéu, BA (11°15'31" de latitude sul e 40°56'31" de longitude oeste), em 19 de outubro de 2009 e mantida na coleção de trabalho.

As sementes coletadas, antes da inoculação in vitro, foram lavadas em água corrente, imersas em álcool 70% durante 5 segundos e posteriormente colocadas em agitação por 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio 0,5%. Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada autoclavada e em seguida, com o auxílio de uma micropipeta, inoculadas em frascos de vidro contendo o meio de cultura MS/4 (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sólido suplementado com 7,5 g L⁻¹ de sacarose, pH aferido para 5,7-5,8 antes da autoclavagem e 6 g L⁻¹ de ágar para solidificação. Após a inoculação das sementes, os frascos foram deixados em sala de crescimento com condições controladas de temperatura (25°C ± 1) e fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas escuro. O experimento foi instalado em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com 20 repetições, contendo dez sementes cada repetição. As avaliações para verificar a contaminação e número de sementes germinadas foram realizadas semanalmente por um período de 30 dias após a instalação do experimento.

Os explantes foram retirados de fragmentos das plantas germinadas in vitro. Cada planta foi cortada verticalmente ao meio, originando dois fragmentos que foram colocados horizontalmente com a parte do corte voltada para o baixo, em contato com o meio de cultura para a indução de múltiplos brotos. Os explantes foram colocados em frascos de polietileno transparente autoclaváveis contendo o meio de cultura MS/2 sólido, suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar para solidificação e diferentes concentrações das citocininas BAP (6-benzilaminopurina) ou KIN (cinetina). O pH do meio foi aferido para 5,7-5,8 antes da autoclavagem. Os tratamentos foram T1: MS/2;

T2: MS/2 + 0,25 mg L⁻¹ BAP; T3: MS/2 + 0,5 mg L⁻¹ BAP; T4: MS/2 + 1 mg L⁻¹ BAP; T5: MS/2 + 0,25 mg L⁻¹ KIN, T6: MS/2 + 0,5 mg L⁻¹ KIN; T7: MS/2 + 1 mg L⁻¹ KIN. Os frascos contendo os explantes foram deixados em sala de crescimento com condições controladas de temperatura (25 °C ± 1) e fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas escuro e o experimento foi instalado em DIC com cinco repetições e seis explantes/repetição. As avaliações foram realizadas quanto ao número de brotos regenerados e o número de brotos com raiz aos 30, 60 e 90 dias e quanto ao número de brotos necrosados e matéria fresca das brotações aos 90 dias.

Após a obtenção dos dados de peso da matéria fresca das brotações em balança analítica digital, as plantas foram levadas para aclimatização em casa de vegetação. Cada planta foi transferida para tubetes de polipropileno individuais (5,5 cm de diâmetro x 11 cm de altura), contendo o substrato comercial. Após o plantio, os tubetes foram tampados com plástico transparente durante 20 dias para manutenção da umidade. Após a retirada do plástico, as mudas foram mantidas no mesmo ambiente por um período de 10 dias. Durante a aclimatização em casa de vegetação, a irrigação foi feita de acordo com a necessidade das plantas, considerando-se a umidade do substrato.

Após o período de 30 dias, os tubetes foram transferidos para o viveiro de mudas com 25% de luminosidade, onde permaneceram por mais 30 dias. Posteriormente, cada planta foi transferida para potes de polietileno transparentes contendo solo da Caatinga como substrato, onde permaneceram por igual período. No viveiro, as plantas foram irrigadas diariamente durante 5 minutos, por microaspersão a cada 2 horas. Ao final de 60 dias, os potes plásticos contendo as mudas foram transferidos para condição de pleno sol.

Os dados obtidos em todos os experimentos foram submetidos à análise estatística pelo teste de comparação de médias - teste de Tukey α 5%, utilizando-se o software SISVAR (FERREIRA, 2003).

Os resultados para as variáveis número de brotos regenerados, número de brotos com raiz, número de brotos necrosados e matéria fresca das brotações aos 30, 60 e 90 dias, foram transformados pela equação raiz quadrada de $Y + 1.0 - \text{SQRT} (Y + 1.0)$.

Resultados e Discussão

A assepsia utilizada para a desinfestação das sementes e estabelecimento de *M. oreas* in vitro foi satisfatória, uma vez que ocorreu contaminação por fungo em apenas dois recipientes de cultivo durante todo o período de condução do experimento. Em relação à germinação das sementes, pôde-se observar que houve um aumento considerável, com diferença estatística significativa, entre a primeira e a quinta semana, sendo os valores médios/parcela 0,9 e 6,2, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Número de sementes de *M. oreas* germinadas in vitro.

Número de sementes germinadas						
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	
CV (%)	26,34	0,90 c**	4,2 b**	5,5 a**	5,9 a**	6,2 a**

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha 1\%$).

**Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de F.

Os trabalhos já publicados sobre o estabelecimento de protocolos de micropropagação para espécies nativas, em geral, com diferentes potenciais de exploração comercial, mostram diferenças significativas em cada etapa do processo, pois inúmeros fatores podem contribuir para o sucesso ou insucesso dos resultados. No entanto, parece consenso entre os grupos que trabalham nessa linha de pesquisa, que as fases mais críticas têm sido o estabelecimento in vitro dos explantes, o enraizamento in vitro das brotações e a aclimatização das plantas. Quando são utilizados fragmentos retirados da planta matriz, como gemas, segmentos de caules e outros, podem ocorrer significativas contaminações por microrganismos saprófitos no início do processo, que podem comprometer todo o desenvolvimento do trabalho. A experiência de diversos grupos de pesquisas no país que trabalham com micropropagação de espécies nativas, tem demonstrado que as etapas iniciais podem ser extremamente complexas quando o estabelecimento in vitro é realizado a partir desses materiais vegetativos (MORAES et al., 2007).

Desse modo, quando o objetivo é a otimização de protocolos de micropropagação para espécies nativas, tem-se optado por iniciar os trabalhos com o estabelecimento in vitro a partir da germinação de sementes. Além de não ocorrer o processo de oxidação, se a assepsia for eficiente, também não haverá contaminações por fungos ou bactérias. Segundo Melo et al. (2008), as sementes são mais indicadas para estudos neste contexto, por serem menos contaminadas e resistirem melhor aos tratamentos de assepsia, além de ser um benefício para a manutenção da variabilidade genética, o que é extremamente relevante no caso de espécies passíveis de extinção (RESENDE, 2010).

Estudos sobre micropropagação de cactáceas a partir da germinação de sementes in vitro foram realizados por Perez-Molphe-Balch (2003), Santos-Díaz et al. (2003) e Dávila-Figueroa et al. (2005) com diferentes resultados entre as espécies.

Alguns autores ressaltam que o uso de sementes em pesquisas de micropropagação de cactáceas reduz os riscos de contaminação, uma vez que a desinfestação de outros fragmentos ou tecidos é dificultada por causa da presença de espinhos que abrigam elevada variedade de microrganismos (CHOREÑO-TAPIA et al., 2002; MEDEIROS et al., 2006; KHALAFALLA et al., 2007). Santos-Díaz et al. (2003) observaram 100% de contaminação quanto utilizaram gemas axilares e segmentos de plantas de *Peleciphora aselliformis* cultivadas ex vitro e introduzidas in vitro.

Além da produção de mudas, a micropropagação é uma técnica alternativa que pode ser utilizada como estratégia de conservação ex situ para determinadas espécies que requerem muitos anos para alcançar a fase reprodutiva ou que possuem sementes que perdem a viabilidade rapidamente após longos períodos de armazenamento, como ocorre para algumas espécies do gênero *Melocactus* (ROJAS-ARÉCHIGA; VÁSQUES-YANES, 2000; VILLALOBOS et al., 1991).

Quando Resende (2010) utilizou sementes para o estabelecimento in vitro de *M. glaucescens*, observou que não houve contaminação a partir da desinfestação em álcool 96% durante 1 minuto e 2,5% de hipoclorito de sódio em agitação durante 10 minutos. Da mesma forma, Quiala et al. (2009) também não observaram contaminações in vitro de sementes de *Pilosocereus robinii* quando estas foram imersas em solução de 2% de hipoclorito de sódio em agitação durante 20 minutos. Nesses dois trabalhos, pode-se observar que a assepsia foi mais forte em comparação àquela utilizada para *M. oreas*.

Porém, Rêgo et al. (2009) obtiveram 0% de contaminação quando realizaram a assepsia de sementes de *Cereus jamacaru* em solução com menor concentração de hipoclorito de sódio (1%). Quando as sementes foram imersas em 2% deste agente desinfetante, nenhuma semente germinou e os autores concluíram que isso aconteceu por causa da atividade fitotóxica. As respostas obtidas para as espécies *M. glaucescens* e *P. robinii* são interessantes porque o procedimento adotado para a desinfestação das sementes em solução mais concentrada de hipoclorito de sódio não afetou a germinação das sementes in vitro (QUIALA et al. 2009; RESENDE, 2010). Esses resultados mostram que outros procedimentos para a assepsia e germinação in vitro de sementes de *M. oreas* devem ser realizados, quando deverão ser testadas outras concentrações de hipoclorito de sódio alternando com tempo de imersão.

Os tempos de germinação das sementes in vitro obtidos neste trabalho (Tabela 1) corroboram com os resultados encontrados por Resende (2010), quando avaliou a germinação por um período de 11 semanas, observando que o maior número de sementes germinadas de *M. glaucescens* ocorreu nas semanas iniciais da condução do experimento. Mesmo que o período de avaliação para a espécie *M. oreas* tenha sido até a quinta semana, neste momento, foi obtido um valor médio considerável de, aproximadamente, seis sementes germinadas/parcela, o que corresponde a 60% de germinação total. Porém, o número de sementes germinadas de *M. glaucescens* (> 90%), no mesmo tipo de meio de cultura, foi consideravelmente superior, quando comparado ao *M. oreas*. Esse resultado pode ser atribuído à pré-embebição destas em solução de giberelina antes da inoculação in vitro (RESENDE, 2010), o que não foi feito com a espécie em estudo.

Em protocolos de micropropagação de espécies nativas, cujo estabelecimento in vitro é realizado por meio da germinação de sementes, é comum o procedimento da pré-embebição destas em solução de giberelina, antes da inoculação in vitro. Porém, é mais utilizado quando existem referências sobre a ocorrência de dormência, relacionada à imaturidade do embrião. Este mesmo procedimento foi adotado por Cardarelli et al. (2010), quando objetivaram estabelecer uma técnica eficiente para a propagação e conservação in vitro de *Obregonia denegrii*, uma cactaceae em risco de extinção. Após o processo de assepsia, os autores imergiram as sementes em solução de GA3 e observaram um resultado de 85% de germinação após 7 dias da instalação do experimento. Contudo, Quiala et al. (2009), não embeberam as sementes *P. robinii* em solução de giberelina e obtiveram um resultado com mais de 90% de sementes germinadas, quando se utilizou a metade da concentração dos sais do meio MS. Não foram encontrados relatos sobre dormência de sementes para *M. oreas*. Contudo, pode ser interessante a realização de testes para a pré-embebição de sementes desta espécie em estudos posteriores, quando deverão ser testadas diferentes concentrações de solução de giberelina e tempos de embebição.

Os resultados de protocolos de micropropagação são significativamente diferentes entre as espécies mas, ainda assim, a produção de mudas in vitro de espécies de *Melocactus* via germinação de sementes in vitro, pode ser consideravelmente vantajosa quando comparada à propagação convencional in vivo, principalmente por causa do lento desenvolvimento das plantas em condições naturais. Em estudos sobre germinação in vivo realizados com a espécie *Melocactus bahiensis*, não foi obtido nem 50% de sementes germinadas (LONE et al., 2007).

Ao avaliar a multiplicação in vitro nos segmentos de *M. oreas* cultivados com diferentes concentrações de BAP e KIN, observou-se que não ocorreu a indução de múltiplas brotações, mas somente a regeneração dos brotos.

Os resultados obtidos nas avaliações realizadas aos 30 e 60 dias, mostraram que não houve diferença estatística significativa para o número de brotos regenerados entre os tratamentos, mas somente para número de brotos com raiz. Para estas variáveis, aos 90 dias, os resultados foram inversos. Quando avaliou-se o número de brotos necrosados e a matéria fresca das brotações, observou-se que não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos para a primeira variável analisada, mas somente para a segunda (Tabela 2).

Tabela 2. Número de brotos regenerados (NBRREG), número de brotos com raiz (NBRRAIZ), número de brotos necrosados (NBRNEC), peso da matéria fresca das brotações (MFBROT) de *Melocactus oreas* produzidos in vitro aos 30, 60 e 90 dias.

TRAT	30 DIAS		60 DIAS		90 DIAS			MFBROT
	N BR REG	N BR RAIZ	N BR REG	N BR RAIZ	N BR REG	N BR RAIZ	N BR NEC	
T1	2,2 a ns	2 a *	2,2 a ns	2 a *	3 ab *	2,8 a ns	2,2 a ns	0,056ab*
T2	3 a	1,6 ab	3 a	1,6 ab	2 ab	1,4 a	3,8 a	0,036 b
T3	3,6 a	0 b	3,6 a	0 b	2 ab	2 a	3,2 a	0,042 b
T4	2,8 a	0 b	2,8 a	0 b	3 ab	2,8 a	2,8 a	0,034 b
T5	2,8 a	2,4 a	2,8 a	2,4 a	2,8 ab	2,6 a	2,8 a	0,068 ab
T6	2 a	2,2 a	2 a	2,2 a	3,4 a	2,8 a	2,4 a	0,11 a
T7	4,2 a	0,8 ab	4,2 a	0,8 ab	1,4 b	1,4 a	4,2 a	0,042 b
CV (%)	15,97	16,10	15,97	16,10	12,68	,8114	14,29	15,35

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (α 1%). (Tratamentos: T1: MS/2; T2: MS/2 + 0,25 mg L⁻¹ BAP; T3: MS/2 + 0,5 mg L⁻¹ BAP; T4: MS/2 + 1 mg L⁻¹ BAP; T5: MS/2 + 0,25 mg L⁻¹ KIN, T6: MS/2 + 0,5 mg L⁻¹ KIN; T7: MS/2 + 1 mg L⁻¹ KIN). Os dados foram transformados pela equação: Raiz quadrada de Y + 1.0 - SQRT (Y + 1.0)

O maior número de brotos foi obtido com a utilização de KIN, porém, esse valor não diferiu dos tratamentos com BAP, assim como do controle, em que os segmentos foram cultivados somente em meio MS/2 sem suplementação com citocinina. Esses resultados se devem ao fato de não ter ocorrido indução de múltiplas brotações com a utilização de BAP ou KIN, nas concentrações testadas, mas somente a regeneração dos brotos. Todas as espécies vegetais cultivadas in vitro são capazes de regenerar novos indivíduos quando colocadas em condições adequadas de crescimento e desenvolvimento, mesmo na ausência de reguladores vegetais, por causa do fenômeno da totipotência celular (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Estudos realizados com diferentes espécies de cactáceas apresentaram regeneração das brotações, quando os explantes foram cultivados na ausência de citocininas, não deixando de ressaltar que o objetivo dos autores era a multiplicação in vitro de *Gymnocalycium buldiamur*, *Pelecyphora aselliformis*, *Pelecyphora strobiliformis*, *Mammillaria as-angelensis*, *Coryphantha mínima* e *Pilosocereus robinii* (DÁVILA-FIGUEROA, 2002; MALDA et al., 1999; PASQUAL; HOSHIJA, 1992; PÉREZ-MOLPHE-BALCH et al., 1998; PÉREZ-MOLPHE-BALCH; QUIALA et al., 2009; RUBLUO et al., 2002).

A regeneração de brotações na ausência de reguladores vegetais, em *M. oreas* e outras espécies, sugere que hormônios endógenos são capazes de promover o desenvolvimento do explante via organogênese direta, o que é um processo raramente observado em plantas de *Melocactus* em condições naturais (RESENDE, 2010). Esses resultados discordam daqueles obtidos por Mauseth (1993), por considerar que a citocinina é essencial para o desenvolvimento de brotos de cactos.

A suplementação do meio com diferentes concentrações de BAP ou KIN não foi capaz de possibilitar a multiplicação in vitro de *M. oreas*. A obtenção de melhores respostas na presença de KIN pode estar relacionada à toxidez do BAP, observada para várias culturas in vitro (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Todavia, permanece a necessidade da realização de outros experimentos mais elaborados, quando deverão ser testadas outras concentrações das mesmas citocininas, de modo a confirmar tal inferência sobre a toxidez para o *M. oreas*. A diferença de valores observados nas avaliações entre 30, 60 e 90 dias, para esta variável na concentração de 1,0 mg L⁻¹, pode ser atribuída à morte/necrose de algum explante.

A suplementação do meio de cultura com reguladores vegetais, a exemplo citocininas e auxinas, sempre é realizada quando o objetivo é aumentar a quantidade de brotos e/ou raízes formadas, bem como para outras finalidades. Porém, o número de brotações produzidas in vitro, pode variar consideravelmente de acordo com vários fatores, como genótipo, tipo de explante utilizado, meio de cultura, tipo e concentração do regulador vegetal, dentre outros (SOUZA; PEREIRA, 2007). Em experimentos de multiplicação in vitro, a concentração de citocinina a ser utilizada está diretamente relacionada ao genótipo a ser cultivado.

Segundo Hubstenberger et al. (1992), na fase de indução de múltiplas brotações, a ausência ou baixos níveis de auxinas combinados com moderados ou altos níveis de citocininas, podem aumentar a produção de brotos em cactos. Mas Resende (2010) afirma que uma das estratégias que possibilitam aumentar a produção de brotos nessas condições de cultivo é a fragmentação e orientação do explante no meio de cultura, o que pode reduzir a quantidade de plantas utilizadas como doadora de explantes.

Para a espécie *M. oreas*, além da fragmentação longitudinal que originaram dois explantes, realizou-se também o seccionamento transversal para a obtenção de explantes apicais, medianos e basais. Porém, não foi possível a condução deste experimento por causa da alta taxa de contaminação, que acarretou na perda total das plantas. O seccionamento transversal talvez fosse o mais indicado para a indução de múltiplos brotos em *M. oreas*, pois a utilização de fragmentos segmentados longitudinalmente contendo parte do ápice meristemático, pode ter prejudicado a produção de brotos, em decorrência da presença de auxina nessa região, que inibe o desenvolvimento das gemas axilares (JUÁREZ; PASSERA, 2002; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Quando Resende (2010) avaliou o número de brotos nas espécies *M. glaucescens* e *M. paucispinus* em meio MS/2 suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose, sem adição de qualquer regulador vegetal, também se observou que não ocorreu multiplicação, uma vez que os valores médios variaram entre 1 e 1,4; o que corresponde apenas à regeneração do explante inoculado. Mas, quando os mesmos tipos de explantes foram cultivados com a utilização de citocininas, foi possível observar o surgimento de brotações após o intumescimento da auréola a partir da quarta semana de inoculação.

Contudo, os resultados obtidos foram diferentes da espécie *M. oreas*, pois, Resende (2010) observou maior número de brotações na presença de BAP, quando comparado com a KIN. Giusti et al. (2002) também observaram que a KIN foi mais eficiente para a espécie *P. aselliformis* quando comparada ao BAP.

A citocinina BAP tem sido considerada como a mais efetiva em estudos de indução de múltiplas brotações in vitro. Porém, para algumas espécies, concentrações acima de 1,0 mg L⁻¹ têm sido consideradas tóxicas por promover a formação de calos e brotos com alterações morfológicas, além de variação somaclonal (GRATTAPAGLIA;

MACHADO, 1998). Nesse caso, outras opções de citocininas em diversas concentrações devem ser testadas, de modo que se atinja o objetivo principal da multiplicação massal. Para a espécie em estudo, ainda não se pode afirmar que houve toxidez naqueles explantes cultivados com BAP, pois a amplitude de concentrações testadas foi baixa e não foi possível observar calos e/ou brotos com alterações morfológicas. Pasqual e Hoshika (1992) observaram baixo número de brotações quando o meio de cultivo foi suplementado com 4 mg L⁻¹ de BAP. Porém, Retes-Pruneda et al. (2007) obtiveram boas respostas para a indução de múltiplos brotos com valores que variaram entre 3,4 e 11,8 com o emprego de diferentes concentrações de BAP e 2-isopenteniladenina (2-iP)

A seleção do regulador vegetal ideal em estudos de micropropagação para qualquer espécie deve priorizar não só a quantidade de brotações a ser obtida na etapa de multiplicação, mas também a qualidade e a manutenção da fidelidade genética dos novos brotos produzidos, principalmente no caso de espécies ameaçadas de extinção. Quiala et al. (2009) salientam que a manutenção da estabilidade genética em espécies passíveis de extinção é essencial para o estabelecimento de programas de conservação.

Para a variável número de brotos com raiz, aos 30 e 60 dias, os maiores valores também foram obtidos na presença de KIN na menor concentração testada, porém, estes não diferiram do controle. Na avaliação realizada aos 90 dias, os valores não diferiram entre os tratamentos. Moderados ou altos níveis de citocininas, estão relacionados à produção de brotos e não indução de raízes. Quando o objetivo é o enraizamento in vitro, o meio de cultura deve ser suplementado com auxinas, que têm o efeito direto de induzir a formação de raízes adventícias nessas condições de cultivo (SOUZA; PEREIRA, 2007). Vários autores confirmam o papel fundamental das auxinas no processo de rizogênese in vitro (ASSIS; TEIXEIRA, 1998; BLAZICH, 1988; DAVIS; SANKHLA, 1988; FORD, 2001; GASPAR; HOFINGER, 1988; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; MCCOWN, 1988; ONO; RODRIGUES, 1996; PASQUAL, 2001).

Resultados obtidos para algumas espécies do gênero têm mostrado que pode ocorrer a formação de raízes adventícias em brotos na etapa de multiplicação in vitro, o que pode ser uma vantagem no sentido de diminuir o tempo de obtenção das mudas e possibilitar a redução de custos. Quando os explantes possuem níveis de auxina endógena adequados e não degradados durante o cultivo in vitro, o enraizamento

pode ocorrer já na etapa de multiplicação, como observado para *M. oreas*. Vale ressaltar, para essa espécie que, a segmentação dos explantes com a manutenção de parte do ápice meristemático, pode ter inibido a indução de múltiplos brotos mesmo na presença de citocinina, mas favorecendo o enraizamento, por causa da presença de auxina nessa região (JUÁREZ; PASSERA, 2002; TAIZ; ZEIGER, 2004).

A suplementação de auxinas ao meio de enraizamento é usual, entretanto, há espécies que enraízam com facilidade e não necessitam da presença destes reguladores, o que pode ser explicado pelo elevado níveis endógenos desses fitohormônios (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PINTO; LAMEIRA, 2001).

Na Figura 1, podem ser observadas sementes inoculadas de *M. oreas* no início do processo de germinação in vitro, explantes em processo de regeneração durante a etapa de multiplicação e detalhes das brotações com raízes.



Fotos: Ana Valéria V. de Souza

Figura 1. a) Germinação in vitro de sementes de *M. oreas*; b) multiplicação in vitro de *M. oreas*. c) detalhes das raízes nas brotações durante a etapa de multiplicação in vitro.

As espécies *M. glaucescens* e *M. paucispinus* também apresentaram raízes na etapa de multiplicação. Resende (2010) obteve bons resultados para esta variável, quando os explantes de *M. glaucescens* (>50%) e *M. paucispinus* (>70%) foram cultivados em meio MS/2 suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose, sem adição de qualquer regulador vegetal. Esses resultados são interessantes e corroboram com aqueles obtidos para *M. oreas*. Essas espécies devem possuir níveis satisfatórios de auxina endógena, que possibilitem a indução de raízes adventícias mesmo na ausência de auxinas sintéticas. Contudo, análises bioquímicas devem ser realizadas a fim de confirmar tal afirmação.

Quiala et al. (2009) obtiveram 100% de enraizamento em brotos de *Pilosocereus robinii* em meio MS livre de qualquer regulador vegetal, assim como Dávila-Figueroa et al. (2005), que conseguiram resultados de enraizamento das espécies de cactáceas *Turbinicarpus laui*, *T. lophophoroides*, *T. pseudopectinatus*, *T. schmedickeanus* subsp. *flaviflorus*, *T. schmedickeanus* subsp. *klinkerianus*, *T. schmedickeanus* subsp. *schmedickeanus*, *T. subterraneus*, e *T. valdezianus* que variaram entre 54,2% a 94,2%, em meio de cultura MS na metade da concentração salina sem auxina. Mas o enraizamento de *P. aselliformis* (89%) e *P. strobiliformis* (87%) ocorreu em meio de cultura suplementado com carvão ativado e auxinas (PEREZ-MOLPHE-BALCH; DÁVILA-FIGUEROA, 2002).

Quando existe a necessidade da suplementação do meio de cultura com auxinas sintéticas para acontecer a formação de raízes adventícias em determinadas espécies, a auxina endógena age como um ativador de gene alavancando a formação precoce do primórdio radicular e a aplicação de auxinas sintéticas favorece a conjugação entre o AIA endógeno e aminoácidos que promovem a síntese de proteínas específicas necessárias para a formação dessas raízes iniciais (ALOUFA, 2003; ASSIS; TEIXEIRA, 1998; GASPAS; HOFINGER, 1988; ONO; RODRIGUES, 1996). Em geral, após aplicação da auxina sintética, ocorre um aumento imediato no nível endógeno de auxina natural e conseqüentemente há o início da formação de raízes primordiais (GASPAS; HOFINGER, 1988).

Mas, além das auxinas sintéticas, o uso do carvão ativado em meio de cultura também tem sido realizado para promover o enraizamento adventício, por causa de seus efeitos benéficos de adsorção de substâncias prejudiciais ao enraizamento, como os compostos fenólicos ou a simulação de uma condição de escuro, que é a situação mais favorável ao desenvolvimento de raízes adventícias (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; SOUZA; PEREIRA, 2007). De acordo com McCown (1988), o efeito do carvão no desenvolvimento da planta in vitro depende da composição química do meio e do genótipo da planta.

Em relação ao meio de cultura, tem-se observado, de acordo com muitos trabalhos, que o uso de meios menos concentrados tem permitido melhores resultados quando o objetivo é o enraizamento in vitro (ALOUFA, 2003; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; LIMA, 2004; MCCOWN, 1988; PINTO; LAMEIRA, 2001; PASQUAL, 2001; SOUZA et al., 2004). A alta concentração de sais que compõem o meio básico MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), mesmo em presença de auxinas, pode inibir o enraizamento in vitro (MCCOWN, 1988).

Diluições deste, para 1/2, 1/3 e até 1/4 de sais, têm possibilitado melhores resultados para muitas espécies de plantas. Meios básicos menos concentrados como WP, White, Knop, Heller podem ser igualmente favoráveis (ALOUFA, 2003; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PINTO; LAMEIRA, 2001; PASQUAL, 2001). A utilização da concentração mais diluída do meio MS para o cultivo in vitro de *M. oreas*, também pode ter favorecido a indução das raízes já na etapa de multiplicação.

As melhores respostas para a variável matéria fresca das brotações foram obtidas na presença de 0,5 mg L⁻¹ de KIN (Tabela 2) e, ainda nas condições in vitro, já foi possível observar o melhor desenvolvimento das brotações na presença desta citocinina. Os explantes eram bem maiores quando comparados ao tratamento controle ou na presença de BAP.

Como não houve indução de múltiplas brotações a partir de um único explante, pode não ter ocorrido competição entre os mesmos e, com isso, houve maior disponibilização dos nutrientes do meio de cultura beneficiado pela presença de KIN. Resultados semelhantes foram encontrados por Quiala et al. (2009), quando observaram que o crescimento de brotos de *P. robinii* foi reduzido com o aumento da concentração de BAP no meio de cultura. Taiz e Zeiger (2004) afirmam que a aplicação de citocininas em doses elevadas pode inibir o processo de alongamento de caules e tecidos.

A diversidade na resposta morfogênética in vitro, tanto entre espécies quanto entre genótipos da mesma espécie, mostra a necessidade de otimização de protocolos diferenciados e específicos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; JOHNSON; EMINO, 1979a, 1979b).

Após a finalização do processo in vitro, as plantas obtidas foram levadas ao ambiente ex vitro para a etapa de aclimatização e, nessa fase, foi possível observar 100% de sobrevivência destas, em condições de substrato em casa de vegetação e viveiro. A aclimatização é um período necessário para adaptação de plantas produzidas in vitro, que permitirá sua sobrevivência nas condições de cultivo em campo. Porém, pode ser a etapa mais crítica em um protocolo de micropropagação e comprometer completamente a produção das mudas micropropagadas de algumas espécies, uma vez que as plantas são expostas a mudanças drásticas no que se refere às condições ambientais, passando de uma condição heterotrófica para autotrófica. Nesse caso, a perda de água é o principal problema

(GRATTAPAGLIA; MACHADO 1998; PASQUAL, 2001). Contudo, para a espécie em estudo, observou-se que a mudança do metabolismo heterotrófico para o autotrófico, não foi um fator limitante para a aclimatização das plantas.

Este resultado é interessante porque mostra que os brotos enraizados não necessitam passar por uma etapa intermediária de rustificação ainda em condições de laboratório antes da transferência para o substrato em casa de vegetação. Alguns autores afirmam que procedimentos de retirada das tampas dos recipientes de cultivo ainda em sala de crescimento é uma forma benéfica para pré-adaptar as plantas às condições de ambiente externo (GRATTAPAGLIA; MACHADO 1998; PASQUAL, 2001; SANTANA, 2003). Nesse caso, pode ocorrer indução de modificações anatomo-fisiológicas nas plantas, que podem favorecer a sobrevivência durante a transferência do cultivo in vitro para as condições ex vitro (SANTANA, 2003).

Rout et al. (2006) não comentam sobre esta necessidade de rustificação ainda em condições de laboratório. Os autores ressaltam, apenas, a necessidade da aclimatização gradual de plantas micropropagadas do ambiente de alta umidade para o de baixa umidade, o que capacita as plantas a sobreviverem sob condições climáticas adversas, como foi realizado para o *M. oreas* quando os brotos já em tubetes, foram cobertos com plástico transparente em casa de vegetação para manutenção da umidade nos dias iniciais após a transferência.

Na Figura 2 pode-se observar a aclimatização das brotações de *M. oreas* produzidas in vitro, desde o momento da transferência para os tubetes contendo o substrato, até a finalização do processo com a transferência das plantas para condições de sol pleno.

Fotos: Ana Valéria V. de Souza.



Figura 2. a) Brotações de *M. oreas* logo após transferência para substrato; b) detalhe da planta logo após transferência para o viveiro; c) detalhe da planta em condições de sol pleno.

De acordo com Rout et al. (2006), plantas cultivadas in vitro são expostas a condições controladas no que se refere à nutrição, luminosidade, fontes de carbono, trocas gasosas, presença de determinadas substâncias como os reguladores vegetais, dentre outras, que promovem o crescimento rápido e a multiplicação. No entanto, essas condições podem induzir a ocorrência de mudanças morfológicas e fisiológicas, que podem dificultar, sobremaneira, a sobrevivência quando as plantas são transferidas diretamente para o campo (ROUT et al., 2006).

Os resultados variam significativamente entre espécies e, em alguns casos, não existe dificuldade para a finalização do processo quando as plantas são transferidas diretamente das condições in vitro para o campo. Resende (2010) obteve mais de 90% de sobrevivência das plantas micropropagadas de *M. glaucescens* quando retirou os brotos enraizados das condições in vitro e transferiu diretamente para o campo com 100% de luminosidade.

Resultados semelhantes também foram obtidos por Juárez e Passera (2002), para a espécie *O. ellisioana*. Malda et al. (1999) observaram que a perda de água após 20 dias de aclimatização não afetou a sobrevivência dos cactos *Coryphanta minina* e *O. denegrii*. Após esse período, as plantas menos vigorosas iniciaram um processo satisfatório de recuperação.

Este processo também foi observado na espécie em estudo, após a transferência das plantas para os frascos de polietileno transparentes contendo solo da Caatinga como substrato. Durante um período de duas semanas, aproximadamente, as plantas apresentaram-se ressecadas, com sintomas de perda de água. Contudo, recuperaram-se espontaneamente.

As espécies de *Melocactus* possuem características especiais como ceras, espinhos, parênquima aquífero, sistema radicular fasciculado, além do metabolismo ácido das crassuláceas (CAM), que permite sua sobrevivência em ambientes áridos e com baixa disponibilidade de água (ARRUDA et al., 2005; KHALAFALLA et al., 2007; SRISKANDARAJAH; SEREK, 2004). Essas características podem favorecer a eliminação da etapa de rustificação em protocolos de micropropagação, o que pode ser uma vantagem considerável na redução do tempo para obtenção das mudas e dos custos.

Nesse caso, permanece a necessidade da realização de outros experimentos de aclimatização de *M. oreas* para a efetiva otimização do protocolo de micropropagação, uma vez que o tempo para a transferência das mudas para condições plena de luminosidade foi consideravelmente longo, sendo necessário outros experimentos, para diminuir o tempo de obtenção das mudas. A técnica da micropropagação é vantajosa, pois o tempo completo para a obtenção das mudas produzidas in vitro é consideravelmente menor, quando comparado às condições naturais de reprodução e propagação.

O sucesso obtido na etapa de aclimatização de espécies de cactáceas, com mais de 90% de sobrevivência das plantas, pode ser conferido em vários trabalhos para as espécies *Turbinicarpus laui* (94-100%) (MATA-ROSAS et al., 2001), *Ariocarpus kotschoubeyanus* (95-100%) (MOEBIUS-GOLDAMMER et al., 2003), *Escobaria mínima* (92%), *Mammillaria pectinifera* (76,3%), *Melocactus curvispinus* (75%), *Pelecyphora aselliformis* (81,3%) (Retes-Pruneda et al., 2007) e *Pilosocereus robinii* (91,6%) (QUIALA et al., 2009).

Quiala et al. (2009) afirmam que existe uma recomendação para se utilizar o substrato mais adequado para o plantio de espécies de cactáceas, que é composto por uma mistura de areia grossa lavada, húmus, carvão vegetal e matéria orgânica, de acordo com o Jardim Botânico Nacional de Cuba. Contudo, estes mesmos autores ressaltam que substratos simples são viáveis para o cultivo de espécies de cactos.

Conclusões

A produção de mudas de *M. oreas* pode ser realizada com êxito por meio da técnica de micropropagação, uma vez que foi possível produzir plantas em condições in vitro, perfeitamente adaptadas às condições de cultivo em ambiente ex vitro. Contudo, mesmo que o protocolo utilizado para a condução deste trabalho tenha sido adequado para a produção de mudas, o mesmo precisa ser melhor otimizado no sentido de provocar a indução de múltiplas brotações nos explantes, mas principalmente a fim de reduzir o tempo total para a obtenção das mudas.

Experimentos futuros deverão ser realizados quando deverá se buscar metodologias eficientes para propiciar maior germinação das sementes em menor tempo e diminuir o período da aclimatização das plantas produzidas in vitro. Porém, vale ressaltar que, mesmo o tempo de germinação e aclimatização tenham sido relativamente longo, o protocolo foi eficiente porque eliminou a etapa de enraizamento das brotações, o que é um benefício em protocolos de micropropagação de espécies nativas.

Referências

- ALOUFA, M. A. I. Enraizamento in vitro de plantas lenhosas: dificuldades e soluções. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2003. p. 3-5.
- ANDRADE, C. T. S.; MARQUES, J. G. W.; ZAPPI, D. C. Utilização medicinal de cactáceas por sertanejos baianos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 3, p. 36-42, 2006.
- ARECES, A. Cactaceae. In: SMITH, N.; MORI, S. A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, W. D.; HEALD, S. V. (Ed.). **Flowering plants of the Neotropics**. Princeton: Pinceton University Press; Oxford: New York Botanical Garden, 2004. p. 73-76.
- ARRUDA, E.; MELO-DE-PINNA, G. F.; ALVES, M. Anatomia dos órgãos vegetativos de Cactaceae da Caatinga pernambucana. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, n. 28, p. 589-601, 2005.
- ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, 1998. p. 261-96.
- BARBOSA, M.; MAYO, S.; CASTRO, A.; FREITAS, G.; PEREIRA, M.; NETO, P.; MOREIRA, H. Checklist preliminar das angiospermas. In: SAMPAIO, E.; MAYO, S.; BARBOSA, M. (Ed.). **Pesquisa botânica nordestina: progresso e perspectivas**. Recife: SBB, 1996. p. 253-415.
- BARROSO, G.; GUIMARÃES, E.; ICHASO, C.; COSTA, C.; PEIXOTO, A. **Sistemática das angiospermas do Brasil**. São Paulo: LCT: Edusp, 1978.
- BLAZICH, F. A. Chemicals and formulations used to promote adventitious rooting. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. (Ed.). **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1988. p. 132-149.
- CARDARELLI, M.; BORGOGNONE, D.; COLLA G. In vitro propagation of *Obregonia denegrii* FRIC. (CACTACEAE). **Propagation of Ornamental Plants**, Sofia, v. 10, n. 1, p. 29-36, 2010.
- CHOREÑO-TAPIA, J. M.; GONZÁLEZ-ROSAS, H.; TERRAZAS-SALGADO, T.; HERNÁNDEZ-
- DAS, A. B.; MOHANTY, S.; DAS, P. Variation in karyotype and 4-C DNA content in six species of *Melocactus* of the family Cactaceae. **Cytologia**, [Tokyo], v. 63, n. 1, p. 9-16, 1998.
- DÁVILA-FIGUEROA, C. A.; ROSA-CARRILLO, M. L.; PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E. **In vitro Celular an Development Biology-Plant**, 41:540-545, 2005.
- DAVIS, T. D.; SANKHLA, N. Effect of shoot growth retardants and inhibitors on adventitious rooting. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1988. v. 2, p.174-84.

ESTRADA-LUNA, A. A.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, J. J.; TORRES-TORRES, M. E.; CHABLÉ-FERREIRA, D. F. **SISVAR**: sistema de análises estatísticas: versão 4.3. Lavras: UFLA, 2003. 1 CD-ROM.

FONSECA, R. B. S. **Fenologia reprodutiva e dispersão de *Melocactus glaucescens* Buining e Brederoo e *M. paucispinus* G. Heimen e R. Paul (Cactaceae) no Município de Morro do Chapéu, Chapada Diamantina – Bahia – Brasil**. 2004. 123 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

FORD, Y. Y.; Bonham, E. C.; CAMERON, R. W. F.; BLAKE, P. S.; JUDD, H. L.; Harrison-Murray, R. S. Adventitious rooting: examining the role of auxin in easy and a difficult-to-root plant. **Plant Growth Regulation**, Sofia, v. 10, p. 1-11, 2001.

GASPAR, T.; HOFINGER, M. Auxin metabolism during adventitious rooting. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. (Ed.). **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1988. v. 2, p. 117-131.

GIBSON, A.; NOBEL, P. **The cactus primer**. Cambridge: Harvard University Press, 1986. 986 p.

GIUSTI, P.; VITTI, D.; FICCHETTE, F.; COLLA, G. In vitro propagation of three endangered cactus species. **Scientia Horticulturae**, [Maryland Heights], v. 95, p. 319-332, 2002.

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

HUBSTENBERGER, J. F.; CLAYTON, P. W.; PHILLIPS, G. C. Micropropagation of cacti. In: BAYAY, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. v. 20, p. 49-68.

HUNT, D.; TAYLOR, N. The genera of Cactaceae: progress toward consensus. **Bradleya**, [Hornchurch], n. 8, p. 85-107, 1990.

JOHNSON, J. L.; EMINO, E. R. Tissue culture in the Cactaceae. **Cactus and Succulent Journal**, Claremont, n. 51, p. 275-277, 1979a.

_____. In vitro propagation of *Mammillaria elongata*. **HortScience**, Alexandria, n. 14, p. 605-606, 1979b.

JUÁREZ, M. C.; PASSERA, C. B. In vitro propagation of *Opuntia ellisiana* Griff. and acclimatization to field conditions. **Biocell**, Mendoza, n. 26, p. 319-324, 2002.

KHALAFALLA, M. M.; ABDELLATEF, E.; MOHAMED-AHMED, M. M.; OSMAN, M. G. Micropropagation of cactus (*Opuntia ficus-indica*) as strategic tool to combat desertification in arid and semi arid regions. **International Journal of Sustainable Crop Production**, [Toronto], n. 2, p. 1-8, 2007.

LIMA, E. C. **Indução e enraizamento *in vitro* de brotações em segmentos nodais de sangra d'água**. 2004. 71 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LONE, A. B.; TAKAHASHI, L. S. A.; FARIA, R. T.; DESTRO, D. Desenvolvimento vegetativo de *Melocactus bahiensis* (Cactaceae) sob diferentes níveis de sobreamento. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, n. 56, p. 199-203, 2007.

MACHADO, M. C. The genus *Melocactus* in eastern Brazil: part I: an introduction to *Melocactus*. **British Cactus & Succulent Journal**, [Hornchurch], n. 27, p. 1-16, 2009.

MALDA, B. G.; BACKHAUS, R.A.; MARTIN, C. Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of *in vitro* cultured cactus. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Heidelberg, n. 58, p. 1-9, 1999.

MATA-ROSAS, M.; ROSA, M. A. M. de la; MOEBIUS-GOLDAMMER, K.; CHÁVEZ-AVILA, V. M. Micropropagation of *Turbincarpus laui* Glass *et* Foster, an endemic and endangered species. ***In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant***, Heidelberg, n. 37, p. 400-404, 2001.

MAUSETH, J. D. Water-storing and Cavitation-preveting adaptations in wood of cacti. **Annals of Botany**, Oxford, n. 72, p. 81-89, 1993.

MCCOWN, B. H. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1988. v. 2, p. 289-302.

MEDEIROS, L. A.; SALVADOR, R. C. S.; GALLO, L. A.; OLIVEIRA, E. T.; DEMATTÊ, M. E. S. P. *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Heidelberg, n. 84, p. 165-169, 2006.

MOEBIUS-GOLDAMMER, K.G.; MATA-ROSAS, M.; CHÁVEZ-AVILA, V.M. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. ***In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant***, Heidelberg, n. 39, p. 388-393, 2003.

MORAES, R. M.; CALDAS, L. S.; SILVEIRA, C. E. S.; SOUZA, A. V.; BERTONI, B. W.; PEREIRA, A. M. S. Micropropagação e banco de germoplasma "in vitro" para produção e conservação de plantas nativas do Cerrado. In: PEREIRA, A. M. S. (Org.). **Recursos genéticos e conservação de plantas medicinais do Cerrado**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2007. v. 1, p. 185-214.

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

ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. **Aspectos da fisiologia do enraizamento de estacas caulinares**. Jaboticabal: FUNEP, 1996. 83 p.

ORTEGA-BAES, P.; GODÍNEZ-ALVAREZ, H. Global diversity and conservation priorities in the Cactaceae. **Biodiversity and Conservation**, Heidelberg, n. 15, p. 817-827, 2006.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos**. Lavras: UFLA: FAEPE, 2001. 165 p.

PASQUAL, M.; HOSHIKA, E. Efeito do ácido naftaleno acético e 6-benzilaminopurina sobre a proliferação *in vitro* de *Cactus Gymnoclicium buldianum* L. e *Mammillaria bocassana* L. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 4, n. 27, p. 589-593, 1992.

PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E.; DÁVILA-FIGUEROA, C. A. *In vitro* propagation of *Pelecypora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Heidelberg, n. 38, p. 73-78, 2002.

PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E.; REYES, M. E. P.; AMADOR, E. V.; RANGEL, E. M.; RUIZ, L. R. M.; VIRAMONTES, H. J. L. Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Heidelberg, n. 34, p. 131-135, 1998.

PINTO, J. E. B.; LAMEIRA, O. A. **Micropropagação e metabólitos secundários *in vitro* de plantas medicinais**. Lavras: UFLA: FAEPE, 2001.

QUIALA, E.; MATOS, J.; MONTALVO, G.; FERIA, M.; CHÁVEZ, M.; CAPOTE, A.; PÉREZ, N.; BARBÓN, R.; KOWALSKI, B. *In vitro* propagation of *Pilosocereus robinii* (Lemaire) Byles *et* Rowley, endemic and endangered cactus. **Journal of the Professional Association for Cactus Development**, [Atkinsons], n. 11, p. 18-25, 2009.

RÊGO, M. M.; ARAÚJO, E. R.; RÊGO, E. R.; CASTRO, J. P. *In vitro* seed germination of mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C.). **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, n. 4, p. 34-38, 2009.

RESENDE, S. V. **Micropropagação e conservação *in vitro* de *Melocactus glaucescens* Buining e Brederoo e *M. paucispinus* G. Heimen e R. Paul (Cactaceae), espécies endêmicas da Bahia e ameaçadas de extinção**. 2010. 139 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

RESENDE, S. V.; LIMA-BRITO, A.; SANTANA, J. R. F. Influência do substrato e do enraizamento na aclimatização de *Melocactus glaucescens* Buining e Brederoo propagados *in vitro*. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 57, n. 6, p. 803-809, 2010.

RETES-PRUNEDA, J. L.; VALADEZ-AGUILAR, M. L.; PÉREZ-REYES, M. E.; PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E. Propagación *in vitro* de especies de *Echinocereus*, *Escontria*, *Mammillaria*, *Melocactus* y *Polaskia* (Cactaceae). **Boletín de la Sociedad Botánica de México**, Distrito Federal, México, n. 81, p. 9-16, 2007.

ROCHA, E. A.; AGRA, M. F. Flora do pico do Jabre, Paraíba, Brasil: *Cactaceae juss.* **Acta Botânica Brasílica**, Feira de Santana, v. 16, n. 1, p. 15-21, 2002.

ROJAS-ARÉCHIGA, M.; VÁSQUEZ-YANES, C. Cactus seed germination: a review. **Journal of Arid Environments**, [Maryland Heights], v. 44, p. 85-104, 2000.

ROUT, G. R.; MOHAPATRA, A., MOHAN JAIN, S. Tissue culture of ornamental pot plant: a critical review on present scenario and future prospects. **Biotechnology Advances**, [Maryland Heights], n. 24, p. 531-560, 2006.

RUBLUO, A.; MARÍN-HERNÁNDEZ, T.; DUVAL, K.; VARGAS, A.; MÁRQUEZ-GUZMÁN, J. Auxin induced morphogenic responses in longterm *in vitro* subcultured *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada (Cactaceae). **Scientia Horticulturae**, [Maryland Heights], n. 95, p. 341-349, 2002.

SANTANA, J. R. F. **Controle da morfogênese in vitro em algumas espécies de Annonaceae**. 2003. 237 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SANTOS-DÍAZ, M. S.; MÉNDEZ-ONTIVEROS, R.; ARREDANDO-GÓMEZ, A.; SANTOS-DÍAZ, M. L. *In vitro* organogenesis of *Pelecyphora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae). **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Heidelberg, n. 39, p. 480-484, 2003.

SRISKANDARAJAH, S.; SEREK, M. Regeneration from phylloclade explants and callus cultures of *Schlumbergera* e *Rhipsalidopsis*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Heidelberg, v. 78, p. 75-81, 2004.

SOUZA, A.V.; PINTO, J. E. B. P.; Bertolucci, S. K. V.; Teixeira, R. N. Enraizamento *in vitro* de arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.), uma planta medicinal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 7, n. 1, p. 86-91, 2004.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.

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

VILLALOBOS, V. M.; FERREIRA, P.; MORA, A. The use of biotechnology in the conservation of tropical germoplasm. **Biotechnology Advanced**, [Maryland Heights], n. 9, p. 197-215, 1991.



Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**



CGPE 9928