



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA**

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**



MARIA NAZARÉ GUIMARÃES MARCHI

**MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE *DISCOCACTUS*
ZEHNTNERI, *PILOSOCEREUS GOUNELLEI* E
STEPHANOCEREUS LUETZELBURGII, CACTOS NATIVOS DA
CHAPADA DIAMANTINA, BAHIA**

FEIRA DE SANTANA-BA
2012

MARIA NAZARÉ GUIMARÃES MARCHI

**MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE *DISCOCACTUS*
ZEHNTNERI, *PILOSOCEREUS GOUNELLEI* E
STEPHANOCEREUS LUETZELBURGII, CACTOS NATIVOS DA
CHAPADA DIAMANTINA, BAHIA**

FEIRA DE SANTANA – BAHIA
2012

MARIA NAZARÉ GUIMARÃES MARCHI

**MICROPROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE *DISCOCACTUS*
ZEHNTNERI, *PILOSOCEREUS GOUNELLEI* E
STEPHANOCEREUS LUETZELBURGII, CACTOS NATIVOS DA
CHAPADA DIAMANTINA, BAHIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana

Co-orientador: Profa. Dra. Moema Cortizo Bellintani

FEIRA DE SANTANA-BAHIA

2012

BANCA EXAMINADORA

Dra. Alone Lima Brito
Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS)

Dra. Ana Valéria Vieira de Souza
Embrapa Semiárido/CPATSA

Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana
Orientador e Presidente da Banca

FEIRA DE SANTANA – BAHIA
2012

A João Batista Marchi

Por ser o maior incentivador deste trabalho

E pela certeza que estaremos sempre juntos

AGRADECIMENTOS

A Jeová Deus por ter me dado perseverança, força e serenidade para superar todas as dificuldades, sabedoria para fazer as escolhas certas e por ter iluminado os meus passos, frequentemente por colocar pessoas maravilhosas nos meus caminhos.

A João Batista Marchi e Dormelinda Guimarães Marchi, meus pais queridos, por serem as razões do meu viver e não somente por apoiarem, mas também por vivenciarem incondicionalmente os meus sonhos. Meu pai, por ser minha torre forte, pela cumplicidade, confiança, imensa sabedoria e pela certeza que estará comigo, para sempre! Minha mãe, pela imensa dedicação e cuidado durante todos esses anos, por ter me inculcado tantos valores inestimáveis e por pacientemente perdoar e compreender minhas fases mais difíceis.

Às minhas tias Nice e Rute por terem me acolhido quando mais precisei e aos meus primos Paula, Dênis e Venicius, por compartilharem tantos momentos felizes.

Aos meus irmãos, Marcio Marchi pela companhia, principalmente nos últimos meses, a Marcelo Marchi, pela lição de vida e a Antônio Emanuel Marchi pela disponibilidade e apoio.

A Eunice Andrade, minha irmã do coração, pela confiança e cuidado às duas pessoas que mais amo na vida.

A Moema Cortizo Bellintani simplesmente por TUDO. Por ter acreditado em mim quando eu nem sabia do que era capaz; por ser um exemplo de vida, demonstrando um perfeito equilíbrio entre a vida profissional e pessoal; por ter investido na minha carreira acadêmica e por confiar no meu trabalho, mesmo sabendo das minhas inúmeras limitações. Sou grata ainda pela companhia, conversas, aprendizado e, sobretudo pela amizade maravilhosa que construímos durante estes anos de convivência, que nenhuma descrição seria capaz de expressar o que significa para mim. Obrigada por ser um anjo na minha vida!

Ao Professor José Raniere Ferreira de Santana pela oportunidade, confiança, aprendizagem e por estar sempre disponível.

A José Geraldo Aquino de Assis, por ter me descoberto e convidado a seguir a carreira que hoje me enche de alegrias e que tem tornado a minha vida tão emocionante! Obrigada pela orientação em experimentos, pela companhia nas coletas e por ter me apresentado às cactáceas. Serei eternamente grata não somente por ter direcionado minha carreira, mas também por ser um grande amigo.

Àqueles responsáveis por tornar os meus dias tão coloridos e cheios de graça, meus amigos, que me fizeram sorrir diariamente, me apoiaram incondicionalmente e me encheram de amor e carinho diante da ausência da minha família. Aos amigos de graduação Consul, Kerol, Beta, Bruno, Tosco, Elisa, Bê e Beto e especialmente a Rosane dos Santos por ser minha companheira inseparável, por dividir tantas sagas e por compartilhar tantas afinidades e a Priscila Barreto, por ser um exemplo de uma mulher forte, determinada, competente, sensata e que por tantas vezes cuidou de mim tal como uma mãe abnegada. As minhas amigas de longas datas Fê, Lai, Niu e Lore por vibrarem com as minhas conquistas e por compreenderem minha ausência. De fato, “Eu poderia suportar, embora sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria, se morressem todos os meus amigos!” Obrigada por serem os amores da minha vida!

A todos os colegas da turma de 2010 do Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (PPGRGV) com os quais dividi momentos divertidos e inesquecíveis, especialmente aos amigos Fernando Carneiro e Paloma Pereira, pelas afinidades, ajudas e tantas gastações.

Ao amigo Fabio Espírito Santo pela energia contagiante, por tantas vezes ter me dado abrigo em Feira de Santana e ser uma pessoa tão pura, desprendida e amorosa.

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) não só por disponibilizar toda a infraestrutura necessária a realização deste trabalho, mas por ter me dado à oportunidade de fazer parte de um grupo onde o querer bem supera qualquer diferença. Obrigada a Raquel, Hayna, Lucas, Zafira e Gabriele pelo ambiente maravilhoso de trabalho que compartilhamos, pelas confraternizações inesquecíveis e almoços divertidos. Agradeço especialmente a Cássia Marques, pela ajuda nas análises estatísticas, revisão deste trabalho e por ser uma das pessoas mais altruísta que conheço; a Gabriela Torres, por ter tirado tantas dúvidas, pela ajuda nas avaliações dos experimentos e pelas conversas descontraídas e a Laila Civatti,

pelo auxílio na montagem, manutenção e avaliação dos experimentos, além da ajuda na tradução dos resumos.

Ao irmão Delmar pela companhia nas coletas e por ser um exemplo de vida.

A Sheila Resende pelo aprendizado, conselhos e referências.

Ao secretário do PPGRGV, Alberto Vicente, pela paciência e compreensão durante os trâmites do colegiado.

A UFBA pela excelente formação e ao Instituto de Biologia por ter disponibilizado toda a infraestrutura para execução do trabalho.

Ao Laboratório de Germinação (LAGER) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) por conceder toda infraestrutura necessária para montagem de parte dos experimentos de germinação.

Ao PPGRGV por ter contribuído para meu crescimento profissional e ter disponibilizado auxílio financeiro para viagens a coleta e congressos.

A CAPES pela concessão de bolsa.

A família Cactaceae, alvo de tantos anos de estudo e dedicação, por possuir uma morfologia e fisiologia intrigante e particular que a cada dia desperta meu interesse em continuar conhecendo-a.

*“Vou mostrando como sou e vou sendo como posso,
jogando meu corpo no mundo, andando por todos os
cantos e pela lei natural dos encontros, eu deixo e recebo
um tanto”*

(Mistério do Planeta – Novos baianos)

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1	16
Estabelecimento <i>in vitro</i> e crescimento inicial de <i>Discocactus zehntneri</i> , <i>Pilosocereus gounellei</i> e <i>Stephanocereus luetzelburgii</i> , cactáceas nativas da Chapada Diamantina – BA.	
CAPÍTULO 2	49
Micropropagação de <i>Discocactus zehntneri</i> , <i>Pilosocereus gounellei</i> e <i>Stephanocereus luetzelburgii</i> , cactos nativos da Chapada Diamantina – BA.	
CAPÍTULO 3	81
Criopreservação de sementes de <i>Discocactus zehntneri</i> , <i>Pilosocereus gounellei</i> e <i>Stephanocereus luetzelburgii</i> .	
CONCLUSÕES GERAIS	93
RESUMO	95
ABSTRACT	96
ANEXO	97
Fórmulas para cálculo das variáveis de germinação	

INTRODUÇÃO GERAL

A família Cactaceae apresenta cerca de 100 gêneros e 1400 espécies distribuídas em uma ampla diversidade de climas e ecossistemas do Novo Mundo, do norte do Canadá à Patagônia, com exceção de *Rhipsalis baccifera*, que também ocorre na África tropical, Madagascar, ilhas no Oceano Índico e Sri Lanka (ANDERSON, 2001; JUDD et al. 2009). Representa a segunda família em ordem de tamanho entre as plantas vasculares endêmicas das Américas, com as Bromeliaceae em primeiro lugar (ZAPPI et al. 2011).

As cactáceas pertencem a ordem Caryophyllales, bem estabelecida com base em sinapomorfias morfológicas e químicas, e, estão subdivididas em quatro subfamílias: Pereskioideae, Maihuenioideae, Opuntioideae e Cactoideae (NOBEL, 2002; MAUSETH, 2006). A subfamília Cactoideae apresenta a maior diversidade vegetal, abrigando cerca de 85% das espécies (BANDYOPADHYAY & SHARMA, 2000; MAUSETH, 2006) e, é a mais representativa no território brasileiro (ZAPPI et al. 2011).

No continente americano, a família possui quatro centros geográficos de diversidade. O leste do Brasil (Figura 1) é o terceiro em ordem de importância, sendo apenas precedido pelo México, sudoeste dos Estados Unidos e cadeia dos Andes, Peru e Bolívia. No território brasileiro, o nordeste e a maior parte do Sudeste, exceto o sul do Rio de Janeiro e o Estado de São Paulo, abrigam 28 dos 37 gêneros nativos, dentre os quais 12 são endêmicos (TAYLOR & ZAPPI, 2004; ZAPPI et al. 2011). A Bahia é um dos centros de dispersão das cactáceas (BARROSO et al. 2002) e um dos estados do leste do Brasil que apresenta o maior número de espécies nativas, entre elas *Discocactus zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* e *Stephanocereus luetzelburgii* (TAYLOR & ZAPPI, 2004).

Discocactus zehntneri (Figura 2A) são plantas moderadas ou fortemente cespitosas, pequenas e globosas, com cinco a sete centímetros de diâmetro e de coloração verde claro e escuro, os frutos são vermelhos, brancos ou esverdeados e partem de um pequeno cefálio terminal (BRITON & ROSE, 1922; NOBEL, 2002; MACHADO et al. 2005). Todas as espécies do gênero *Discocactus* estão ameaçadas de extinção, segundo o Apêndice I do CITES (LUTHY & LUTHY, 2001), e, razões intrínsecas para isso são o pequeno tamanho e número das populações e o habitat

específico no qual se encontram (TAYLOR & ZAPPI, 2004; MACHADO et al. 2005). Segundo TAYLOR & ZAPPI (2004), o *Discocactus zehntneri* subsp. *boomianus*, além dos *D. placentiformis*, *D. horstii*, *D. pseudoinsignis*, estão ameaçados ainda pelo comércio, devido à coleta regular de plantas para produção de sementes, ou de sementes, para a exportação em elevadas quantidades. Além disso, as populações de *D. zehntneri* subsp. *zehntneri* foram reduzidos significativamente em extensão e número devido à inundação da Represa de Sobradinho (barragem, criada em 1970 no Rio São Francisco - Bahia/Pernambuco).

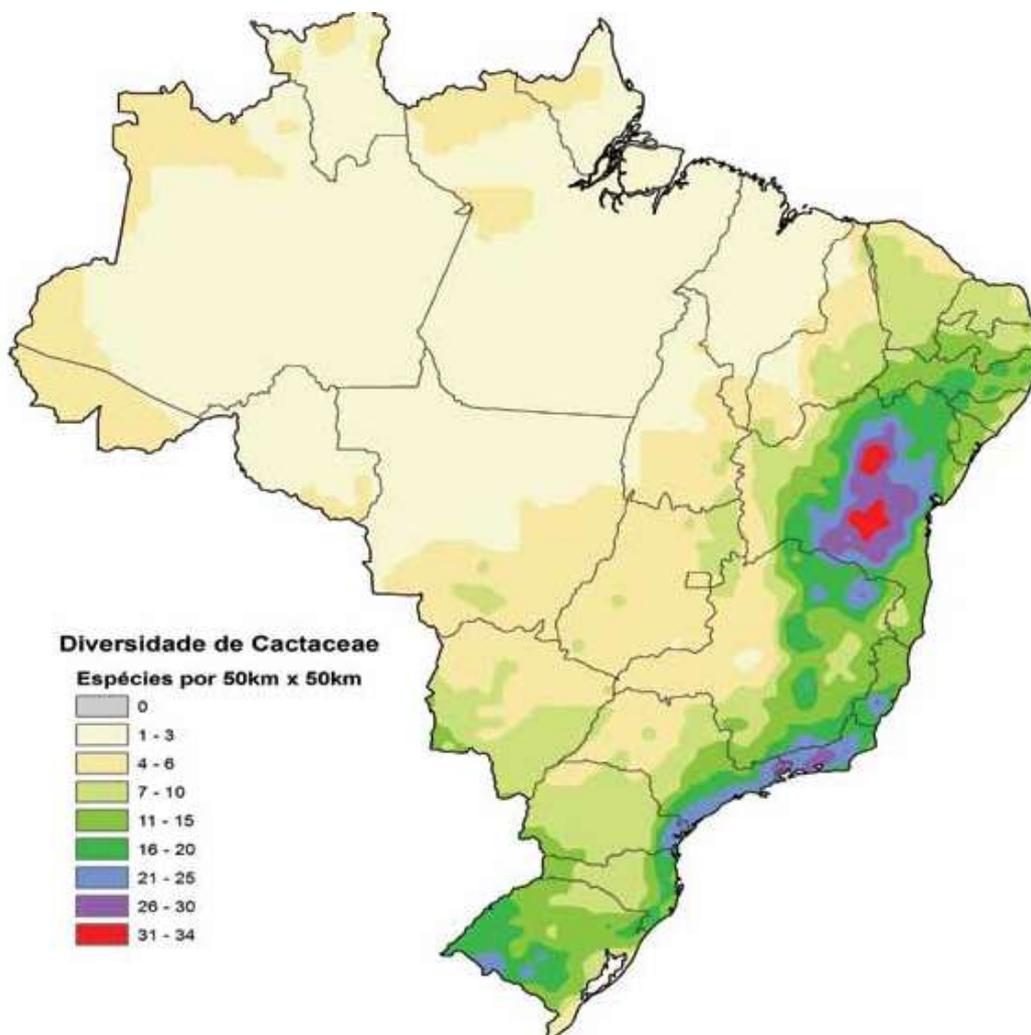


Figura 1: Diversidade de Cactaceae no Brasil (ZAPPI et al. 2011).



Figura 2: *Discocactus zehntneri* (A), *Pilosocereus gounellei* (B) e *Stephanocereus luetzelburgii* (C).

Pilosocereus gounellei (Figura 2B), popularmente conhecido como xiquexique, inclui cactos de hábito arbustivo, moderadamente arbóreo que podem atingir até quatro metros de altura e nove centímetros de diâmetro. Apresenta vários ramos partindo de

uma haste principal, que geralmente são eretas, mas inclina-se para a horizontal com o aumento da idade. Os frutos são globosos, levemente achatados e deiscetes por uma fenda abaxial ou adaxial (ANDERSON, 2001; TAYLOR & ZAPPI, 2004). Apesar de sua ampla distribuição pelo leste brasileiro sua utilização intensiva, principalmente como forragem, tem oferecido riscos às populações naturais (CAVALCANTI & RESENDE, 2007; ARAÚJO et al. 2010).

Stephanocereus luetzelburgii (Figura 2C) é um cacto solitário, ereto, podendo atingir até 1,5 metros de altura e usualmente sem hastes laterais. São popularmente conhecidos como cactos-garrafa, pois na fase juvenil seu tronco, verde escuro, tem um formato globoso, mas quando as plantas atingem a maturidade o novo crescimento desenvolve hastes mais finas e muito mais lã, quando então assume um formato similar ao de uma garrafa. Seus frutos globosos são inicialmente verdes, tornando-se em estádios mais sucessionais do desenvolvimento, azuis. *S. luetzelburgii* é endêmico da Chapada Diamantina - Bahia, onde é encontrado no Parque Nacional da Chapada Diamantina (MACHADO, 1999; ANDERSON, 2001; TAYLOR & ZAPPI, 2004). Em 2006, foi uma das espécies alvo selecionada no Workshop “Alvos Prioritários para a Conservação da Biodiversidade da Bacia do São Francisco” promovido pela Secretaria de Políticas para o Desenvolvimento Sustentável em parceria com o IBAMA.

Segundo TAYLOR & ZAPPI (2004) diversos argumentos suportam a necessidade de conservação das cactáceas do leste do Brasil e, talvez o mais forte seja o grau de singularidade em termos de gêneros e espécies endêmicas, com relação às Américas como um todo. Segundo estes autores, outro argumento convincente a favor da conservação dessas espécies é seu potencial econômico. Várias espécies de cactos têm sido utilizadas para fins ornamentais (ROSAS et al. 2001; CHOREÑO-TAPIA et al. 2002; SANTOS-DÍAZ et al. 2003; SRISKANDARAJAH & SEREK, 2004; DÁVILA-FIGUEROA et al. 2005; RAMIREZ-MALAGON et al. 2007; ESTRADA-LUNA et al. 2008; RUVALCABA-RUIZ et al. 2010), alimentícios (PELAH et al. 2002; VASCONCELOS et al. 2007; SHEDBALKAR et al. 2010; ARAÚJO et al. 2010; LISBÔA et al. 2012; ZOGHLAMI et al. 2012) e medicinais (TESOURIERE et al. 2004; ANDRADE et al. 2006; SHEDBALKAR et al. 2010). Além disso, há relatos sobre a sua utilização para prevenção de erosão do solo, como cercas vivas e para fitorremediação (SHEDBALKAR et al. 2010).

Devido à elevada diversidade e valor, principalmente ornamental, as populações naturais da família têm sido drasticamente afetadas tanto com a coleta ilegal quanto com a destruição e fragmentação de habitat (HUBSTENBERGER et al. 1992; ROJAS-ARÉCHIGA & VÁZQUEZ-YANES, 2000; ROSAS et al. 2001; SANTOS-DÍAZ et al. 2003; DÁVILA-FIGUEROA et al. 2005; ZAPPI et al. 2011). Segundo ROJAS-ARÉCHIGA & VÁZQUEZ-YANES (2000) é urgente a necessidade de estudos de propagação da família Cactaceae, pois estes constituem uma alternativa para a conservação desta família. Contudo, os métodos de propagação convencionais são inadequados para a multiplicação de inúmeras espécies de cactos que apresentam crescimento lento e baixos índices de produção de sementes, germinação e brotação (HUBSTENBERGER et al. 1992; MALDA et al. 1999; SRISKANDARAJAH & SEREK, 2004; DÁVILA-FIGUEROA et al. 2005; KHALAFALLA et al. 2007; ESTRADA-LUNA et al. 2008).

A micropropagação tem sido uma alternativa aos métodos convencionais de propagação de cactáceas por permitir uma rápida multiplicação de mudas livres de patógenos a partir de pouco material vegetal (HUBSTENBERGER et al. 1992; PEREZ-MOLPHE-BALCH & DÁVILA-FIGUEROA, 2002; GIUSTI et al. 2002; SUDHERSAN et al. 2003; ROUT et al. 2006; SHEDBALKAR et al. 2010). No entanto, apesar de algumas espécies de cactáceas já apresentarem protocolos de multiplicação estabelecidos (MALDA et al. 1999; ROSAS et al. 2001; PEREZ-MOLPHE-BALCH & DÁVILA-FIGUEROA, 2002; GIUSTI et al. 2002; CHOREÑO-TAPIA et al. 2002; SANTOS-DÍAZ et al. 2003; DÁVILA-FIGUEROA et al. 2005; RAMIREZ-MALAGON et al. 2007; RUBIO & BARRERA et al. 2009; RUVALCABA-RUIZ et al. 2010) esses estudos ainda são escassos se comparados com os conhecimentos já obtidos para outras famílias de plantas, sobretudo para as espécies nativas (MOEBIUS-GOLDAMMER et al. 2003; ZAPPI et al. 2011). Até o momento, não há relatos na literatura de trabalhos envolvendo a micropropagação das três espécies em estudo.

A micropropagação pode ser dividida em três etapas: estabelecimento das culturas, que deve garantir o crescimento de tecidos e órgãos livres de algas, bactérias, fungos e outros contaminantes; o aumento dos propágulos, que envolve a multiplicação do número de brotos ou embriões somáticos e preparo para a transferência no solo que abrange a separação e a seleção de propágulos a fim de se obter um alto índice de sobrevivência no ambiente externo (GEORGE, 1993).

O sucesso no estabelecimento *in vitro* dos cactos pode ser comprometido devido a morfologia da maioria das espécies, repleta de espinhos e pelos, que facilita a presença de uma grande variedade de microorganismos (MERCIER & KERBAUY, 1994; MEDEIROS et al. 2006; CHÁVEZ et al. 2006). Nesse contexto, o estabelecimento *in vitro* através de sementes pode ser uma alternativa mais apropriada, não somente em virtude da maior facilidade para a desinfestação, mas também pela manutenção da variabilidade genética das plantas micropropagadas (MERCIER & NIEVOLA, 2003).

A germinação envolve numerosos eventos que tem início com a embebição de água pela semente e terminam com a emergência da radícula (BEWLEY & BLACK, 1994). As sementes germinam quando as condições de luz, temperatura e potencial hídrico são favoráveis e quando não apresentam nenhum tipo de dormência (ROJAS-ARÉCHIGA et al. 2001; BORGHETTI, 2004; KERBAUY, 2004; CARDOSO, 2009). Diversos representantes da família Cactaceae apresentam sementes que mesmo sob condições favoráveis mostram alguma restrição à germinação (OLVERA-CARRILO et al. 2003; MÉNDEZ, 2007; GUEDES et al. 2009).

Conforme o mecanismo de bloqueio, a dormência pode ser classificada como física, quando o bloqueio é imposto pelo tegumento, ou fisiológica quando o impedimento à germinação encontra-se no próprio embrião (BORGHETTI, 2004). As giberelinas (GA_3) podem favorecer a germinação de algumas sementes por promover a síntese de enzimas envolvidas no enfraquecimento do tegumento (expansinas) e/ou hidrólise de reservas (amilase) além de atuar no silenciamento de genes envolvidos com a manutenção da dormência (BEWLEY, 1997; BORGHETTI, 2004; TAIZ & ZEIGER, 2004). No entanto, quando o bloqueio à germinação é causado pela impermeabilidade no tegumento, a utilização de ácidos fortes, como o ácido sulfúrico (H_2SO_4), pode promover a ruptura da testa das sementes e, conseqüentemente, favorecer a germinação (ZAIDAN & BARBEDO, 2004).

A luz e temperatura também são fatores importantes tanto na indução quanto na quebra da dormência (BEWLEY & BLACK, 1994; HARTMANN, 2011). A luz regula a germinação através do pigmento fitocromo, principal agente envolvido com a percepção do sinal luminoso, que sob sua forma ativa (F_{ve}) modula a transcrição de sinais e a expressão de genes relacionados com a germinação (BORGHETTI, 2004). Por outro lado, a temperatura regula a ativação e/ou inativação de proteínas durante reações

metabólicas e contribui para o amolecimento do tegumento de espécies que possuem camadas hidrofóbicas que limitam a entrada de água na semente (BEWLEY & BLACK, 1994; PEREZ, 2004).

Ainda são escassos os estudos com relação aos requerimentos necessários para a germinação dos representantes da família Cactaceae (ROJAS-ARÉCHIGA et al. 1997) e quase todas as publicações sobre germinação de sementes se referem a espécies de outros centros de diversidade (ZAPPI et al. 2011).

Apesar da micropropagação aumentar o número de indivíduos de um genótipo específico, a propagação clonal não garante a conservação da diversidade genética de uma dada espécie, a menos que o material vegetal utilizado para iniciação das culturas seja de fato, representativo (PENCE, 2010). Além disso, as subculturas, os reguladores vegetais e outros componentes do meio de cultura podem gerar variação somaclonal, promovendo modificações genéticas no material propagado (SARASAN, 2006).

A criopreservação pode ser uma alternativa para manutenção da integridade genética dos recursos fitogenéticos, pois esta técnica é capaz de interromper todo o metabolismo celular e tem sido considerada a maneira mais promissora de preservação a longo prazo para células, tecidos e órgãos vegetais. A partir desses explantes, poderão ser regeneradas plantas em qualquer época, sem risco de variações genéticas no material preservado (CARVALHO & VIDAL, 2003). Além da manutenção da integridade genética, o pequeno espaço necessário para a instalação do banco de germoplasma bem como o baixo custo associado ao armazenamento dos materiais biológicos e a proteção contra a contaminação, têm sido vantagens frequentemente associadas a técnica criogênica (ALMEIDA et al. 2002; ENGELMANN, 2010).

A formação de cristais de gelo intracelular durante o congelamento das culturas é o principal desafio da criopreservação, pois estes podem causar a ruptura do sistema de endomembranas e resultar na perda da semi-permeabilidade e da compartimentalização celular (SANTOS, 2001; KAVIANI et al. 2009; GOLDFARB et al. 2010). Portanto, apesar da criopreservação ser aplicada a diversos tipos de explantes, materiais biológicos com baixos teores de umidade geralmente são mais favoráveis ao congelamento (GOLDFARB et al. 2010).

A conservação de sementes é a forma mais fácil, comum e eficiente de conservação *ex situ* pois, garante a variabilidade genética, são fáceis de coletar e ocupam um pequeno espaço (SANTOS, 2001; LI & PRITCHARD, 2009; GOLDFARB et al. 2010; PENCE, 2010). Além disso, o tamanho reduzido das sementes possibilita um congelamento mais eficiente uma vez que a desidratação e o congelamento ocorrem de forma mais rápida e uniforme em estruturas menores (CARVALHO & VIDAL, 2003).

Objetivo geral

Estabelecer protocolos para a germinação, estabelecimento e propagação *in vitro* e avaliar a qualidade fisiológica de sementes de *Discocactus zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* e *Stephanocereus luetzelburgii* armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C).

Objetivos específicos

1. Analisar o efeito do meio de cultura e do carvão ativado na germinação *in vitro*;
2. Verificar a viabilidade das sementes de *Discocactus zehntneri* e *Stephanocereus luetzelburgii* através do teste de tetrazólio;
3. Avaliar o efeito da luz e de temperaturas constantes e alternadas na germinação de sementes de *D. zehntneri*;
4. Analisar o efeito da pré-embebição em água (H₂O) e dos ácidos giberélico (GA₃) e sulfúrico (H₂SO₄) na germinação de sementes de *D. zehntneri* e *S. luetzelburgii*;
5. Verificar o efeito de diferentes meios de cultura e subculturas no crescimento *in vitro*;
6. Avaliar a morfogênese *in vitro* sob a ação de diferentes tipos e concentrações de reguladores vegetais, diferentes tipos e idades fisiológicas de explantes e sob ação de injúrias mecânicas;

7. Analisar o efeito do ácido indolbutírico (AIB) e do carvão ativado no enraizamento *in vitro* de brotos de *Pilosocereus gounellei*;
8. Testar o substrato na aclimatização *P. gounellei*;
9. Testar o tamanho mínimo de brotos na aclimatização de *S. luetzelburgii*;
10. Avaliar a qualidade fisiológica de sementes armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) por períodos de 0, 7 e 30 dias.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F. A. C. Crioconservação das sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 6, n.2, p.295-302, 2002.
- ANDERSON, Edward F. **The Cactus Family**. Portland: Timber Press, 2001. 776p.
- ANDRADE, C. T. S.; MARQUES, J. G. W.; ZAPPI, D. C. Utilização medicinal de cactáceas por sertanejos baianos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.3, p.36-42, 2006.
- ARAUJO, K. D. et al. Uso de espécies da Caatinga na alimentação de rebanhos no município de São João do Cariri – PB. **Editora UFPR**, n.20, p.157-171, 2010.
- BANDYOPADHYAY, B; SHARMA, A. The use of multivariate analysis of karyotypes to determine relationships between species of *Opuntia* (Cactaceae). **Caryologia**, v.2, n. 53, p.121-126, 2000.
- BARROSO, Grasiela Marciel et al. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. vol. 1. 2 ed., Viçosa: UFV, 2002. 309p.
- BEWLEY, J. Derek; BLACK, Michael. **Seeds: Physiology of Development and Germination**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.
- BEWLEY, J. D. Seed Germination and Dormancy. **The Plant Cell**, v.9, p.1055-1066, 1997.

BORGHETTI, Fabian. Dormência embrionária. Interpretação de resultados de germinação. In: FERREIRA, Alfredo Gui; BORGHETTI, Fabian. **Germinação do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. Cap. 6, p.109-123.

BRITTON, N. L.; ROSE, J. N. **Descriptions and Illustrations of Plants of the Cactus Family**. v. 3. Washington: The Carnegie Institution of Washington, 1922. 314 p.

CARDOSO, V. J. M. Conceito e classificação da dormência em sementes. **Oecologia Brasiliensis**, v.13, n.4, 2009.

CARVALHO, Julita Maria Frota Chagas; VIDAL, Márcia Soares. **Crioconservação no Melhoramento Vegetal**. Campina Grande: Embrapa, 2003. 22p.

CAVALCANTI, N. B.; RESENDE, G. M. Consumo de Xiquexique (*Pilocereus gounellei* (A. Weber ex K. Schum.) Bly. ex Rowl) por caprinos no semi-árido da Bahia. **Revista Caatinga**, v.20, n.1, p.22-27, 2007.

CHÁVEZ, L. C. et al. La germinación in vitro una alternativa para obtener explantes en cactáceas. **Zonas Áridas**, n.10, p.129-133, 2006.

CHOREÑO-TAPIA, J. M. et al. Propagación in vitro de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer a partir de aréolas. **Revista Chapingo Serie Horticultura**, v.8, n.2, p. 183-196, 2002.

DÁVILA-FIGUEROA, C. A. et al. *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbincarpus* (Cactaceae). **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v. 41, p.540–545, 2005.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v.47, p.5-16, 2010.

ESTRADA-LUNA, A. A. et al. *In vitro* micropropagation of the ornamental prickly pear cactus *Opuntia lanigera* Salm–Dyck and effects of sprayed GA₃ after transplantation to *ex vitro* conditions. **Scientia Horticulturae**, v.117, p.378–385, 2008.

GEORGE, Edwin. F. **Plant propagation by tissue culture. Part. 1. The Technology**, 2ed. Edington: Exegetics, 1993. 574p.

GIUSTI, P. et al. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. **Scientia Horticulturae**, v.95, p.319-332, 2002.

GOLDFARB, M.; DUARTE, M. E. M.; MATA, M. E. R. M. Armazenamento criogênico de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) Euphorbiaceae. **Biotemas**, v.23, n.1, p.27-33, 2010.

GUEDES, R. S. et al. Germinação e vigor de sementes de *Opuntia ficus-indica* Mill. após tratamentos para superar a dormência. **Revista Caatinga**, v.22, n.4, p.20-26, 2009.

HARTMANN, Hudson T. **Plant Propagation: principles and practices**. 8 ed. United States: Pearson, 2011. 915p.

HUBSTENBERGER, J. F.; CLAYTON, P. W.; PHILLIPS, G. C. Micropropagation of Cacti. In: BAYAY, Y. P. S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. v. 20. Berlin: Springer, 1992. Cap. 4, p.49- 68.

JUDD, Walter S. et al. **Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 612p.

KAVIANI, B. et al. Cryopreservation of seeds of lily [*Lilium Iedebourii* (Baker) Bioss]: use of sucrose and dehydration. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.16, p.3809-3810, 2009.

KERBAUY, Gilberto Barbante. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2004. 452 p.

KHALAFALLA, M. M. et al. Micropropagation of cactus (*Opuntia ficus-indica*) as strategic tool to combat desertification in arid and semi arid regions. **International Journal of Sustainable Crop Production**, v.2, n.4, p.1-8, 2007.

LI, D.; PRITCHARD, H. W. The science and economics of *ex situ* plant conservation. **Trends in Plant Science**, v.14, n.11, p.614-621, 2009.

LISBÔA, C. G. C. et al. Armazenamento de figo-da-índia em pó. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.16, n.2, p.216–221, 2012.

LÜTHY, J. M.; LÜTHY, J. **The Cacti of CITES**. Appendix I. Switzerland: Bundesamt für Veterinärwesen. 2001, p. 47.

MACHADO, M. C. et al. Taxonomy and conservation of the *Discocactus* Pfeiff. (Cactaceae) species occurring in the state of Bahia, Brazil. **Bradleya**, v. 23, p.41-56, 2005.

MACHADO, M. C. The cacti of Morro do Chapéu, Bahia, Brazil. **British Cactus and Succulent Society**, v.17, n. 4, p.203-213, 1999.

MALDA, G.; SUZÁN, H.; BACKHAUS, R. In vitro cultura as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. **Scientia Horticulturae**, v.81, p.71-87, 1999.

MAUSETH, J. D. Structure-function relationships in highly modified shoots of Cactaceae. **Annals of Botany**, v.98, p.901-926, 2006.

MEDEIROS, L. A. et al. *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.84, p.165-169, 2006.

MÉNDEZ, E. Germination of *Denmoza rhodacantha* (Salm-Dyck) Britton & Rose (Cactaceae). **Journal of Arid Environments**, v.68, p.678–682, 2007.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. *In vitro* culture of *Vriesea hieroglyphica*, an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic florest. **Journal Bromeliad Society**, v.44, p.120-124, 1994.

MERCIER, H.; NIEVOLA, C. C. Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. **Vidalia**, v.1, p.57-62, 2003.

MOEBIUS-GOLDAMMER, K. G. et al. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (lem.) k. schum. (Cactaceae), an endemic and endangered mexican species. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v.39, p.388–393, 2003.

NOBEL, Park S. **Cacti: Biology and Uses**. California: Regents of the University of California, 2002. 280 p.

OLVERA-CARRILLO, Y. et al. Germination of the hard seed coated *Opuntia tomentosa* S.D., a cacti from the México valley. **Journal of Arid Environments**, v.55, p.29–42, 2003.

PELAH, D. et al. Organogenesis in the vine cactus *Selenicereus megalanthus* using thidiazuron. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.71, p.81–84, 2002.

PENCE, V. C. The possibilities and challenges of *in vitro* methods for plant conservation. **Kew Bulletin**, v.65, p.539–547, 2010.

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**, v.38, p.73–78, 2002.

PEREZ, Sônia Cristina Juliano Gualtieri de Andrade. Envoltórios. In: FERREIRA, Alfredo Gui; BORGHETTI, Fabian. **Germinação do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. Cap. 7, p.125-134.

RAMIREZ-MALAGON, R. et al. *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v.43, p.660–665, 2007.

ROJAS-ARÉCHIGA, M.; CASAS, A.; VÁSQUEZ-YANES, C. Seed germination of wild and cultivated *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) from the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Central México. **Journal of Arid Environments**, v.49, p.279-287, 2001.

ROJAS-ARÉCHIGA, M.; OROZCO-SEGOVIA, A.; VÁSQUEZ-YANES, C. Effect of light on germination of seven species of cacti from the Zapotitlán Valley in Puebla, México. **Journal of Arid Environments**, v.36, p.571–578, 1997.

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

ROSAS, M. M. et al. Micropropagation of *Turbinicarpus laui* glass et foster, an endemic and endangered species. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v.37, p.400-404, 2001.

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**, v.24, p.531–560, 2006.

RUBIO, O. R. G.; BARRERA, G. X. M. Conservation *in situ* and *ex situ* of *Mammillaria mathildae*, endemic, endangered cacti of Querétaro City. **Ciencia@uaq**, v.2, n.1, p.3-16, 2009.

RUVALCABA-RUIZ, D.; ROJAS-BRAVO, D.; VALENCIA-BOTÍN, A. J. Propagación *in vitro* de *Coryphantha retusa* (Britton & Rose) un cactus endémico y amenazado. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v.12, p.139-143, 2010.

SANTOS-DÍAZ, M. S. et al. *In vitro* organogenesis of *Pelecypora aselliformis* erhenberg (Cactaceae). **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v.39, p. 480–484, 2003.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação do germoplasma vegetal. **Biociência**, n.20, p.60-65, 2001.

SARASAN, V. Conservation *in vitro* of threatened plants – progress in the past decade. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v.42, p.206–214, 2006.

SHEDBALKAR, U. U. et al. *Opuntia* and other cacti: applications and biotechnological insights. **Tropical Plant Biology**, v.3, p.136-150, 2010.

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

SUDHERSAN, C.; ABOEL-NIL, M.; HUSSAIN, J. Tissue culture technology for the conservation and propagation of certain native plants. **Journal of Arid Environments**, v.54, p.133-147, 2003.

TAIZ, Lincoln.; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia Vegetal**. 3ed, Porto alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TAYLOR, Nigel; ZAPPI, Daniela. **Cacti: of Eastern Brazil**. Richmond, Surrey: Royal Botanic Gardens, Kew, 2004. 499 p.

TESOURIERE, L. et al. Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C¹⁻³. **American Society for Clinical Nutrition**, v.80, p.391–395, 2004.

VASCONCELOS, A. G. V. et al. Micropropagação de palma forrageira cv. Miúda (*Nopalea cochenillifera* - Salm Dyck). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.2, n.1, p.28-31, 2007.

ZAPPI, Daniela. et al. **Plano de ação nacional para conservação das cactáceas**. Brasília: Instituto Chico Mendes de conservação da biodiversidade, ICMBio, 2011, 113p.

ZAIDAN, Lilian B. P. & BARBEDO, Claudio J. Quebra de dormência em sementes. In: FERREIRA, Alfredo Gui; BORGHETTI, Fabian. **Germinação do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. Cap. 8, p.135-146.

ZOGLAMI, G. et al. Genetic stability of long-term micropropagated *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. plantlets as assessed by molecular tools: perspectives for *in vitro* conservation. **Industrial Crops and Products**, v.36, p. 59-64, 2012.

CAPÍTULO 1

Estabelecimento *in vitro* e crescimento inicial de *Discocactus zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* e *Stephanocereus luetzelburgii*, cactáceas nativas da Chapada Diamantina – BA

RESUMO

A família Cactaceae possui distribuição neotropical, incluindo cerca de 100 gêneros e 1400 espécies. Muitos representantes das cactáceas, como espécies dos gêneros *Discocactus*, *Pilosocereus* e *Stephanocereus*, apresentam populações que vêm sendo impactadas de diversas maneiras e a micropropagação pode ser uma estratégia para diminuir as agressões sob as populações naturais. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar a germinação e o crescimento *in vitro* para *Discocactus zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* e *Stephanocereus luetzelburgii*, cactáceas nativas da Chapada Diamantina, Bahia. Na germinação *in vitro* de sementes foram testadas a influência de diferentes concentrações do meio MS, do carvão ativado, de temperaturas constantes e alternadas, da luz branca e da pré-embebição em água e nos ácidos giberélico (GA₃) e sulfúrico (H₂SO₄). Para a análise do crescimento *in vitro* plantas oriundas da germinação foram inoculadas nos meios MS e MS/2 e submetidas a zero ou três repicagens. Os meios MS e MS/2 apresentaram os melhores resultados para a germinabilidade de *P. gounellei* e *S. luetzelburgii* e o carvão ativo reduziu o tempo médio de germinação de *D. zehntneri* e aumentou a germinabilidade de *S. luetzelburgii*. Além disso, foi verificado também que sementes de *D. zehntneri* são fotoblásticas neutras e que o tratamento com GA₃ aumentou a sua germinabilidade. O meio MS/2 favoreceu o crescimento de *P. gounellei* enquanto o MS foi mais efetivo para o cultivo de *S. luetzelburgii* e as repicagens favoreceram o crescimento das três espécies em estudo.

PALAVRAS-CHAVE: crescimento *in vitro*; dormência; germinação *in vitro*; repicagens

ABSTRACT

The Cactaceae family has neotropical distribution, including about 100 genera and 1400 species. Many members of this family, such as species of the genera *Discocactus*, *Pilosocereus* and *Stephanocereus*, have populations that have been impacted in several ways and micropropagation can serve as a strategy to reduce the aggressions on natural populations. Therefore, the objective of this study was to analyze germination and *in vitro* growth for *Discocactus zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* e *Stephanocereus luetzelburgii*, cacti native to Chapada Diamantina, Bahia. For seed germination, the influence of different concentrations of MS medium, of activated charcoal, of constant and alternating temperatures, of white light and of pre-soaking in water as well as in gibberelic (GA₃) and sulfuric (H₂SO₄) acids were tested. To analyze growth, plants originated from *in vitro* germination were inoculated in MS and MS/2 and submitted to zero or three subcultures. The MS and MS/2 media present the best results for germinability for *P. gounellei* and *S. luetzelburgii* and the activated charcoal decreased the mean time of germination for *D. zehntneri* and increased the germination of *S. luetzelburgii*. Furthermore, it was verified that the seeds of *D. zehntneri* are neutral photoblastic and that GA₃ increased germinability. The MS/2 medium favored growth of *P. gounellei* while the MS was more effective for cultivating *S. luetzelburgii*, and the subcultures favored growth of the three species in this study.

KEYWORDS: dormancy; *in vitro* growth; *in vitro* germination; subcultures

INTRODUÇÃO

A família Cactaceae apresenta cerca de 100 gêneros e 1400 espécies tipicamente americanas com exceção de *Rhipsalis baccifera*, que também ocorre na África tropical, Madagascar e ilhas do Oceano Índico e Sri Lanka (ANDERSON, 2001; JUDD et al. 2009). Nas Américas, a família possui quatro centros geográficos de diversidade e o leste do Brasil é o terceiro em ordem de importância abrigando 28 dos 37 gêneros brasileiros, dentre os quais 12 são endêmicos desta região (TAYLOR & ZAPPI, 2004).

Em virtude da elevada diversidade e valor, principalmente ornamental, diversos representantes da família estão sujeitos à intensa exploração por ação de colecionadores bem como por perturbações de diversas naturezas em seus habitat. Neste contexto, estudos de propagação constituem uma alternativa para a conservação desta família (ROJAS-ARÉCHIGA & VÁZQUEZ-YANES, 2000). Contudo, visto que métodos convencionais de propagação são freqüentemente inadequados para cactáceas com sementes dormentes e com baixos índices de germinação, crescimento e brotação, a cultura de tecidos vegetais pode ser uma alternativa para a multiplicação destas espécies (HUBSTENBERGER et al. 1992; MALDA et al. 1999a; SANTOS-DÍAZ et al. 2003; SRISKANDARAJAH & SEREK, 2004; RAMIREZ-MALAGON et al. 2007; ESTRADA-LUNA et al. 2008).

A micropropagação visando à conservação das espécies deve assegurar a manutenção da variabilidade genética. Portanto, para o estabelecimento *in vitro* é interessante a utilização de plantas oriundas da germinação *in vitro* de sementes derivadas de diferentes populações (MERCIER & NIEVOLA, 2003). Outra vantagem do estabelecimento através de sementes decorre da maior facilidade na desinfestação quando comparadas com tecidos extraídos de plantas nativas cuja morfologia, repleta de espinhos e pelos, facilita a presença de uma grande variedade de microorganismos (MERCIER & KERBAUY, 1994; CHÁVEZ et al. 2006; MEDEIROS et al. 2006).

A germinação envolve numerosos eventos que tem início com a embebição de água pela semente e terminam com a emergência da radícula (BEWLEY & BLACK, 1994). A capacidade (germinabilidade) e a velocidade (vigor) da germinação são influenciadas por diversos fatores extrínsecos, como a luz, temperatura e potencial hídrico, e intrínsecos, como viabilidade e dormência (ROJAS-ARÉCHIGA et al. 2001; KERBAUY, 2004). No entanto, devido a ausência de um padrão claro sobre os

mecanismos que promovem a germinação de espécies da família Cactaceae (ROJAS-ARÉCHIGA et al. 2011) são necessários o estabelecimento de protocolos específicos, sobretudo para espécies nativas, uma vez que quase todas as publicações se referem a espécies de outros centros de diversidade (ZAPPI et al. 2011).

Neste contexto, objetivou-se com este trabalho, analisar a germinação e o crescimento *in vitro* de *Discocactus zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* e *Stephanocereus luetzelburgii*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Frutos maduros de *Discocactus zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* e *Stephanocereus luetzelburgii* foram coletados de diferentes populações em maio e agosto de 2010, nos municípios de Morro do Chapéu e Mucugê, Chapada Diamantina - BA. Após serem retiradas dos frutos, as sementes foram secas em papel de filtro, beneficiadas e posteriormente armazenadas em sacos de papel craft à temperatura ambiente até a instalação dos experimentos. Para os ensaios de germinação, as sementes foram desinfestadas quimicamente por um minuto em álcool absoluto e 15 minutos em hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) e, em seguida, lavadas três vezes em água estéril. Os experimentos de germinação descritos abaixo foram instalados dois a quatro meses após a coleta das sementes.

Efeito do meio de cultura e do carvão ativado na germinação de sementes in vitro

Sementes de *D. zehntneri*, *P. gounellei* e *S. luetzelburgii* previamente desinfestadas foram inoculadas em frascos de vidro de 250 mL contendo 50 mL de ágar e dos meios MS (MURASHIGUE & SKOOG, 1962) e MS com metade da concentração salina (MS/2) suplementados com 30 e 15g L⁻¹ de sacarose respectivamente, na ausência ou presença (2 g L⁻¹) de carvão ativado. Os meios de cultura foram solidificados com 6,5 g L⁻¹ de ágar, tiveram o pH aferido para 5,6 - 5,8 e foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C.

Teste de tetrazólio para análise da viabilidade de sementes

O teste de tetrazólio para análise da viabilidade de sementes de *D. zehntneri* e *S. luetzelburgii* foi realizado segundo VEIGA-BARBOSA et al. (2010). Cinco repetições de 10 sementes tiveram o seu opérculo removido com o auxílio de um bisturi e, em seguida, foram submetidas a embebição em água por 24h. Posteriormente, as sementes foram imersas em solução de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio a 0,6% por 24h a temperatura ambiente. No dia seguinte, as sementes tiveram suas testas rompidas com o auxílio de um bisturi para análise da coloração do embrião a olho nu. Foram consideradas viáveis as sementes cujo embrião apresentou coloração avermelhada.

Efeito da luz e de temperaturas constantes e alternadas na germinação

Sementes de *D. zehntneri* previamente desinfestadas foram inoculadas em placas de petri forradas com duas folhas de papel germitest previamente esterilizadas em autoclave e umedecidas com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa do papel. As amostras foram mantidas em câmara de germinação e submetidas às temperaturas constantes de 25°C e 30°C e alternadas de 25-30°C sob luz branca fluorescente e fotoperíodo de 12 horas ou escuro (somente a 25°C). Para o tratamento na ausência de luz as placas de petri foram embaladas com folhas de papel alumínio.

Efeito da pré-embebição em água (H₂O) e dos ácidos giberélico (GA₃) e sulfúrico (H₂SO₄) na germinação de sementes in vitro

Sementes de *D. zehntneri* e *S. luetzelburgii* foram submetidas à pré-tratamentos para quebra de dormência que consistiram em pré-embebição em água e em GA₃ 500 mg L⁻¹ ou 1000 mg L⁻¹ por duas horas e escarificação química em ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 98% por cinco ou dez minutos. Posteriormente, foram desinfestadas quimicamente por um minuto em álcool absoluto e 15 minutos em hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) e, em seguida, lavadas três vezes em água estéril. Após a desinfestação, as sementes foram inoculadas em frascos de vidro de 250 mL contendo 50 mL de meio MS/2 suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 6,5 g L⁻¹ de ágar. O meio de cultura teve o pH aferido para 5,6 - 5,8 e foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C.

Efeito do meio de cultura e de repicagens no crescimento in vitro de plantas

Plantas de *D. zehntneri*, *P. gounellei* e *S. luetzelburgii* oriundas da germinação *in vitro* com aproximadamente seis semanas e medindo de 4 a 8 mm foram inoculadas nos meios MS e MS/2 suplementados com 30 e 15g L⁻¹ de sacarose respectivamente, e, repicadas ou não por três vezes no intervalo mínimo de um mês. Os meios de cultura tiveram o pH aferido para 5,6 - 5,8 e foram esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C.

Variáveis analisadas, delineamento experimental e análise estatística

Germinação. As avaliações foram diárias por no mínimo 28 dias e foi considerada germinada a semente cuja radícula media mais que dois milímetros. As variáveis analisadas foram baseadas em SANTANA & RANAL (2000) e consistiram de: frequência relativa de germinação (Fr), germinabilidade (%G), tempo médio de germinação (TMG), índice de velocidade de germinação (IVG) e coeficiente de uniformidade de germinação (CUG).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições de 25 sementes cada. Para a análise dos diferentes meios de cultura foi realizado um arranjo fatorial 3 x 2 (meios x carvão ativo). Com o objetivo de quebrar a dependência entre a média e a variância, a germinabilidade, expressa em porcentagem, foi transformada em arco-seno.

Crescimento. Após 21 semanas as variáveis analisadas foram: diâmetro da parte aérea (DPA), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da maior raiz (CMR), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca do sistema radicular (MSSR).

O delineamento foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2 x 2 (meios x repicagem). Para *P. gounellei* e *S. luetzelburgii* foram utilizadas cinco repetições com cinco plantas e para *D. zehntneri*, devido o número reduzido de plantas, quatro repetições com quatro plantas cada.

Em todos os tratamentos, foi realizada a análise de variância e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico Sisvar 5.1 (FERREIRA, 2008).

Condições de cultivo

Exceto o experimento para análise de luz e temperatura, após a inoculação as unidades experimentais foram mantidas em sala de crescimento com $25 \pm 3^\circ \text{C}$ sob luz fluorescente ($60 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$) e fotoperíodo de 16 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Viviparidade em sementes de *Discocactus zehntneri*

Durante o beneficiamento das sementes foi observado que apenas *D. zehntneri* apresentou sementes com germinação precoce, isto é, viviparidade (Figura 1). A germinação prematura das sementes dentro do fruto também já foi reportada para outras espécies da família como *Epiphyllum phyllanthus* (COTA-SÁNCHEZ & ABREU, 2007), *E. guatemalense*, *Echinocactus platyacanthus*, *Ferocactus peninsulae*, *Lepismium bolivianum*, *Leptocereus arboreus*, *L. scopulophilus*, *Leuchtenbergia principis*, *Melocactus concinnus*, *M. curvispinus*, *M. ernestii*, *M. paucispinus*, *Pachycereus pecten-aboriginum*, *Rhipsalis baccifera* subsp. *baccifera*, *R. floccosa* subsp. *pittieri*, *Weberocereus panamensis* (COTA-SÁNCHEZ et al. 2011), *Ferocactus herrerae*, *Pachycereus schottii*, *Stenocereus alamoensis*, *S. turberi* (COTA-SÁNCHEZ et al. 2007) *Disocactus martianus*, *Lepismium ianthothele*, *L. monacanthum*, *Rhipsalis micrantha* forma *micrantha*, *R. baccifera* subsp. *horrida*, *Cleistocactus smaragdiflorus*, *Harrisia martinii* e o híbrido *Epiphyllum X Fern La Borde* (COTA-SÁNCHEZ, 2004).

Apesar de estudos com 25 espécies de cactos afirmarem que a viviparidade não é comum na família (ORTEGA-BAES et al. 2010) há evidências convincentes que, dentre as angiospermas, Cactaceae é uma das poucas famílias de plantas com alta incidência, cerca de 3,7%, de germinação precoce (COTA-SÁNCHEZ et al. 2011).

Esse desenvolvimento ininterrupto do embrião com a semente ainda ligada à planta mãe pode ser resultado da ausência e/ou insensibilidade ao ácido abscísico (ABA) durante o estágio de desenvolvimento da semente (BEWLEY & BLACK, 1994; CARDOSO, 2004; COTA-SÁNCHEZ et al. 2011; HARTMANN, 2011) bem como a

diferentes fatores fisiológicos, genéticos e ecológicos, atuantes de forma individual ou em conjunto (COTA-SÁNCHEZ et al. 2011).

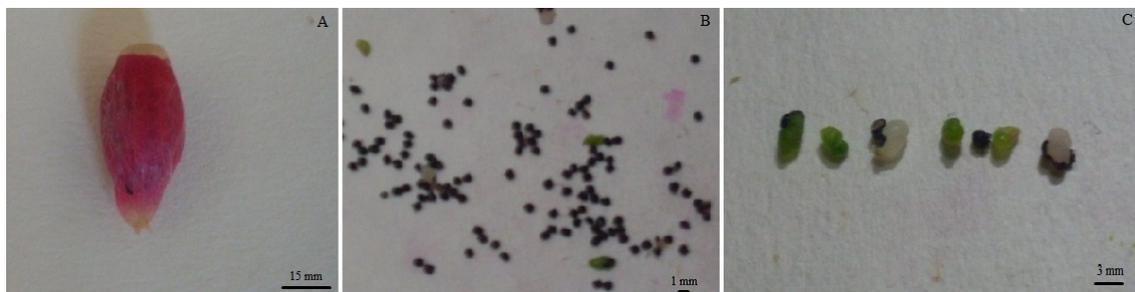


Figura 1. Fruto de *Discocactus zehntneri* (A), beneficiamento (B) e viviparidade das sementes (C).

A viviparidade favorece a germinação, dispersão a curta distância e estabelecimento das plantas (COTA-SÁNCHEZ, 2004; COTA-SÁNCHEZ et al. 2007) uma vez que o fruto atua como uma proteção contra condições ambientais adversas tais como, temperaturas extremas, dessecação e exposição à luz solar, vento e chuva (COTA-SÁNCHEZ, 2004). Entretanto, para ORTEGA-BAES et al. (2010) a viviparidade em cactos deve ser considerada como uma resposta fisiológica das plantas às condições ambientais e não a uma estratégia adaptativa que maximiza seu estabelecimento.

Em virtude do beneficiamento das sementes ter ocorrido em condições de campo não foi possível fazer testes para verificar as taxas de sobrevivência e estabelecimento das sementes vivíparas.

Efeito do meio de cultura e do carvão ativado na germinação de sementes in vitro

A germinação estendeu-se do 8º ao 28º dia para *Discocactus zehntneri* (Figura 2A), do 5º ao 25º dia para *Pilosocereus gounellei* (Figura 2B) e do 3º ao 23º para *Stephanocereus luetzelburgii* (Figura 2C). As curvas de germinação para as três espécies apresentaram uma distribuição gradual, bastante espalhada no tempo, refletindo uma grande variância da germinação. Resultados similares foram obtidos na

germinação de *Turbinicarpus laui* (ROSAS et al. 2001), *T. laui*, *T. lophophoroides*, *T. pseudopectinatus*, *T. schmiedickeanus*, *T. subterraneus*, *T. valdezianus* (DÁVILA-FIGUEROA et al. 2005) e *Pilosocereus robinii* (QUIALA et al. 2009). Segundo BORGHETTI & FERREIRA (2004) esse tipo de comportamento fisiológico sugere que sob condições naturais, a germinação pode se estender de dias a meses. Espécies que apresentam este tipo de comportamento tendem a estabelecer banco de sementes persistentes e são típicas de ambientes com estresses ambientais.

O potencial para formação de bancos de sementes tem sido comumente relatado para muitas espécies de cactos (ROJAS-ARÉCHIGA & VÁSQUEZ-YANES, 2000; MONTIEL & MONTAÑA, 2003; BENÍTEZ-RODRÍGUEZ et al. 2004; MANDUJANO et al. 2005; ORTEGA-BAES & ROJAS-ARÉCHIGA, 2007; FLORES et al. 2008; OLVERA-CARRILO et al. 2009; SÁNCHEZ-SOTO et al. 2010). Características como dormência, necessidade de um período de pós-maturação, resistência a patógenos, sementes pequenas, compactas e fotoblásticas positivas também favorecem o estabelecimento de um banco de sementes (BAKKER et al. 1996; ROJAS-ARÉCHIGA & BATIS, 2001; BENÍTEZ-RODRÍGUEZ et al. 2004). No entanto, apesar de estudos referentes à dinâmica de banco de sementes contribuírem para o entendimento da dinâmica de populações e estrutura das comunidades, poucos estudos têm sido realizados com representantes da família (ROJAS-ARÉCHIGA & BATIS, 2001).

O meio de cultura interferiu tanto no número de sementes germinadas quanto na cinética do processo germinativo. O meio MS na ausência de carvão ativado apresentou maior germinabilidade que o ágar para *P. gounellei* (60%). Entretanto, para *S. luetzelburgii* os meios MS e MS/2 na presença de carvão ativado apresentaram os melhores resultados (23 e 29%). O maior IVG (0,417) desta espécie ocorreu no meio MS/2 quando este esteve associado ao carvão ativado (Tabela 1).

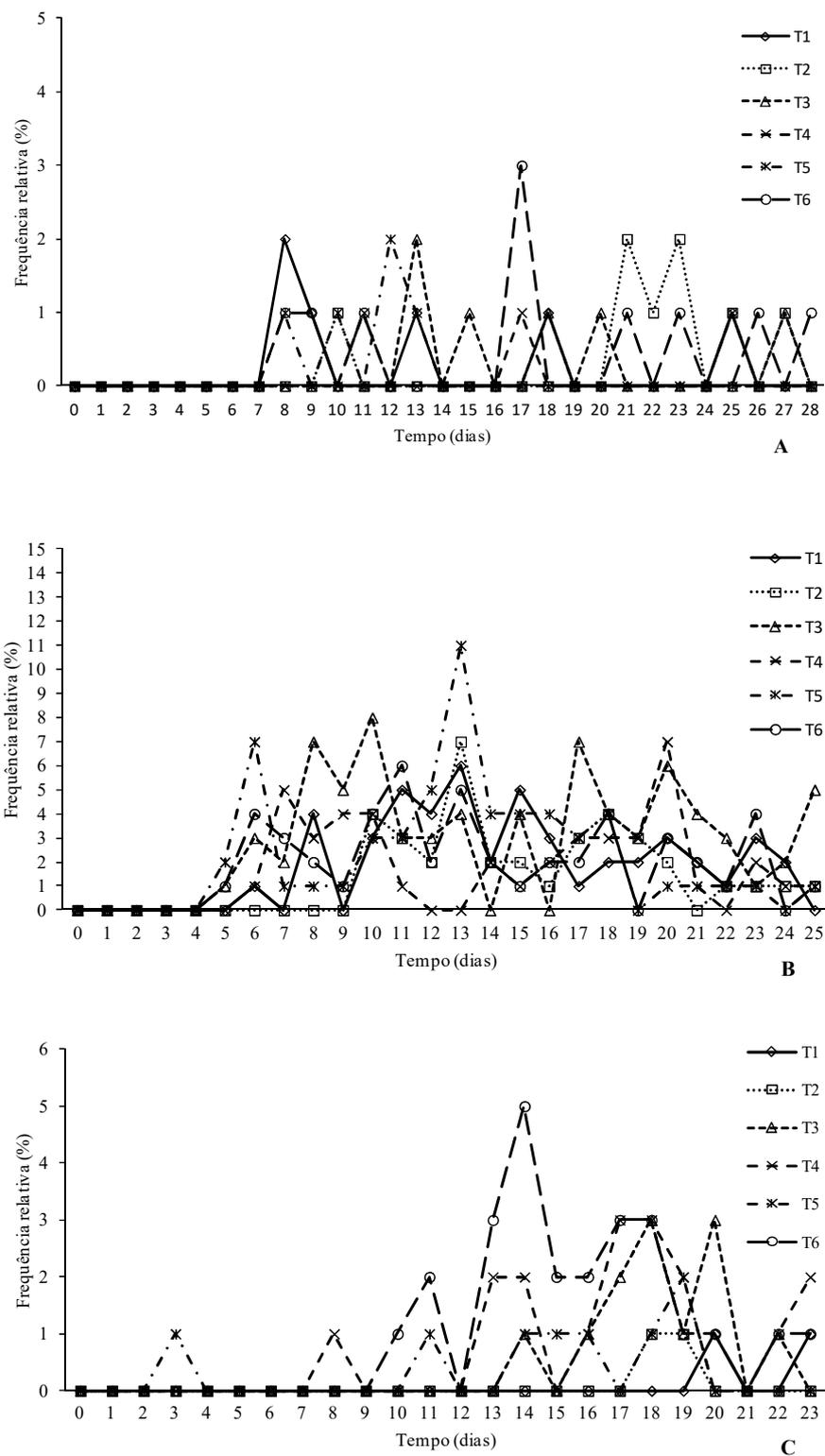


Figura 2. Frequência relativa diária da germinação de sementes de *Discocactus zehntneri* (A), *Pilosocereus gounellei* (B) e *Stephanocereus luetzelburgii* (C). T1: ágar sem carvão; T2: ágar com carvão; T3: MS + 30g L⁻¹ de sacarose sem carvão; T4: MS + 30g L⁻¹ de sacarose com carvão; T5: MS/2 + 15g L⁻¹ de sacarose sem carvão; T6: MS/2 + 15g L⁻¹ de sacarose com carvão.

Tabela 1. Efeito do meio de cultura e do carvão ativado na germinabilidade (%G), tempo médio de germinação (TMG), índice de velocidade de germinação (IVG) e coeficiente de uniformidade de germinação (CUG) na germinação de sementes de *Discocactus zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* e *Stephanocereus luetzelburgii*.

Meio de cultura	Carvão ativado					
	0 g L ⁻¹			2,0 g L ⁻¹		
	<i>D.</i> <i>zehntneri</i>	<i>P.</i> <i>gounellei</i>	<i>S.</i> <i>luetzelburgii</i>	<i>D.</i> <i>zehntneri</i>	<i>P.</i> <i>gounellei</i>	<i>S.</i> <i>luetzelburgii</i>
G (%)						
Ágar	12aA	44bA	5aA	11aA	37aA	5bA
MS	13aA	60aA	18aA	5aA	41aB	23aA
MS/2	12aA	49abA	13aB	17aA	45aA	29aA
TMG (dias)						
Ágar	10,00aA	14,96aA	10,75aA	10,53aA	15,37aA	9,25aA
MS	17,62aA	15,05aA	18,25aA	4,41aB	15,20aA	17,16aA
MS/2	11,50aA	13,09aA	10,00aA	16,50aA	13,89aA	14,97aA
IVG						
Ágar	0,135aA	0,914aA	0,022aA	0,100aA	0,635aA	0,027bA
MS	0,090aA	1,514aA	0,170aA	0,047aA	0,898aB	0,267abA
MS/2	0,117aA	1,302aA	0,197aA	0,170aA	1,083aA	0,417aA
CUG						
Ágar	0,015aA	0,055aA	0,000aA	0,055aA	0,107aA	0,000aA
MS	0,012aA	0,038aA	0,412aA	0,007aA	0,095aA	0,112aA
MS/2	0,250aA	0,062aA	0,105aA	0,012aA	0,034aA	1,092aA

Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Elevadas concentrações de sais e sacarose reduzem o potencial hídrico do meio de cultura e conseqüentemente disponibilizam menos água para os estádios iniciais da germinação. Entretanto, em nenhuma das espécies a restrição hídrica desfavoreceu a germinabilidade. Esses resultados corroboram os obtidos para a germinação de sementes de *Turbincarpus laui* (ROSAS et al. 2001). Entretanto, para *Pilosocereus robinii* (QUIALA et al. 2009), *Echinocactus platyacanthus* e *Polaskia chichipe* (ROSAS-LÓPEZ & COLLAZO-ORTEGA, 2004), os resultados mais satisfatórios ocorreram em meios com maior potencial hídrico.

Os índices de germinação *in vitro* obtidos neste trabalho para as três espécies foram inferiores aos alcançados por outros representantes da família como *Stenocereus queretaroensis* (84,1%) (CHÁVEZ et al. 2006), *Ariocarpus kotschoubeyanus* (70%) (MOEBIUS-GOLDAMMER et al. 2003), *Turbincarpus subterraneus* (90%) (DÁVILA-FIGUEROA et al. 2005), *Arrojadoa* spp. (91,12%) (DIAS et al. 2008), *Escobaria minima* (69%) (GIUSTI et al. 2002), *Hylocereus polyrhizus* (87%) (KARI et al. 2010) e *Mammillaria mathildae* (RUBIO & BARRERA 2009). A baixa germinação pode ser atribuída à dormência e baixa viabilidade das sementes ou a fatores relacionados ao cultivo *in vitro* como inadequado protocolo de desinfestação e potencial osmótico do meio de cultura (SANTOS-DÍAZ et al. 2003; MEDEIROS et al. 2006; RÊGO et al. 2009; VEIGA-BARBOSA et al. 2010).

O carvão ativado atuou de maneira diferenciada nas espécies em estudo (Tabela 1). Quando associado ao meio MS, acelerou a germinação, reduzindo o TMG para quatro dias em *D. zehntneri*, mas reduziu tanto a germinabilidade (41%) quanto o IVG (0,898) em *P. gounellei*. Para *S. luetzelburgii* este componente associado ao MS/2 aumentou a germinabilidade (29%). Entretanto, para todas as espécies estudadas, o carvão ativado aumentou o vigor das plantas (Figura 3). Segundo PAN & STADEN (1998) o carvão ativado no cultivo *in vitro* além de tornar escuro o meio de cultura facilitando o enraizamento, adsorve substâncias inibitórias produzidas pelo explante e meio de cultura bem como reguladores vegetais e outros compostos orgânicos, que podem contribuir para o aumento do vigor das plantas.

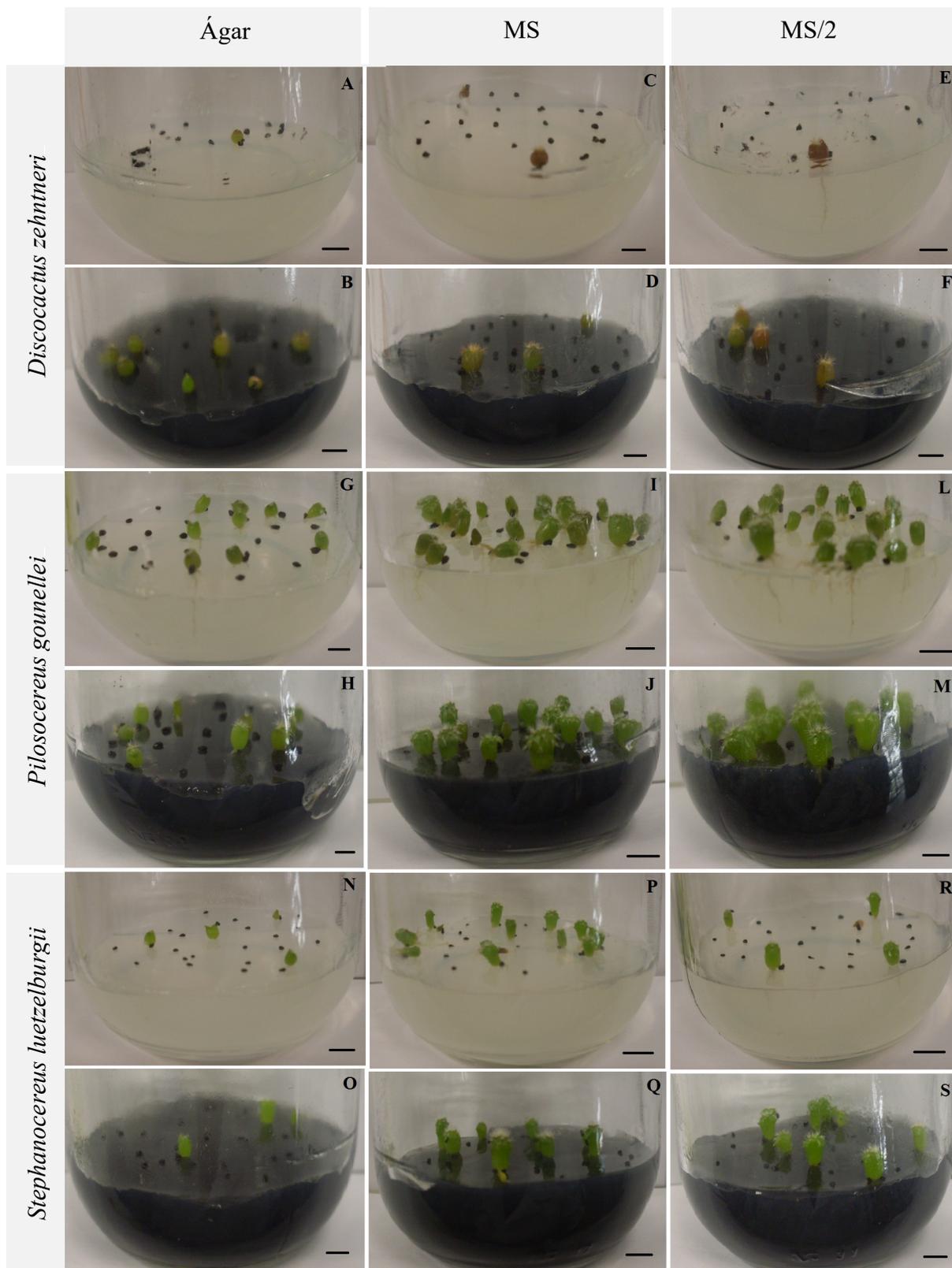


Figura 3. Germinação de *Discocactus zehntneri* em ágar (A, B), MS (C, D) e MS/2 (E, F), de *Pilosocereus gounellei* ágar (G, H), MS (I, J) e MS/2 (L, M) e de *Stephanocereus luetzelburgii* em ágar (N, O), MS (P, Q) e MS/2 (R, S) na ausência e presença de carvão ativo. (Barras = 1cm)

Durante a germinação, o carvão ativado pode neutralizar ou adsorver inibidores presentes nas sementes, como o ácido abscísico (ABA) e ácidos fenólicos, que limitam a habilidade de crescer do embrião (PEREZ, 2004), o que pode ter aumentado e acelerado a germinação das espécies. Em *Arrojadoa* spp. o carvão ativado também reduziu o TMG de sementes (DIAS et al. 2008), o que corrobora os resultados encontrados neste trabalho.

Teste de tetrazólio para análise da viabilidade de sementes

O teste de tetrazólio revelou que mais da metade das sementes de *D. zehntneri* e *S. luetzelburgii* apresentaram-se viáveis. Para *S. luetzelburgii* 88% dos embriões apresentaram coloração vermelha, 2% coloração rosa e 10% não foram corados (Figura 4A). *D. zehntneri* apresentou uma menor porcentagem de embriões completamente corados, 60% vermelhos, 10% rosas e 30% brancos (Figura 4B). Estes resultados associados a baixa germinabilidade *in vitro* sugerem que sementes de *D. zehntneri* e *S. luetzelburgii* devem apresentar algum tipo de dormência. VEIGA-BARBOSA et al. (2010) encontraram um maior percentual de embriões de *D. zehntneri* corados, cerca de 95 ± 5 , e, também atribuiu a baixa germinabilidade desta espécie a algum tipo de dormência associada a semente. A viabilidade da maioria das espécies de *Opuntia* spp. também foi elevada e variou conforme o seu habitat (ROMO-CAMPOS et al. 2010).

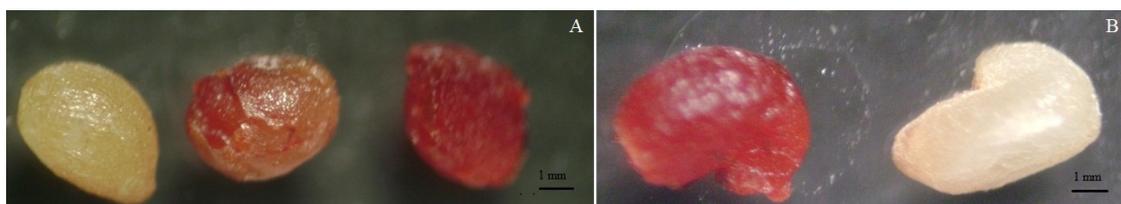


Figura 4. Embriões de *Discocactus zehntneri* (A) e *Stephanocereus luetzelburgii* (B) após o teste de tetrazólio.

Efeito da luz e de temperaturas constantes e alternadas na germinação

Na presença de luz, a germinação de *D. zehntneri* iniciou-se após o 3º dia de inoculação e estendeu-se até o 15º dia. Os polígonos de frequência relativa apresentaram um gráfico polimodal, constituído de três picos de germinação, no 3º, 7º e 15º dia. Por outro lado, a germinação no escuro apresentou um gráfico unimodal, cujo pico de germinação ocorreu mais tardiamente, no 9º dia após a inoculação (Figura 5).

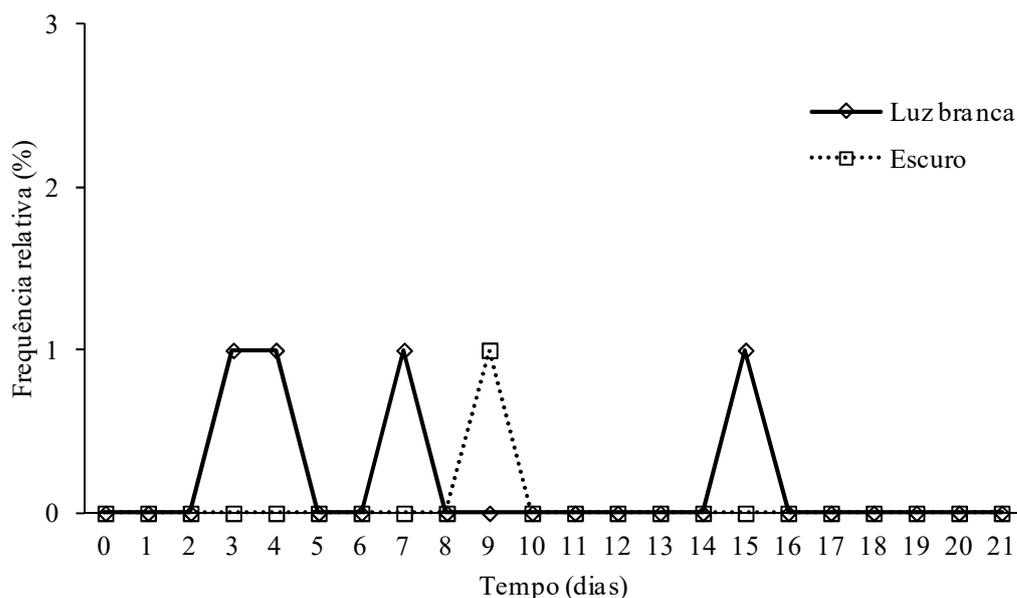


Figura 5. Polígonos de frequência relativa diária da germinação de sementes de *Discocactus zehntneri* a 25°C sob luz e escuro.

Não houve diferença significativa para a germinação de *D. zehntneri* em condições de luz e escuro para nenhuma das variáveis analisadas (Tabela 2), o que evidencia que esta espécie apresenta fotoblastismo neutro. Esses resultados estão de acordo com aqueles reportados para outras espécies de cactáceas como *Epiphyllum phyllanthus* (SIMÃO et al. 2010), *Hylocereus setaceus* (SIMÃO et al. 2007), *Coryphanta delicata*, *Stenocereus queretaroensis*, *Myrtillocactus geometrizans* (JIMÉNEZ-AGUILAR & FLORES, 2010), *Neobuxbaumia macrocephala*, *N. tetetzo*, *N. mezcalaensis* (RAMÍREZ-PADILLA & VALVERDE, 2005), *Pachycereus hollianus* e *Cephalocereus chrysacanthus* (ROJAS-ARÉCHIGA et al. 1997), que também

germinaram tanto na luz quanto no escuro. Entretanto, discordam dos resultados encontrados para as espécies *Trichocereus terscheckii* (ORTEGA-BAES & ROJAS-ARÉCHIGA, 2007), *Opuntia tomentosa* (OLVERA-CARRILLO et al. 2003), *Echinocactus platyacanthus* (JIMÉNEZ-AGUILAR & FLORES, 2010), *Melocactus conoideus* (REBOUÇAS & SANTOS, 2007), *Cereus pernambucensis* (SOCOLOWSKI et al. 2010), *Stenocereus stellatus* (ROJAS-ARÉCHIGA et al. 2001), *Pilosocereus pachycladus* (ABUD et al. 2010), *Mammillaria haageana*, *M. carnea*, *M. mystax*, *M. supertexta* (BENÍTEZ-RODRÍGUEZ et al. 2004), *Echinocactus platyacanthus*, *Ferocactus recurvus*, *F. robustus*, *F. flavovirens* (ROJAS-ARÉCHIGA et al. 1997), *Mammillaria mazatlanensis*, *Stenocereus alamosensis*, *S. thurberi* (SÁNCHEZ-SOTO et al. 2010), *Opuntia macrocentra* (ROJAS-ARÉCHIGA et al. 2011) e *Stenocereus queretaroensis* (DE LA BARRERA & NOBEL, 2003), que apresentaram fotoblastismo positivo.

Tabela 2. Efeito da luz branca e escuro na germinabilidade (%G), tempo médio de germinação (TMG), índice de velocidade de germinação (IVG) e coeficiente de uniformidade de germinação (CUG) de sementes de *Discocactus zehntneri*.

Tratamento	G (%)	TMG(dias)	IVG	CUG
Luz	10a	6,0a	0,200a	0,062a
Escuro	3a	2,2a	0,027a	0,062a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Segundo BEWLEY & BLACK (1994) e HARTMANN et al. (2011) a luz pode atuar tanto na indução quanto na quebra da dormência. O pigmento fitocromo é considerado o principal agente envolvido com a percepção do sinal luminoso e sob sua forma ativa (F_{ve}) modula a transcrição de sinais e a expressão de genes relacionados com a germinação (BORGHETTI, 2004). A resposta fotoblástica das espécies pode estar relacionada com a distribuição geográfica, origem filogenética das espécies (BENÍTEZ-RODRÍGUEZ et al. 2004), com a forma de vida dos cactos (ROJAS-

ARÉCHIGA et al. 1997) e com as condições luminosas as quais as sementes foram submetidas durante a maturação (CARDOSO, 2004).

A germinação de *D. zehntneri* estendeu-se do 3º ao 15º dia à temperatura de 25°C, do 1º ao 3º a 25-30°C e ocorreu no 16º dia a 30°C. Apenas a 25°C o gráfico apresentou caráter polimodal com picos de germinação no 3º, 7º e 15º dia. A temperatura constante de 30º e alternada 25-30°C, os gráficos apresentaram caráter unimodal com picos de germinação no 16º e 2º dia, respectivamente (Figura 6).

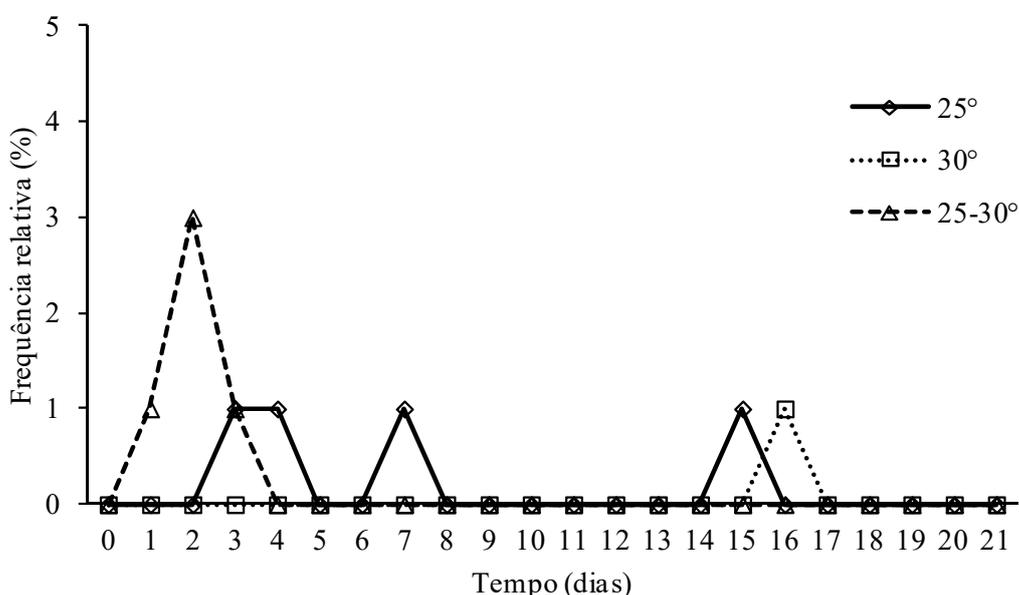


Figura 6. Polígonos de frequência relativa diária da germinação de sementes de *Discocactus zehntneri* às temperaturas constantes de 25°C, 30°C e alternada 25-30°C.

Não houve diferença significativa para a germinação de *D. zehntneri* sob as temperaturas constantes de 25 e 30°C e alternadas, 25-30°C, para nenhuma das variáveis analisadas (Tabela 3). Esses resultados corroboram os reportados para *Cereus jamacaru* (GUEDES et al. 2009), *Neobuxbaumia tetetzo*, *Coryphantha pallida*, *Ferocactus flavovirens*, *Myrtillocactus geometrizans*, *Pachycereus hollianus* (GODÍNEZ-ALVAREZ & VALIENTE-BANUET, 1998), *Trichocereus terscheckii* (ORTEGA-BAES & ROJAS-ARÉCHIGA, 2007), *Opuntia tomentosa* (OLVERA-CARRILLO et al. 2003), *Cereus pernambucensis* (SOCOLOWSKI et al. 2010),

Stenocereus stellatus (ROJAS-ARÉCHIGA et al. 2001), *Mammillaria carnea*, *M. supertexta* (BENÍTEZ-RODRÍGUEZ et al. 2004), *Pachycereus hollianus*, *Cephalocereus chysacanthus*, *Neobuxbaumia tetetzo*, *Echinocactus platyacanthus*, *Ferocactus flavovirens*, *F. recurvus*, *F. robustus* (ROJAS-ARÉCHIGA et al. 1998) e *Melocactus bahiensis* (LONE et al. 2007). Contudo, para *Mammillaria mazatlanensis* temperaturas alternadas aumentaram a germinabilidade em 11% em relação ao controle (SÁNCHEZ-SOTO et al. 2010), o que contraria os resultados obtidos.

Tabela 3. Efeito da temperatura constante e alternada na germinabilidade (%G), tempo médio de germinação (TMG), índice de velocidade de germinação (IVG) e coeficiente de uniformidade de germinação (CUG) na germinação de sementes de *Discocactus zehntneri*.

Tratamento	G (%)	TMG (dias)	IVG	CUG
25°	9a	6,0a	0,200a	0,062a
30°	2a	4,0a	0,015a	0,000a
25-30°	9a	1,5a	0,707a	2,000a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A temperatura atua tanto na capacidade (germinabilidade) quanto na velocidade (vigor) de germinação de sementes, seja por regular a ativação e/ou inativação de proteínas durante reações metabólicas (BEWLEY & BLACK, 1994) ou por contribuir para o amolecimento do tegumento de espécies que possuem camadas hidrofóbicas que limitam a entrada de água na semente (BEWLEY & BLACK, 1994; PEREZ, 2004). Apesar das cactáceas germinarem em uma ampla faixa de temperatura (ROJAS-ARÉCHIGA & VÁSQUEZ-YANES, 2000; SIMÃO et al. 2007; 2010), a temperatura ótima de germinação de muitas espécies encontra-se entre 20-30°C (DE LA BARRERA & NOBEL, 2003; SIMÃO et al. 2010) e 25-30°C (SIMÃO et al. 2007; SOCOLOWSKI et al. 2010). Alguns estudos também relatam que sob temperaturas extremas, menores que 15°C e/ou maiores que 40°C, a germinação é reduzida ou ausente (ORTEGA-BAES

& ROJAS-ARÉCHIGA, 2007; SIMÃO et al. 2007; SOCOLOWSKI et al. 2010; SIMÃO et al. 2010). Segundo ROJAS-ARÉCHIGA et al. (1998) o grau de tolerância a temperaturas extremas está diretamente relacionado com a forma de vida dos cactos. Sementes de cactos globosos são mais tolerantes a elevadas temperaturas que as de cactos colunares, pois durante a sua maturação estão sujeitas a temperaturas mais elevadas em virtude da sua maior proximidade ao solo (ROJAS-ARÉCHIGA et al. 1997; 1998).

Efeito da pré-embebição em água (H₂O) e dos ácidos giberélico (GA₃) e sulfúrico (H₂SO₄) na germinação de sementes in vitro

A germinação estendeu-se do 9º ao 25º dia para *Discocactus zehntneri* (Figura 7A) e do 11º ao 26º dia para *Stephanocereus luetzelburgii* (Figura 7B). Apenas o controle (T1) e o GA₃ (T5) apresentaram gráfico de caráter unimodal com picos de germinação entre o 20 - 21º dia para *D. zehntneri* e 24º dia para *S. luetzelburgii*, respectivamente. Os demais tratamentos para as duas espécies apresentaram gráficos polimodais.

A pré-embebição em ácido giberélico na maior concentração, 1000 mg L⁻¹, aumentou a germinabilidade de sementes de *D. zehntneri* de 7 para 24% (Tabela 4). Entretanto, este resultado não diferiu significativamente da pré-embebição em GA₃ na menor concentração (9%) e da escarificação em H₂SO₄ por cinco e dez minutos (9 e 20%, respectivamente). O melhor resultado para o IVG também ocorreu na embebição em GA₃ a 1000 mg L⁻¹ (0,290). Este resultado também não diferiu significativamente da escarificação em H₂SO₄ por dez minutos (0,205). Desta forma, sugere-se que a dormência de sementes de *D. zehntneri* deve ser do tipo fisiológica, segundo a classificação de BORGHETTI (2004), uma vez que a pré-embebição em ácido giberélico aumentou significativamente a germinabilidade em relação ao controle. Resultados similares foram obtidos por OLVERA-CARILLO et al. (2003) para *Opuntia tomentosa*. Contudo, para *Mammillaria hamata*, *M. sphaelata* (CARBAJAL et al. 2008), *M. pectinifera* (NAVARRO & DEMÉNEGHI, 2007), *Ferocactus robustus* (NAVARRO & GONZÁLEZ, 2007), *Cylindropuntia leptocaulis*, *Opuntia rastrera*, *O. macrocentra* (ROJAS-ARÉCHIGA et al. 2011) e *Trichocereus terscheckii* (ORTEGA-BAES & ROJAS-ARÉCHIGA, 2007) tratamentos com ácidos giberélico e/ou sulfúrico

não afetaram a germinabilidade das espécies. Tratamentos envolvendo diferentes concentrações de putrescina, regulador cujo modo de ação é similar ao GA₃, também não potencializaram a germinação de *Turbinicarpus lophophoroides* e *T. pseudopectinatus* (FLORES et al. 2008).

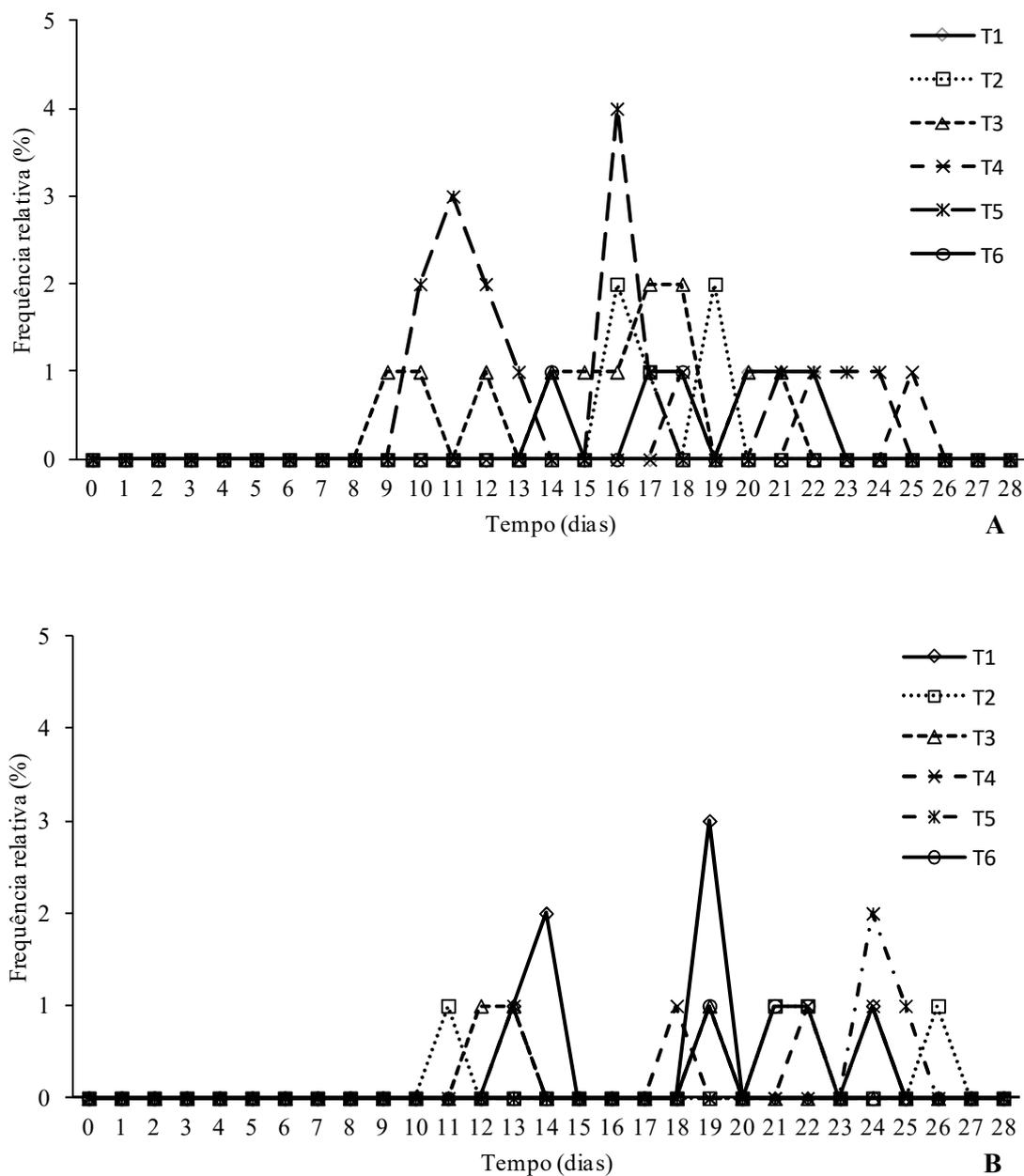


Figura 7. Polígonos de frequência relativa diária da germinação de sementes de *Discocactus zehntneri* (A) e *Stephanocereus luetzelburgii* (B). T1: controle; T2: ácido sulfúrico 5 min.; T3: ácido sulfúrico 10 min.; T4: ácido giberélico 500 mg L⁻¹; T5: ácido giberélico 1000 mg L⁻¹ e T6: embebição em água destilada.

Para *S. luetzelburgii*, os tratamentos não potencializaram a germinação das sementes em relação ao controle (Tabela 4).

Tabela 4. Germinabilidade (%G), tempo médio de germinação (TMG), índice de velocidade de germinação (IVG) e coeficiente de uniformidade de germinação (CUG) de sementes de *Discocactus zehntneri* e *Stephanocereus luetzelburgii* submetidas a diferentes tratamentos para quebra de dormência. T1: controle; T2: ácido sulfúrico (H₂SO₄) por 5 min.; T3: ácido sulfúrico (H₂SO₄) por 10 min.; T4: ácido giberélico (GA₃) 500 mg L⁻¹; T5: ácido giberélico (GA₃) 1000 mg L⁻¹ e T6: embebição em água destilada.

Tratamento	G (%)	TMG (dias)	IVG	CUG
<i>Discocactus zehntneri</i>				
T1	7b	10,62a	0,037b	1,000a
T2	9ab	8,70a	0,072b	0,270a
T3	20ab	15,12a	0,205ab	1,325a
T4	9ab	16,25a	0,037b	0,000a
T5	24a	15,82a	0,290a	0,062a
T6	7b	8,25a	0,047b	0,062a
<i>Stephanocereus luetzelburgii</i>				
T1	15a	16,87a	0,105a	0,050a
T2	10a	14,62a	0,055a	1,000a
T3	9a	11,00a	0,052a	0,000a
T4	8a	9,62a	0,055a	0,290a
T5	5a	5,83a	0,032a	1,125a
T6	9a	15,50a	0,037a	0,000a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

Efeito do meio de cultura e de repicagens no crescimento in vitro de plantas

Para *Discocactus zehntneri* o meio de cultura não interferiu em nenhuma variável de crescimento (Tabela 5). O que corrobora os resultados obtidos para espécies de outras famílias como a orquídea *Miltonia flavescens* (MULLER et al. 2007) e as bromélias *Orthophytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis* (BELLINTANI et al. 2007).

Para *Pilosocereus gounellei* o meio MS/2 favoreceu o comprimento da parte aérea independente das repicagens (23,95 e 20,40 mm), já o diâmetro (6,23 mm) e a massa seca da parte aérea (64 mg) foram favorecidos apenas na ausência de repicagens (Tabela 5). Esses resultados corroboram aqueles reportados para *Polaskia chichipe*, *Echinocactus platyacanthus* (ROSAS-LOPÉZ & COLLAZO-ORTEGA, 2004), *Opuntia lanigera* (ESTRADA-LUNA et al. 2008) e *Oncidium baueri* (SORACE et al. 2008) em que o meio MS/2 também promoveu o maior crescimento *in vitro* das plantas. A redução do potencial hídrico do meio de cultura devido à elevada concentração de sais disponibiliza menos água para o crescimento das plantas e tem contribuído para o baixo vigor e para a aparência amarelada de algumas espécies (ROSAS-LOPÉZ & COLLAZO-ORTEGA, 2004). Elevadas concentrações de sacarose reduziram o crescimento *in vitro* de *Opuntia lanigera* (ESTRADA-LUNA et al. 2008) e *Nopalea cochenillifera* (CASTRO et al. 2011).

Apesar das variáveis referentes à parte aérea das plantas terem sido favorecidas pelo meio MS/2, o comprimento da maior raiz e a massa seca do sistema radicular de *P. gounellei*, apresentaram os melhores resultados em meio MS na ausência das repicagens (24,66 mm) e independente das repicagens (30 e 36 mg), respectivamente (Tabela 5).

Para *Stephanocereus luetzelburgii*, na ausência de repicagens, os melhores resultados para o diâmetro (5,88 mm), massa seca da parte aérea (225 mg) e do sistema radicular (242 mg) e o comprimento da maior raiz (21,15 mm) ocorreram em meio MS (Tabela 5). O meio MS, também apresentou os melhores resultados para comprimento e diâmetro da parte aérea em *Hylocereus polyrhizus* quando comparado com os meios DM 94 e B5 (KARI et al. 2010).

Tabela 5. Efeito de diferentes meios de cultura e de repicagens no comprimento da parte aérea (CPA), diâmetro da parte aérea (DPA), massa seca da parte aérea (MSPA), comprimento da maior raiz (CMR) e massa seca do sistema radicular (MSSR) em plantas de *Discocactus zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* e *Stephanocereus luetzelburgii*.

Meio de cultura	Repicagens					
	0			3		
	<i>D. zehntneri</i>	<i>P. gounellei</i>	<i>S. luetzelburgii</i>	<i>D. zehntneri</i>	<i>P. gounellei</i>	<i>S. luetzelburgii</i>
CPA (mm)						
MS	8,59aB	12,39bB	22,95aA	11,91aA	22,05bA	28,80aA
MS/2	10,13aB	20,40aB	21,93aB	13,40aA	23,95aA	31,02aA
DPA (mm)						
MS	5,15aB	5,05bB	5,88aB	5,97aA	7,14aA	7,84aA
MS/2	5,73aA	6,23aB	4,98bB	5,79aA	7,33aA	7,86aA
MSPA (mg)						
MS	35aA	43bB	225aA	36aA	77aA	242aA
MS/2	30aA	64aA	75bA	30aA	72aA	153aA
CMR (mm)						
MS	12,00aA	24,66aA	21,15aA	12,83aA	15,20aB	13,00aB
MS/2	12,12aA	13,76bA	14,20bA	11,36aA	14,52aA	13,08aA
MSSR (mg)						
MS	15aA	36aA	242aA	6aA	30aA	52aB
MS/2	5aA	22bA	47bA	6aA	20bA	30aA

Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

As repicagens favoreceram o comprimento da parte aérea independente dos meios de cultura em *D. zehntneri* (11,91 e 13,40 mm) e *P. gounellei* (22,05 e 23,95 mm) e apenas quando associado ao MS/2 em *S. luetzelburgii* (31,02 mm). O diâmetro da parte aérea também foi favorecido pela troca periódica do meio de cultura independente do meio utilizado em *P. gounellei* (7,14 e 7,33 mm) e *S. luetzelburgii* (7,84 e 7,86 mm) e apenas quando associado ao MS para *D. zehntneri* (5,97 mm). E, quando associada ao meio MS, as repicagens também aumentaram a massa seca da parte aérea de *P. gounellei* (77 mg) (Tabela 5). Esses resultados discordam dos obtidos para *Echinocereus knippelianus*, *E. schmollii*, *Escontria chiotilla*, *Melocactus curvispinus* e *Polaskia chichipe*, os quais após 13 semanas de cultivo na ausência de repicagens, apresentaram tamanhos menores (6 a 10 mm) que as três espécies do presente estudo (RETES-PRUNEDA et al. 2007).

O crescimento vegetal é definido como um aumento irreversível do volume e ocorre por uma seqüência de divisão e expansão celular associadas. O maior componente do crescimento vegetal é a expansão celular governada pela pressão de turgor, uma vez que a simples divisão das células não significa um aumento no volume (TAIZ & ZEIGER, 2004). A troca periódica do meio de cultura, provavelmente disponibilizou mais água para o crescimento vegetal, evidenciado pelo maior crescimento da parte aérea, tanto em comprimento quanto em espessura.

As únicas variáveis que não foram favorecidas pelas repicagens foram relacionadas ao sistema radicular (Tabela 5). O comprimento da maior raiz tanto em *P. gounellei* (15,20 mm) quanto em *S. luetzelburgii* (13,00 mm) quando associado ao meio MS foi desfavorecido pelas repicagens. Esses resultados discordam do obtido para *Arrojadoa* spp. que após o cultivo por 19 semanas em meio MS na ausência de repicagens apresentou o tamanho do sistema radicular superior (19,10 mm) aos obtidos neste trabalho (DIAS et al. 2008).

O cultivo *in vitro* é uma alternativa para acelerar o crescimento de espécies que apresentam metabolismo CAM (Metabolismo Ácido das Crassulaceas), pois a adição de reguladores vegetais e as próprias condições relacionadas ao ambiente *in vitro*, como a alta umidade relativa e baixa ventilação, alteram o metabolismo do carbono e permitem uma fixação contínua do CO₂, tanto durante períodos de luz quanto de escuro (MALDA et al. 1999b).

CONCLUSÃO

Meios de cultura com potencial hídrico reduzido não inviabilizam a germinação de *Pilosocereus gounellei* e *Stephanocereus luetzelburgii*. A baixa germinabilidade *in vitro* de *Discocactus zehntneri* pode estar associada a uma dormência fisiológica e para *S. luetzelburgii* novos estudos deverão ser conduzidos a fim de esclarecer os mecanismos que promovem a sua germinação. Os meios MS/2 e MS, respectivamente, devem ser utilizados para o crescimento *in vitro* de *P. gounellei* e *S. luetzelburgii* e as repicagens para as três espécies estudadas.

REFERÊNCIAS

- ABUD, H. F. et al. Germinação e expressão morfológica de frutos, sementes e plântulas de *Pilosocereus pachycladus* Ritter. **Revista Ciência Agronômica**, v.41. n.3. p.468-474. 2010.
- ANDERSON, Edward F. **The Cactus Family**. Portland: Timber Press, 2001. 776p.
- BAKKER, J. P. et al. Seed banks and seed dispersal: important topics in restoration ecology. **Acta Botanica Neerlandica**, v.45, p. 461-490, 1996.
- BELLINTANI, M. C. et al. Estabelecimento *in vitro* de *Orthophytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis*, bromélias endêmicas da Chapada Diamantina, Bahia - Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, p.1101-1103, 2007.
- BENÍTEZ-RODRÍGUEZ, J. L.; OROZCO-SEGOVIA, A.; ROJAS-ARÉCHIGA, M. Light effect on seed germination of four *Mammillaria* species from the Tehuacán-cuicatlán valley, Central Mexico. **The Southwestern Naturalist**, v.49, n.1. p.11–17, 2004.
- BEWLEY, J. Derek; BLACK, Michael. **Seeds: Physiology of Development and Germination**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.
- BORGHETTI, Fabian. Dormência embrionária. Interpretação de resultados de germinação. In: FERREIRA, Alfredo Gui; BORGHETTI, Fabian. **Germinação do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. Cap. 6, p.109-123.

BORGHETTI, Fabian.; FERREIRA, Alfredo Gui. Interpretação de resultados de germinação. In: FERREIRA, Alfredo Gui; BORGHETTI, Fabian. **Germinação do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. Cap. 13, p.209-222.

CARBAJAL, M. C. N.; OLVERA, G. C.; CASTELLANOS, J. O. L. Efecto de la escarificación de semillas en la germinación de dos especies de *Mammillaria*. **Zonas Áridas**, v.12, n.1, 2008.

CARDOSO, Victor. Dormência: estabelecimento do processo. In: FERREIRA, Alfredo Gui; BORGHETTI, Fabian. **Germinação do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. Cap. 5, p.95-123.

CASTRO, J. P. et al. *In vitro* germination and disinfestation of sweet cactus (*Nopalea cochenillifera* (L.) Salm Dyck). **Acta Scientiarum Agronomy**, v.33, n.3, p.509-512, 2011.

CHÁVEZ, L. C. et al. La germinación in *in vitro* uma alternativa para obtener explantes em cactáceas. **Zonas Áridas**, n.10, p.129-133, 2006.

COTA-SÁNCHEZ, J. H.; ABREU, D. D. Vivipary and offspring survival in the epiphytic cactus *Epiphyllum phyllanthus* (Cactaceae). **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.14, p.3865–3873, 2007.

COTA-SÁNCHEZ, J. H.; REYES-OLIVAS, Á.; ABREU, D. D. Vivipary in the cactus family: A reply to Ortega-Baes' et al. evaluation of 25 species from northwestern Argentina. **Journal of Arid Environments**, v.75, p. 1-3, 2011.

COTA-SÁNCHEZ, J. H.; REYES-OLIVAS, A.; SÁNCHEZ-SOTO, B. Vivipary in coastal cacti: a potential reproductive strategy in halophytic environments. **American Journal of Botany**, v.94, n.9, p.1577–1581, 2007.

COTA-SÁNCHEZ, J. H. Vivipary in the Cactaceae: its taxonomic occurrence and biological significance. **Flora**, v.199, p.481–490, 2004.

DÁVILA-FIGUEROA, C. A. et al. *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbiniacarpus* (Cactaceae). **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v.41, p.540–545, 2005.

DE LA BARRERA, E.; NOBEL, P. S. Physiological ecology of seed germination for the columnar cactus *Stenocereus queretaroensis*. **Journal of Arid Environments**, v.53, p. 297–306, 2003.

DIAS, M. M. et al. Emergência e desenvolvimento da cactácea rabo-de-raposa (*Arrojadoa* spp) em diferentes meios de cultura e recipientes. **Revista Ceres**, v.55, n.2 p.117-123, 2008.

ESTRADA-LUNA, A. A. et al. *In vitro* micropropagation of the ornamental prickly pear cactus *Opuntia lanigera* Salm–Dyck and effects of sprayed GA3 after transplantation to *ex vitro* conditions. **Scientia Horticulturae**, v.117, p. 378–385, 2008.

FEREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Científica Symposium**, v.6, n.2, p.36-41, 2008.

FLORES, J.; JURADO, E.; JIMÉNEZ-BREMONT, J. F. Breaking seed dormancy in specially protected *Turbincarpus lophophoroides* and *Turbincarpus pseudopectinatus* (Cactaceae). **Plant Species Biology**, v.23, p.43–46, 2008.

GIUSTI, P. et al. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. **Scientia Horticulturae**, v.95, p.319-332, 2002.

GODÍNEZ-ALVAREZ, H.; VALIENTE-BANUET, A. Germination and early seedling growth of Tehuacan Valley cacti species: the role of soils and seed ingestion by dispersers on seedling growth. **Journal of Arid Environments**, v.39, p.21–31, 1998.

GUEDES, R. S. et al. Germinação de sementes de *Cereus jamacaru* DC. em diferentes substratos e temperaturas. **Acta Scientiarum, Biological Sciences**, v.31, n.2, p.159-164, 2009.

HARTMANN, Hudson T. **Plant Propagation: principles and practices**. 8 ed. United States: Pearson, 2011. 915p.

HUBSTENBERGER, J. F.; CLAYTON, P. W.; PHILLIPS, G. C. Micropropagation of Cacti. In: BAYAY, Y. P. S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. v. 20. Berlin: Springer, 1992. Cap. 4, p.49- 68.

JIMÉNEZ-AGUILAR, A.; FLORES, J. Effect of light on seed germination of succulent species from the southern Chihuahuan Desert: comparing germinability and relative

light germination. **Journal of the Professional Association for Cactus Development**, v.12, p.12-19, 2010.

JUDD, Walter S. et al. **Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 612p.

KARI, R. et al. Basal Media for *in vitro* germination of red-purple dragon fruit *Hylocereus polyrhizus*. **Journal of Agrobiotechnology**, v.11, p. 87-93, 2010.

KERBAUY, Gilberto Barbante. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2004. 452 p.

LONE, A. B. et al. Germinação de *Melocactus bahiensis* (Cactaceae) em diferentes substratos e temperaturas. **Scientia Agraria**, v.8, n.4, p.365-369, 2007.

MALDA, G. et al. Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of *in vitro* cultured cactus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.58, p.1–9, 1999. (b)

MALDA, G.; SUZÁN, H.; BACKHAUS, R. *In vitro* cultura as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. **Scientia Horticulturae**, v.81, p.71-87, 1999. (a)

MANDUJANO, M. C.; MONTAÑA, C.; ROJAS-ARÉCHIGA, M. Breaking seed dormancy in *Opuntia rastrera* from the Chihuahuan desert. **Journal of Arid Environments**, v.62, p.15–21, 2005.

MEDEIROS, L. A. et al. *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.84, p.165-169, 2006.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. *In vitro* culture of *Vriesea hieroglyphica*, an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic florest. **Journal Bromeliad Society**, v.44, p.120-124, 1994.

MERCIER, H.; NIEVOLA, C. C. Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. **Vidalia**, v.1, p.57-62, 2003.

MOEBIUS-GOLDAMMER, K. G. et al. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (lem.) k. schum. (Cactaceae), an endemic and endangered

- mexican species. **In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, v.39, p.388–393, 2003.
- MONTIEL, S.; MONTAÑA, C. Seed bank dynamics of the desert cactus *Opuntia rastrera* in two habitats from the Chihuahuan Desert. **Plant Ecology**, v.166, p.241–248, 2003.
- MULLER, T. S. et al. Crescimento *in vitro* e aclimatização de plântulas de *Miltonia flavescens*. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, p.252-254, 2007.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473–497, 1962.
- NAVARRO, M. C.; DEMÉNEGHI, A. P. Germinación de semillas y efecto de las hormonas en el crecimiento de *Mammillaria pectinifera*. **Zonas Áridas**, v.11, n.1, p.233-239, 2007.
- NAVARRO, M. C.; GONZÁLEZ, E. M. Efecto de la escarificación de semillas en la germinación y crecimiento de *Ferocactus robustus* (Pfeiff.) Britton & Rose (Cactaceae). **Zonas áridas**, v.11, n.1, p.195-205, 2007.
- OLVERA-CARRILO, Y. et al. Effect of burial on the germination of *Opuntia tomentosa*'s (Cactaceae, Opuntioideae) seeds. **Journal of Arid Environments**, v.73, p.421–427, 2009.
- OLVERA-CARRILLO, Y. et al. Germination of the hard seed coated *Opuntia tomentosa* S.D., a cacti from the México valley. **Journal of Arid Environments**, v.55, p.29–42, 2003.
- ORTEGA-BAES, P.; APARICIO, M.; GALÍNDEZ, G. Vivipary in the cactus family: an evaluation of 25 species from northwestern Argentina. **Journal of Arid Environments**, v. 74, p.1359-1361, 2010.
- ORTEGA-BAES, P.; ROJAS-ARÉCHIGA, M. Seed germination of *Trichocereus terscheckii* (Cactaceae): light, temperature and gibberellic acid effects. **Journal of Arid Environments**, v.69, p.169–176, 2007.
- PAN, M. J.; STADEN, J. The use of charcoal in in vitro culture – a review. **Plant Growth Regulation**, v.26, p.155–163, 1998.

PEREZ, Sônia Cristina Juliano Gualtieri de Andrade. Envoltórios. In: FERREIRA, Alfredo Gui; BORGHETTI, Fabian. **Germinação do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. Cap. 7, p.125-134.

QUIALA, E. et al. *In vitro* propagation of *Pilosocereus robinii* (Lemaire) Byles et Rowley, endemic and endangered cactus. **Journal of the Professional Association for Cactus Development**, v.11, p.18-25, 2009.

RAMIREZ-MALAGON, R. et al. *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**. v.43, p. 660–665, 2007.

RAMÍREZ-PADILLA, C. A.; VALVERDE, T. Germination responses of three congeneric cactus species (*Neobuxbaumia*) with differing degrees of rarity. **Journal of Arid Environments**, v. 61, p. 333–343, 2005.

REBOUÇAS, A. C. M.; SANTOS, D. L. Influência do fotoperíodo e qualidade de luz na germinação de sementes de *Melocactus conoideus* (Cactaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 900-902, 2007.

RÊGO, M. M. et al. *In vitro* seed germination of Mandacaru (*Cereus jamacaru* DC.). **Revista Caatinga**, v.22, n.4, p.34-38, 2009.

RETES-PRUNEDA, J. et al. Propagación in vitro de especies de *Echinocereus*, *Escontria*, *Mammillaria*, *Melocactus* y *Polaskia* (Cactaceae). **Boletín de la Sociedad Botánica de México**, v.81, p.9-16, 2007.

ROJAS-ARÉCHIGA, M.; BATIS, A. Las semillas de cactáceas.... ¿forman bancos en el suelo?. **Cactáceas y Suculentas Mexicanas**, v.46, p.76-82, 2001.

ROJAS-ARÉCHIGA, M.; CASAS, A.; VÁSQUEZ-YANES, C. Seed germination of wild and cultivated *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) from the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Central México. **Journal of Arid Environments**, v.49, p.279-287, 2001.

ROJAS-ARÉCHIGA, M. et al. Effect of gibberellic acid on germination of seeds of five species of cacti from the Chihuahuan Desert, Northern Mexico. **The Southwestern Naturalist**, v.56, n.3, p.393–435, 2011.

ROJAS-ARÉCHIGA, M.; OROZCO-SEGOVIA, A.; VÁSQUEZ-YANES, C. Effect of light on germination of seven species of cacti from the Zapotitlán Valley in Puebla, México. **Journal of Arid Environments**, v.36, p.571–578, 1997.

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

ROJAS-ARÉCHIGA, M.; VÁSQUEZ-YANES, C.; OROZCO-SEGOVIA, A. Seed response to temperature of Mexican cacti species from two life forms: an ecophysiological interpretation. **Plant Ecology**, v.135, p.207–214, 1998.

ROMO-CAMPOS, L. et al. Seed germination of *Opuntia* species from an aridity gradient in Central Mexico, **Journal of the Professional Association for Cactus Development**, v. 12, p.181-198, 2010.

ROSAS-LÓPEZ, U.; COLLAZO-ORTEGA, M. Conditions for the germination and the early growth of seedlings of *Polaskia chichipe* (Goss.) Backeberg and *Echinocactus platyacanthus* Link and Otto f. *grandis* (Rose) Bravo-Hollis (Cactaceae). **International Journal of Botanica Experimental**, v.53, p.213-220, 2004.

ROSAS, M. M. et al. Micropropagation of *Turbiniacarpus laui* glass et foster, an endemic and endangered species. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v.37, p.400-404, 2001.

RUBIO, O. R. G.; BARRERA, G. X. M. Conservation *in situ* and *ex situ* of *Mammillaria mathildae*, endemic, endangered cacti of Querétaro City. **Ciencia@uaq**, v.2, n.1, p.3-16, 2009.

SÁNCHEZ-SOTO, B. et al. Germinación de tres cactáceas que habitan la región costera del noroeste de México. **Interciencia**, v. 35, n. 4, p. 299-305, 2010.

SANTANA, D. G.; RANAL, M. A. Análise estatística na germinação. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p.205-237, 2000.

SANTOS-DÍAZ, M. S. et al. *In vitro* organogenesis of *Pelecypora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae). **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v.39, p.480–484, 2003.

SIMÃO, E.; NAKAMURA, A. T.; TAKAKI, M. The germination of seeds of *Epiphyllum phyllanthus* (L.) Haw. (Cactaceae) is controlled by phytochrome and by nonphytochrome related process. **Biota Neotropica**, v.10, n.1, p.115-119, 2010.

SIMÃO, E.; SOCOLOWSKI, F.; TAKAKI, M. The epiphytic Cactaceae *Hylocereus setaceus* (Salm-Dick ex DC.) Ralf Bauer seed germination is controlled by light and temperature. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50, n.4, p.655-662, 2007.

SOCOLOWSKI, F. et al. Influence of light and temperature on seed germination of *Cereus perambucensis* Lemaire (Cactaceae). **Biota Neotropica**, v.10, n.2, p.53-56, 2010.

SORACE, M. et al. Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. **Semina: Ciências Agrárias**, v.29, n.4, p.775-782, 2008.

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

TAIZ, Lincoln.; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia Vegetal**. 3ed, Porto alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TAYLOR, Nigel; ZAPPI, Daniela. **Cacti: of Eastern Brazil**. Richmond, Surrey: Royal Botanic Gardens, Kew, 2004. 499 p.

VEIGA-BARBOSA, L. et al. Germination and cryopreservation of several cactus species from NE Brazil. **Seed Science and Technology**, v.38, p.218-224, 2010.

ZAPPI, Daniela. et al. **Plano de ação nacional para conservação das cactáceas**. Brasília: Instituto Chico Mendes de conservação da biodiversidade, ICMBio, 2011, 113p.

CAPÍTULO 2

Micropropagação de *Discocactus zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* e *Stephanocereus luetzelburgii*, cactos nativos da Chapada Diamantina – BA

RESUMO

O crescimento lento e a limitada capacidade reprodutiva tornam os métodos convencionais de propagação vegetativa ineficientes quando o objetivo é multiplicar espécies de cactáceas com potencial econômico. Neste contexto, as técnicas de cultura de tecidos têm sido amplamente utilizadas em virtude de superar certas limitações associadas à propagação de cactos e permitir uma rápida multiplicação em curto espaço de tempo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a morfogênese *in vitro* de *Discocactus zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* e *Stephanocereus luetzelburgii*, além de estabelecer protocolos para enraizamento e aclimatização das espécies. Para o estabelecimento do tipo e concentração de regulador vegetal ideal para a multiplicação, explantes transversais de 3 a 5 mm oriundos de plantas germinadas *in vitro* com diferentes idades fisiológicas, foram inoculados em meio MS/2 suplementado com diferentes concentrações de ácido naftalenoacético (ANA: 0 ou 1,34 μM) e 6-benzilaminopurina (BAP: 0; 2,22 ou 8,87 μM). Durante a multiplicação, também foi analisada a eficiência dos explantes transversais e longitudinais associados ou não, a injúrias mecânicas. Para o enraizamento, brotos derivados da multiplicação foram inoculados em meio MS/2 suplementados com 2 g L⁻¹ de carvão ativado ou 5 μM de ácido indolbutírico (AIB). Brotos micropropagados e enraizados ou diretamente destacados do explante foram aclimatizados com diferentes tamanhos em diferentes substratos. As injúrias mecânicas não favoreceram a multiplicação de nenhuma das espécies analisadas; 1,34 μM de ANA, em média, potencializou a multiplicação de *P. gounellei* e *S. luetzelburgii* e o explante longitudinal apresentou os melhores resultados para a brotação desta última espécie. Quanto à idade fisiológica, explantes oriundos de plantas mais velhas de *P. gounellei*, apresentaram maior potencial morfogénético. O carvão ativado e o AIB não favoreceram o enraizamento de *P. gounellei* e os brotos tanto de *P. gounellei* quando de *S. luetzelburgii*, exceto os ≤ 2 mm nesta última espécie, foram aclimatizados com mais de 85% de sobrevivência.

PALAVRAS-CHAVE: Aclimatização; Cactaceae; cultura de tecidos; enraizamento

ABSTRACT

Due to slow growth and limited reproductive capacity, the conventional methods of vegetative propagation have not been effective when the goal is to multiply cactus species with economic potential. In this context, tissue culture techniques have been largely used because they overcome certain limitations associated to cacti propagation and allow rapid multiplication in a short period of time. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* morphogenesis of *Discocactus zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* and *Stephanocereus luetzelburgii*, and establish protocols for rooting and acclimatization of the species. To establish the type and concentration of plant growth regulator ideal for proliferation, transverse explants with 3-5 mm of height originated from plants germinated *in vitro* with different physiological ages, were inoculated on MS/2 medium supplemented with different concentrations of naphthaleneacetic acid (NAA: 0 or 1.34 μM) and 6-benzylaminopurine (BAP: 0, 2.22 or 8.87 μM). During multiplication, it was also analyzed the efficiency of transverse and longitudinal explants associated or not to mechanical injuries. For rooting, shoots derived from multiplication were inoculated on MS/2 medium supplemented with 2 g L⁻¹ of activated charcoal or 5 μM indolbutyric acid (IBA). Micropropagated and rooted shoots or shoots directly detached from explants were acclimatized with different sizes on different substrates. Mechanical injuries did not favor any of the analyzed species, 1,34 μM of NAA, in general, favored the multiplication of *P. gounellei* and *S. luetzelburgii* and longitudinal explants increased shooting for the latter species. As to physiological age, explants originated from older plants of *P. gounellei* exhibited greater morphogenetic potencial. The activated charcoal and the IBA did not potentiate rooting for *P. gounellei* and the shoots of both species, except those ≤ 2 mm of *S. luetzelburgii*, were acclimatized with over 85% of survival.

KEYWORDS: Acclimatization; Cactaceae; tissue culture; rooting

INTRODUÇÃO

A família Cactaceae inclui cerca de 100 gêneros e 1400 espécies tipicamente americanas (ANDERSON, 2001; JUDD et al. 2009) e distribuídas em quatro centros geográficos de diversidade, sendo o leste do Brasil, o terceiro em ordem de importância (TAYLOR & ZAPPI, 2004). No entanto, apesar do grau de singularidade em termos de gêneros e espécies endêmicas, com relação às Américas como um todo, as cactáceas brasileiras vêm sendo severamente impactadas pela destruição e fragmentação de habitat bem como pela coleta desenfreada para satisfazer o comércio ornamental (ZAPPI et al. 2011).

Apesar da propagação convencional ser uma alternativa para a conservação de espécies ameaçadas (ROJAS-ARÉCHIGA & VÁZQUEZ-YANES, 2000), devido a fisiologia CAM (Metabolismo Ácido das Crassulaceas), os cactos freqüentemente apresentam crescimento lento e baixos índices de produção de sementes, germinação e brotação (HUBSTENBERGER et al. 1992; MALDA et al. 1999; SRISKANDARAJAH & SEREK, 2004; DÁVILA-FIGUEROA et al. 2005; KHALAFALLA et al. 2007; ESTRADA-LUNA et al. 2008). A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação devido ao tamanho dos propágulos utilizados, é a aplicação mais prática da cultura de tecidos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998) e tem sido uma alternativa aos métodos convencionais de propagação de cactáceas, por permitir uma rápida multiplicação de mudas livres de patógenos a partir de pouco material vegetal (HUBSTENBERGER et al. 1992; GIUSTI et al. 2002; PEREZ-MOLPHE-BALCH & DÁVILA-FIGUEROA, 2002; ROUT et al. 2006).

A organogênese *in vitro* é altamente dependente da interação entre os teores endógenos de hormônios produzidos pelo explante e os reguladores vegetais adicionados ao meio de cultura (GEORGE, 1993). Geralmente, a ausência ou baixos níveis de auxina combinados com moderado a altos níveis de citocininas, aumentam a produção de brotos (HUBSTENBERGER et al. 1992; GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; PHILLIPS, 2004; HARTMANN et al. 2011). Entretanto, durante o enraizamento os tipos e concentrações de auxina são as variáveis mais determinantes (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). O ANA, AIA e AIB são auxinas freqüentemente utilizadas para o enraizamento de espécies de cactáceas (CLAYTON et al. 1990; PAPAFOITIOU et al. 2001; JUÁREZ & PASSERA, 2002; PELAH et al. 2002;

PÉREZ-MOLPHE-BALCH & DÁVILA-FIGUEROA, 2002; FROTA et al. 2004; GARCIA-SAUCEDO et al. 2005; RETES-PRUNEDA et al. 2007). Contudo, visto que a morfogênese *in vitro* é genótipo dependente é necessário o estabelecimento de protocolos específicos a fim de estabelecer a combinação ótima de reguladores para cada espécie de cacto (CLAYTON et al. 1990; GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; ESTRADA-LUNA et al. 2008).

Apesar de já ter sido estabelecido o protocolo para a micropropagação de algumas espécies de cactáceas (MALDA et al. 1999; ROSAS et al. 2001; CHOREÑO-TAPIA et al. 2002; GIUSTI et al. 2002; PEREZ-MOLPHE-BALCH & DÁVILA-FIGUEROA et al. 2002; SANTOS-DÍAZ et al. 2003; DÁVILA-FIGUEROA et al. 2005; RAMIREZ-MALAGON et al. 2007; RUBIO & BARRERA, 2009; RUVALCABA-RUIZ et al. 2010) esses estudos ainda são escassos se comparados com os conhecimentos já obtidos para outras famílias de plantas (MOEBIUS-GOLDAMMER et al. 2003) e quase nenhuma espécie nativa com potencial ornamental tem sido cultivada com esta finalidade (ZAPPI et al. 2011). Na literatura, até o momento, não há relatos de trabalhos envolvendo a micropropagação de nenhuma das espécies estudadas.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a morfogênese *in vitro* de *Discocactus zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* e *Stephanocereus luetzelburgii*, além de estabelecer protocolos para enraizamento e aclimatização das espécies.

MATERIAL E METODOS

Material vegetal

Os explantes utilizados na realização dos experimentos foram oriundos de plantas germinadas *in vitro*. Para tanto, frutos maduros de *Discocactus zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* e *Stephanocereus luetzelburgii* foram coletados de diferentes populações em maio e agosto de 2010 nos municípios de Morro do Chapéu e Mucugê, Chapada Diamantina - BA. Após a retirada dos frutos, as sementes foram secas em papel de filtro, beneficiadas e armazenadas em sacos de papel craft à temperatura ambiente. Posteriormente, as sementes foram desinfestadas quimicamente por um

minuto em álcool absoluto e 15 minutos em hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) e lavadas três vezes em água estéril. Em seguida, as sementes foram inoculadas em meio MS (MURASHIGUE & SKOOG, 1962) com metade da concentração salina (MS/2) suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 6,5 g L⁻¹ de ágar. O meio de cultura teve o pH aferido para 5,6 - 5,8 e, posteriormente, foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C.

Efeito dos reguladores vegetais na multiplicação utilizando explantes de diferentes idades fisiológicas

Plantas de *D. zehntneri*, *P. gounellei* e *S. luetzelburgii* previamente estabelecidas *in vitro* com 39, 34 e 30 semanas respectivamente, foram seccionadas transversalmente em cilindros de 3 a 5 mm e posteriormente inoculadas em meio MS/2 suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose e com diferentes concentrações de ácido naftalenoacético (ANA: 0 ou 1,34 µM) e 6-benzilaminopurina (BAP: 0; 2,22 ou 8,87 µM). Os meios de cultura foram solidificados com 6,5 g L⁻¹ de ágar, tiveram o pH aferido para 5,6 - 5,8 e foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C. Além disso, para *P. gounellei* foi analisada a influência da idade fisiológica do explante, sendo utilizadas plantas com 34 ou 106 semanas.

O delineamento foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3x2 (BAP x ANA) para *D. zehntneri* e *S. luetzelburgii* e 3x2x2 (BAP x ANA x idade) para *P. gounellei*. Cada tratamento consistiu de cinco repetições com cinco explantes cada. Após 19 semanas as variáveis analisadas foram: calo (%), hiperidricidade (%), brotação (%), número de brotos/explante, matéria seca dos brotos (mg), enraizamento (%) e sobrevivência (%).

Efeito de injúrias em diferentes tipos de explantes

Plantas de *D. zehntneri*, *P. gounellei* e *S. luetzelburgii* previamente estabelecidas *in vitro* com 43 (*D. zehntneri* e *S. luetzelburgii*) e 128 semanas (*P. gounellei*) foram seccionadas transversalmente, em cilindros de 3 a 5 mm, e, em seguida, longitudinalmente, dando origem a dois tipos explante (Figura 1): transversal e

longitudinal. Após serem seccionados, parte dos explantes foram submetidos a injúrias mecânicas, que consistiram em leves pressões em cada aréola realizadas com o auxílio de uma pinça de ponta fina. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio MS/2 suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose. O meio de cultura foi solidificado com 6,5 g L⁻¹ de ágar, teve o pH aferido para 5,6 - 5,8 e foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C.

O delineamento foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2x2 (explante x injurias) com seis repetições com cinco explantes cada. Após 14 semanas as variáveis analisadas foram: calo (%), hiperidricidade (%), brotação (%), número de brotos/explante, enraizamento (%) e sobrevivência (%).

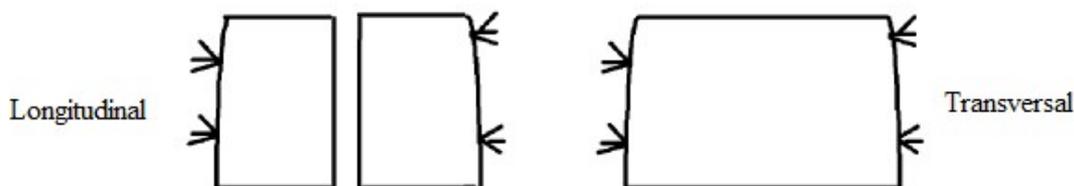


Figura 1. Secção do cladódio de plantas germinadas *in vitro* para origem de diferentes tipos de explantes (Adaptado: GIUSTI et al. 2002).

Enraizamento

Brotos de *P. gounellei* sem raízes oriundos da multiplicação *in vitro* com 5 a 8 mm de comprimento foram inoculados em 15 mL de meio MS/2 suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose (controle), acrescido de 2 g L⁻¹ de carvão ativo ou 5 µM de ácido indolbutírico (AIB). Os meios de cultura foram solidificados com 6,5 g L⁻¹ de ágar, tiveram o pH aferido para 5,6 - 5,8 e foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C.

O delineamento foi inteiramente casualizado com cinco repetições de dez brotos cada. Após oito semanas as variáveis analisadas foram enraizamento (%) e comprimento da maior raiz (CMR).

Aclimatização

Brotos micropropagados e enraizados de *P. gounellei* com 10 a 12 mm de comprimento foram transferidos para copos plásticos de 50 mL contendo três tipos de substratos, areia lavada, terra vegetal e areia lavada + terra vegetal, na proporção de 1:1.

Brotos micropropagados de *S. luetzelburgii* foram destacados do explante e diretamente transferidos para copos plásticos contendo areia lavada + terra vegetal na proporção de 1:1. Foram utilizados brotos de quatro tamanhos, de 8 a 11 mm, 5 a 7 mm, 3 a 4 mm e ≤ 2 mm.

As plantas foram mantidas em 100% de luminosidade e regadas pelo menos três vezes por semana. O delineamento foi inteiramente casualizado com quatro repetições de cinco plantas cada. Após seis semanas para *P. gounellei* e quatro semanas para *S. luetzelburgii* foi analisado o percentual de sobrevivência.

Condições de cultivo in vitro

Após a inoculação as unidades experimentais foram mantidas em sala de crescimento com $25 \pm 3^\circ$ C sob luz fluorescente ($60\mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$) e fotoperíodo de 16 horas.

Análise estatística

Para todos os experimentos foi realizada a análise de variância e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade através do programa estatístico Sisvar 5.1 (FERREIRA, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito dos reguladores vegetais na multiplicação utilizando explantes de diferentes idades fisiológicas

Para todas as espécies analisadas os brotos foram obtidos via organogênese direta a partir da ativação das aréolas (Figura 2). As diferenciações em brotos axilares iniciaram-se depois da quarta semana para *Discocactus zehntneri* (Figura 2C) e *Pilosocereus gounellei* (Figura 2A e B), independente da idade fisiológica do explante, e antes da quarta semana para *Stephanocereus luetzelburgii* (Figura 2D e E). Os resultados obtidos corroboram aqueles reportados para outras espécies de cactáceas (HUBSTENBERGER et al. 1992; RETES-PRUNEDA et al. 2007).

Similarmente, para *Turbinicarpus laui* (ROSAS et al. 2001) e *Cephalocereus senilis* (CHOREÑO-TAPIA et al. 2002) a formação de brotos também começou antes da quarta semana após a inoculação, e iniciou-se com um intumescimento das aréolas de onde, posteriormente, emergiram novos brotos (CHOREÑO-TAPIA et al. 2002). Quando a proliferação de brotos ocorre sem a formação da fase intermediária de calo evita o potencial para variação somaclonal e mantém a integridade genética das espécies (ROSAS et al. 2001; DÁVILA-FIGUEROA et al. 2005) o que é essencial tanto para a conservação (QUIALA et al. 2009) quanto para a produção comercial de mudas.

De modo geral, para todas as variáveis analisadas, os explantes derivados de plantas de *P. gounellei* com 34 semanas apresentaram as menores médias (Tabelas 1). Os melhores resultados para brotação (88%), brotos/explante (1,27), matéria seca (19,90 mg), enraizamento (100%) e sobrevivência (100%) foram obtidos nos tratamentos com explantes oriundos de plantas com 106 semanas. Estes resultados discordam dos obtidos para a bromélia *Neoreglia cruenta* (CARNEIRO et al. 1999), para a lenhosa *Pithecellobium saman* (VALVERDE-CERDAS et al. 1997), para o girassol, *Helianthus annuus* (SHIN et al. 2000) e o mamoeiro, *Carica papaya* (SCHMILDT & AMARAL, 2002), para os quais a brotação foi inversamente proporcional a idade do explante.

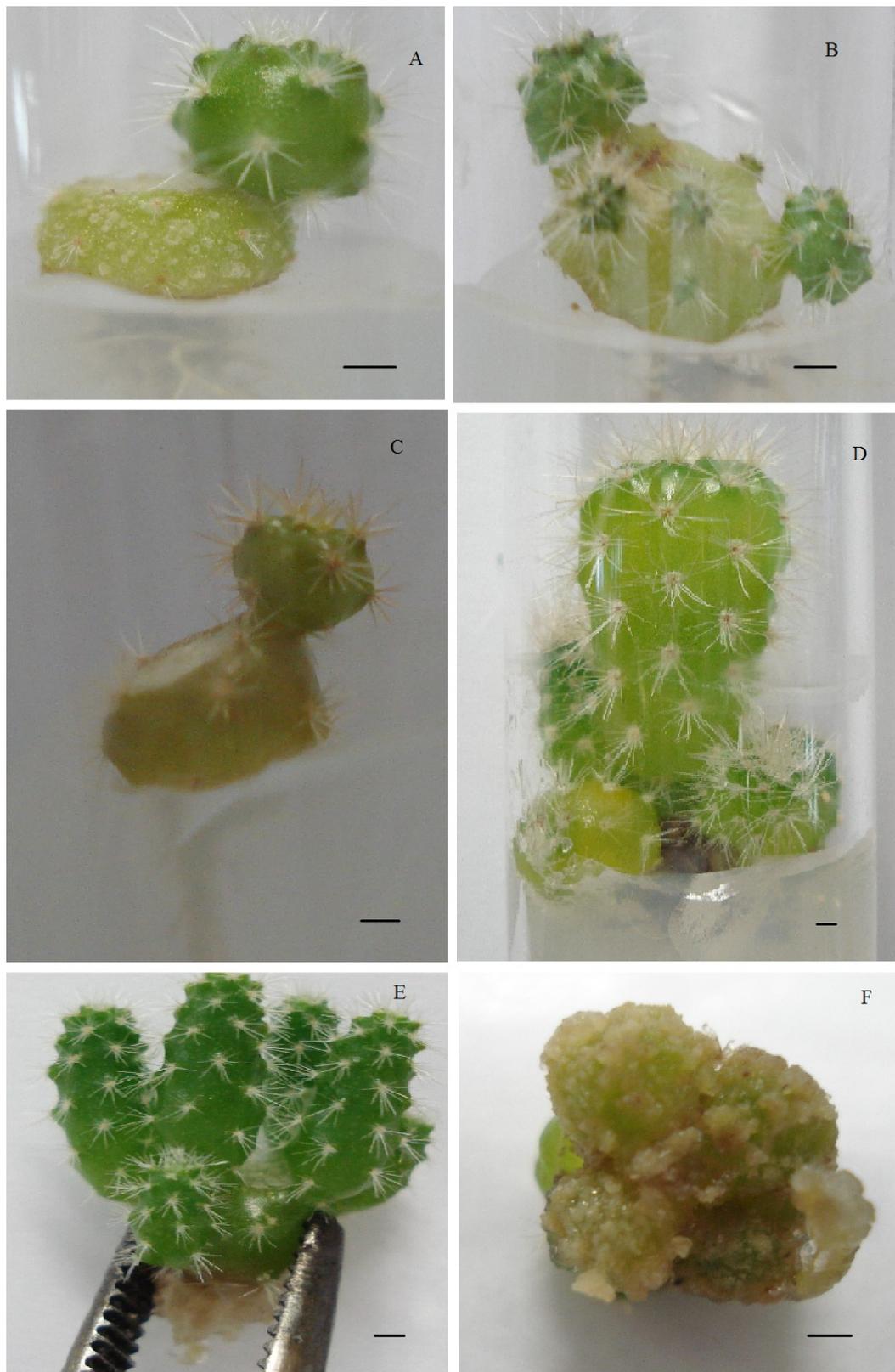


Figura 2. Brotos de *Pilosocereus gounellei*, com explantes de 34 (A) e 106 (B) semanas, *Discocactus zehntneri* (C) e *Stephanocereus luetzelburgii*, hiperidricos (D) e normais (E), e calogênese de *Stephanocereus luetzelburgii* (F) (Barras = 1 cm).

Tabela 1. Efeito de ANA, BAP e da idade do explante na brotação (%), número de brotos/explante, matéria seca dos brotos (mg), enraizamento (%) e sobrevivência (%) de *Pilosocereus gounellei*.

BAP (μM)	ANA (μM)			
	0,00		1,34	
	34 (semanas)		106 (semanas)	
Brotação (%)				
0,00	20 aA ^a	44 aA ^b	39 bA ^a	88 aA ^a
2,22	8 bA ^b	40 aA ^a	52 aA ^a	59 aA ^a
8,87	18 aA ^a	16 aA ^b	13 bA ^a	54 aA ^a
Brotos/explante				
0,00	0,20 aA ^b	0,48 aA ^b	0,81 aA ^a	1,27 aA ^a
2,22	0,12 aA ^a	0,44 aA ^a	0,60 aA ^a	0,59 aA ^a
8,87	0,16 aA ^a	0,16 aA ^b	0,13 bA ^a	0,99 aA ^a
Matéria seca (mg)				
0,00	3,38 aA ^a	8,58 aA ^b	6,86 bA ^a	19,90 aA ^a
2,22	0,52 aA ^a	3,14 aA ^b	9,02 aA ^a	13,84 aA ^b
8,87	0,68 aA ^a	0,76 aA ^a	1,13 aA ^a	6,72 aA ^b
Enraizamento (%)				
0,00	52 bA ^b	84 aA ^a	80 aA ^a	100 aA ^a
2,22	73 bA ^a	96 aA ^a	88 aA ^a	100 aA ^a
8,87	75 aA ^a	92 aA ^a	87 aA ^a	100 aA ^a
Sobrevivência (%)				
0,00	92 aA ^b	96 aA ^a	100 aA ^a	100 aA ^a
2,22	100 aA ^a	100 aA ^a	100 aA ^a	100 aA ^a
8,87	100 aA ^a	100 aA ^a	100 aA ^a	100 aA ^a

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas, maiúsculas nas colunas e sobrescritas para comparação entre idades, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A idade fisiológica do explante é um dos fatores que interfere na propagação *in vitro* (MURASHIGUE, 1974; GEORGE, 1993). Explantes mais jovens apresentam um potencial morfogênético maior que os mais velhos (GEORGE, 1993; PERES, 2002). Segundo SHIN et al. (2000), o sucesso na propagação de explantes mais jovens pode ser

atribuído a existência de muitas células meristemáticas e indiferenciadas e para BISPO et al. (2007) os explantes mais jovens respondem melhor devido ao fato de apresentarem crescimento rápido, o que é essencial para iniciar as culturas.

Em *P. gounellei*, nos meios suplementados com auxina, os explantes apresentaram um maior potencial organogênico independente da idade fisiológica (Tabela 1). Para os explantes com 34 semanas, a presença de auxina aumentou significativamente o percentual de brotação no tratamento suplementado com 2,22 μM de BAP (40%). Além disso, o enraizamento tanto no tratamento apenas com ANA (84%) quanto no que associou ANA a 2,22 μM de BAP (96%) também foi significativamente aumentado. Nos explantes oriundos de plantas mais velhas, os resultados seguiram a mesma tendência, ou seja, 1,34 μM de ANA, tanto aumentou a brotação nos meios suplementados apenas com esta auxina (88%) quanto no combinado com 8,87 μM de BAP (54%). A associação de ANA com a maior concentração de BAP também aumentou o número de brotos/explante (0,99). Entretanto, o melhor resultado para a matéria seca dos brotos ocorreu no meio suplementado apenas com ANA (19,90 mg), e, neste caso, a associação com 8,87 μM de BAP, reduziu significativamente a matéria seca dos brotos (6,72 mg).

Para *S. luetzelburgii* os meios suplementados com auxina também apresentaram um maior potencial organogênico (Tabela 2). Os percentuais de brotação foram significativamente maiores tanto no tratamento com ANA (96%) quanto no que associou ANA à maior concentração de BAP (100%). O tratamento 1,34 μM de ANA + 8,87 μM de BAP também apresentou o melhor resultado para a matéria seca dos brotos (104,20 mg).

Embora a habilidade das auxinas em induzirem a regeneração *in vitro* ser pouco discutida nos trabalhos e esta classe de regulador ser dispensável ou requerida em baixas concentrações durante a multiplicação *in vitro* (CLAYTON et al. 1990; HUBSTENBERGER et al. 1992; GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; PHILLIPS, 2004; HARTMANN, 2011) em alguns casos auxinas somente podem ser suficiente para induzir a formação de brotos (HARTMANN, 2011) e, segundo alguns autores, elas podem estar envolvidas nas respostas morfogenéticas em Cactaceae (RUBLO et al. 2002), o que corrobora os resultados obtidos neste trabalho.

Tabela 2. Efeito de ANA e BAP na indução de calo (%), brotação (%), número de brotos por explante, matéria seca de brotos (mg), enraizamento (%) e sobrevivência (%) de *Stephanocereus luetzelburgii*.

BAP (μM)	ANA (μM)	
	0,00	1,34
Calo (%)		
0,00	0aA	0,00aA
2,22	0aA	4,00aA
8,87	4aA	4,00aA
Brotação (%)		
0,00	79bA	96aA
2,22	92aA	96aA
8,87	80bA	100aA
Brotos/explante		
0,00	1,73aA	2,52aA
2,22	1,88aA	1,58aA
8,87	2,72aA	2,66aA
Matéria seca (mg)		
0,00	33,92aA	67,96aAB
2,22	46,76aA	47,74aB
8,87	55,00bA	104,20aA
Enraizamento (%)		
0,00	79aA	96aA
2,22	92aA	96aA
8,87	72aA	83aA
Sobrevivência (%)		
0,00	91aA	96aA
2,22	96aA	100aA
8,87	88aA	92aA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A concentração de 1,34 μM de ANA, mais elevada em relação à utilizada em outros trabalhos (MALDA et al. 1999; PAPAFOITOU et al. 2001; GIUSTI et al. 2002; KHALAFALLA et al. 2007; RUVALCABA-RUIZ et al. 2010), apresentou, em média, os melhores resultados. Entretanto, estes resultados discordam dos obtidos para a maioria das espécies de cactáceas cuja multiplicação *in vitro* é favorecida pela utilização de citocininas, como BAP, TDZ, cinetina e 2iP (ROSAS et al. 2001; CHOREÑO-TAPIA et al. 2002; PÉREZ-MOLPHE-BALCH & DÁVILA-FIGUEROA, 2002; FROTA et al. 2004; SRISKANDARAJAH & SEREK, 2004; DÁVILA-FIGUEROA et al. 2005; GARCÍA-SAUCEDO et al. 2005; KHALAFALLA et al. 2007; RAMIREZ-MALAGON et al. 2007; RETES-PRUNEDA et al. 2007; ESTRADA-LUNA et al. 2008; QUIALA et al. 2009; ZOGHLAMI et al. 2012).

Segundo GRATTAPAGLIA & MACHADO (1998), as citocininas são indispensáveis na quebra da dominância apical e indução de gemas axilares e os tipos bem como as concentrações destes reguladores vegetais são os fatores que mais influenciam o sucesso na multiplicação *in vitro*. Contudo, a combinação ótima de reguladores vegetais que maximize a multiplicação pode ser única para cada espécie de cacto (CLAYTON et al. 1990; MALDA et al. 1999; DÁVILA-FIGUEROA et al. 2005).

De acordo com a Tabela 3 a maior concentração de BAP, independente da presença de auxina, aumentou significativamente a hiperidricidade dos brotos de *S. luetzelburgii* (24 e 40%) (Figura 2D). Elevadas concentrações de BAP também contribuíram para a formação de brotos hiperidricos em *Pilosocereus robinii* (QUIALA et al. 2009).

A hiperidricidade ou vitrificação é uma desordem morfológica e fisiológica de plantas propagadas vegetativamente *in vitro* (HAZARIKA, 2006) e já foi relatada durante a micropropagação de algumas espécies de cactáceas (GIUSTI et al. 2002; PÉREZ-MOLPHE-BALCH et al. 2002; PÉREZ-MOLPHE-BALCH & DÁVILA-FIGUEROA, 2002; SANTOS-DÍAS et al. 2003).

Tabela 3. Efeito de ANA e BAP na hiperidricidade dos brotos de *Stephanocereus luetzelburgii*.

BAP (μM)	ANA (μM)	
	0,00	1,34
0,00	0aB	4aB
2,22	0aB	8aB
8,87	24aA	40aA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Fisiologicamente, a hiperidricidade envolve a absorção de água em excesso e inibição da síntese de lignina e celulose (HARTMANN, 2011). Fatores como a alta umidade, baixa concentração ou ausência de ágar, altas concentrações de íons amônio e desbalanço hormonal podem levar à formação de órgãos anormais com aparência quebradiça e encharcada de água (GEORGE, 1993; GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; PÉREZ-MOLPHE-BALCH et al. 2002; PÉREZ-MOLPHE-BALCH & DÁVILA-FIGUEROA, 2002; HARTMANN et al. 2011).

Embora a hiperidricidade não reduza o número de brotos produzidos (Figura 2D), pode impedir o enraizamento (PÉREZ-MOLPHE-BALCH et al. 2002) e a sobrevivência *ex vitro* (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; PÉREZ-MOLPHE-BALCH et al. 2002). Segundo GEORGE (1993) brotos hiperidricos são facilmente danificados pela luz solar excessiva ou dessecação e sobrevivem muito mal quando subcultivados ou transferidos para o ambiente externo.

Os melhores resultados para a o enraizamento (88%) e sobrevivência (96%) dos explantes de *D. zehntneri* ocorreram nos tratamentos em que ANA esteve associada à maior concentração de BAP (Tabela 4). A brotação e a matéria seca dos brotos foram significativamente reduzidas nos meios de cultura suplementados com auxina ou com citocinina somente e as maiores médias para estas duas variáveis, 26% e 1,32 mg respectivamente, ocorreram na ausência de regulador vegetal.

Tabela 4. Efeito de ANA e BAP sobre brotação (%), número de brotos/explante, matéria seca de brotos (mg), enraizamento (%) e sobrevivência (%) de *Discocactus zehntneri*.

BAP (μM)	ANA (μM)	
	0,00	1,34
Brotação (%)		
0,00	26aA	4bA
2,22	8aAB	4aA
8,87	4aB	12aA
Brotos/explante		
0,00	0,34aA	0,08aA
2,22	0,16aA	0,08aA
8,87	0,04aA	0,32aA
Matéria seca (mg)		
0,00	1,32aA	0,10bA
2,22	0,10aB	0,08aA
8,87	0,18aAB	0,38aA
Enraizamento (%)		
0,00	51aA	53aB
2,22	49aA	68aAB
8,87	20bA	88aA
Sobrevivência (%)		
0,00	80aA	63aB
2,22	71aAB	88aAB
8,87	50bB	96aA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Apesar da adição de reguladores vegetais suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões promotoras na planta-matriz (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998) e, algumas espécies de cactos não emitirem brotos na ausência de regulador (RETES-PRUNEDA et al. 2007) as três espécies manifestaram, ainda que limitado, potencial morfogênico em

meios de cultura desprovidos de ANA e/ou BAP (Tabelas 1-4). Estes resultados corroboram os obtidos para outras espécies de cactos como *Coryphantha retusa* (RUVALCABA-RUIZ et al. 2010) *Mammillaria mathildae* (RUBIO & BARRERA, 2009), *M. densispina*, *M. hahniana*, *M. hutchisoniana*, *M. orcutii*, *M. perbella*, *M. picta*, *M. rhodantha*, *M. zephyranthoides*, *M. bocasana*, *M. pectinifera* (RAMIREZ-MALAGON et al. 2007), *M. san-angelensis* (RUBLO et al. 2002), *M. elongata* (PAPAFOTIOU et al. 2001), *Pilosocereus robinii* (QUIALA et al. 2009), *Opuntia lanigera* (ESTRADA-LUNA et al. 2008), *Pelecyphora aselliformis*, *P. strobiliformis* (PÉREZ-MOLPHE-BALCH & DÁVILA-FIGUEROA, 2002) e *Turbincarpus laui* (ROSAS et al. 2001) que apresentaram potencial organogênico nos meios desprovidos de reguladores vegetais, demonstrando a síntese de hormônios endógenos durante o cultivo *in vitro* (HUBSTENBERGER et al. 1992).

Efeito das injúrias e de diferentes tipos de explantes

Para *D. zehntneri* o explante transversal exibiu os melhores resultados para o enraizamento (73%), na ausência de injúrias mecânicas e sobrevivência (67%), quando associado à presença de injúrias (Tabela 5). Entretanto, em *S. luetzelburgii* os melhores resultados para as variáveis brotação (96,6%) e número de brotos/explante (1,66) ocorreram no explante longitudinal na ausência de injúrias (Tabela 6).

Para *Mammillaria mathildae* (RUBIO & BARRERA, 2009), *Opuntia ficus-indica* variedades Copena F1 e Orelha-de-onça (LEMOS et al. 2010) e *Nopalea cochenillifera* (VASCONCELOS et al. 2007) o explante longitudinal apresentou os melhores resultados para multiplicação, o que corrobora os obtidos para *S. luetzelburgii*. O aumento da superfície de contato entre o explante e o meio de cultura pode justificar o maior potencial morfogênico apresentado (VASCONCELOS et al. 2007; LEMOS et al. 2010). Entretanto, para outras espécies de cactáceas como *Pelecyphora aselliformis* (GIUSTI et al. 2002), *Hylocereus undatus* (MOHAMED-YASSEEN, 2002), *Turbincarpus laui*, *T. lophophoroides*, *T. pseudopectinatus*, *T. subterraneus*, *T. schmiedickeanus* subsp. *klinkerianus* (DÁVILA-FIGUEROA et al. 2005), *Carnegiea gigantea*, *Pachycereus pringlei* e *Stenocereus thurberi* (PÉREZ-MOLPHE-BALCH et al. 2002) o explante transversal apresentou os melhores resultados. Neste caso, a baixa eficiência do explante longitudinal, foi atribuída ao seu pequeno tamanho inicial, a

poucas aréolas por área e a um possível dano a algumas aréolas durante a sua excisão (MOHAMED-YASSEEN, 2002).

Tabela 5. Efeito de injúrias mecânicas e de diferentes tipos de explantes na brotação (%), número de brotos/explante, enraizamento (%) e sobrevivência (%) de *Discocactus zehntneri*.

Injúria	Explante	
	Transversal	Longitudinal
Brotação (%)		
Ausência	3,3aA	3,3aA
Presença	3,3aA	0,0aA
Brotos/explante		
Ausência	0,03aA	0,03aA
Presença	0,03aA	0,00aA
Enraizamento (%)		
Ausência	73aA	47bA
Presença	20aB	0aB
Sobrevivência (%)		
Ausência	100aA	97aA
Presença	67aB	10bB

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Tabela 6. Efeito de injúrias mecânicas e de diferentes tipos de indução de calo (%), hiperidricidade (%), brotação (%), número de brotos/explante, enraizamento (%) e sobrevivência (%) de *Stephanocereus luetzelburgii*.

Injúria	Explante	
	Transversal	Longitudinal
Calo (%)		
Ausência	0aB	0aB
Presença	30aA	30aA
Hiperidricidade (%)		
Ausência	0aB	0aB
Presença	63aA	47aA
Brotação (%)		
Ausência	73,3bA	96,6aA
Presença	66,6aA	60,0aB
Brotos/explante		
Ausência	1,13bA	1,66aA
Presença	1,26aA	0,90aB
Enraizamento (%)		
Ausência	87aA	100aA
Presença	77aA	83aB
Sobrevivência (%)		
Ausência	100aA	100aA
Presença	100aA	100aA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Para *P. gounellei* não houve diferença significativa entre os explantes testados (Tabela 7).

Tabela 7. Efeito de injúrias mecânicas e de diferentes tipos de explantes na brotação (%), número de brotos/explante, enraizamento (%) e sobrevivência (%) de *Pilosocereus gounellei*.

Injúria	Explante	
	Transversal	Longitudinal
Brotação (%)		
Ausência	13,3aA	16,6aA
Presença	3,3aA	0,0aB
Brotos/explante		
Ausência	0,13aA	0,16aA
Presença	0,03aA	0,00aB
Enraizamento (%)		
Ausência	57aA	47aA
Presença	17aB	20aA
Sobrevivência (%)		
Ausência	97aA	73aA
Presença	47aB	27aB

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Um dos métodos mais usados para propagação *in vitro* de cactáceas é a geração de brotos através da ativação de aréolas, estrutura de onde partem os espinhos e pelos, que contém as gemas axilares (HUBSTENBERGER et al. 1992; RETES-PRUNEDA et al. 2007). Segundo GRATTAPAGLIA & MACHADO (1998) apesar de diversos explantes serem utilizados para a propagação *in vitro*, na prática, procura-se utilizar aqueles que contenham maior proporção de tecido meristemático e, portanto, para multiplicação de cactos, os tratamentos que contenham explantes com maior número de aréolas são, em geral, mais eficientes (RETES-PRUNEDA et al. 2007).

O tamanho reduzido do explante pode ter sido a causa da baixa sobrevivência (10%) do explante longitudinal em *D. zehntneri* (Tabela 5). O tamanho do explante determina as suas possibilidades de sobrevivência e capacidade de crescimento

(GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998) e explantes muito pequenos não sobrevivem *in vitro* (GEORGE, 1993).

O uso de explantes apicais ou brotos inteiros na micropropagação de cactos apesar de ser relatado em muitos trabalhos (GIUSTI et al. 2002; PÉREZ-MOLPHE-BALCH et al. 2002; VASCONCELOS et al. 2007; RUBIO & BARRERA, 2009; LEMOS et al. 2010), geralmente não tem apresentado os melhores resultados em virtude da dominância apical, que impede o desenvolvimento das gemas axilares e, portanto, reduz a taxa de multiplicação (CHOREÑO-TAPIA et al. 2002; MOHAMED-YASSEEN, 2002; RUBLO et al. 2002; DÁVILA-FIGUEROA et al. 2005; VASCONCELOS et al. 2007; QUIALA et al. 2009; LEMOS et al. 2010). Segundo CHOREÑO-TAPIA et al. (2002) a eliminação do ápice estimula a síntese de citocininas que ativam as aréolas e conseqüentemente induzem o crescimento de brotos. Os explantes florais também podem ser uma alternativa para a propagação de representantes desta família, pois além de apresentarem potencial organogênico não oferecem dano a planta original, contudo, ainda existem poucos estudos que incluam tecidos florais no estabelecimento de protocolos para a micropropagação de representantes da família (WYKA et al. 2006).

A presença de injúrias não favoreceu a multiplicação de nenhuma das espécies (Tabelas 5-7). Em *D. zehntneri* as injúrias reduziram o enraizamento (20% nos explantes transversais e 0% nos explantes longitudinais) e a sobrevivência (67% nos explantes transversais e 10% nos explantes longitudinais) em ambos os tipos de explantes (Tabela 5). Para *S. luetzelburgii* as injúrias mecânicas favoreceram o aumento da calogênese (30%) e hiperidricidade (63 e 47%) independente do tipo de explante. Além disso, a brotação (60%), o número de brotos/explante (0,90) e o enraizamento (83%), quando associados ao explante longitudinal, também foram desfavorecidos (Tabelas 6). Em *P. gounellei* a brotação (0%) e número de brotos/explante (0%) no explante longitudinal, o enraizamento apenas no explante transversal (17%) e a sobrevivência em ambos os tipos de explantes (47% nos explantes transversais e 27% nos explantes longitudinais) também foram reduzidos nos tratamento com injúrias mecânicas (Tabela 7).

Apesar de injúrias mecânicas realizadas em condições *ex vitro* induzirem a brotação em diversas espécies de cactáceas (dados não apresentados), provavelmente

devido a outros fatores químicos e físicos que controlam a morfogênese *in vitro* este tratamento não apresentou bons resultados para as três espécies estudadas.

Enraizamento

Não houve diferença significativa para o percentual de enraizamento e comprimento da maior raiz em brotos de *P. gounellei* entre o controle e os meios suplementados com carvão ativado ou AIB. O elevado percentual de enraizamento obtido no controle (90%) evidencia que os brotos desta espécie enraízam espontaneamente (Tabela 8).

Tabela 8: Efeito do meio de cultura sobre enraizamento e comprimento da maior raiz (CMR) de brotos micropropagados de *Pilosocereus gounellei*.

Meio de cultura	Enraizamento (%)	CMR (mm)
MS/2	90a	12,3a
MS/2 + Carvão ativado	92a	14,6a
MS/2 + AIB	96a	9,8a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os resultados encontrados corroboram aqueles reportados para outras espécies de cactáceas que também apresentaram enraizamento espontâneo em meio de cultura na ausência de carvão ativado e/ou reguladores vegetais como *Pilosocereus robinii* (QUIALA et al. 2009), *Escobaria minima*, *Mammillaria pectinifera*, *Peleciphora aselliformis* (GIUSTI et al. 2002), *Mammillaria mathildae* (RUBIO & BARRERA, 2009), *Coryphantha retusa* (RUVALCABA-RUIZ et al. 2010), *Mammillaria san-angelensis* (RUBLO et al. 2002), *Nopalea cochenillifera* (VASCONCELOS et al. 2007), *Opuntia ficus-indica* (KHALAFALLA et al. 2007; ANGULO-BEJARANO & PAREDES-LÓPEZ, 2011), *Opuntia lanigera* (ESTRADA-LUNA et al. 2008), *Cephalocereus senilis* (CHOREÑO-TAPIA et al. 2002), *Mammillaria carmenae* (RETES-PRUNEDA et al. 2007), *Notocactus magnificus* (MEDEIROS et al. 2006),

Turbincarpus laui (ROSAS et al. 2001; DÁVILA-FIGUEROA et al. 2005), *Coryphantha minima* (MALDA et al. 1999), *Turbincarpus lophophoroides*, *T. pseudopectinatus*, *T. schmiedickeanus* subsp. *flaviflorus*, *T. schmiedickeanus* subsp. *klinkerianus*, *T. schmiedickeanus* subsp. *schmiedickeanus*, *T. subterraneus* e *T. valdezianus* (DÁVILA-FIGUEROA et al. 2005).

O enraizamento de espécies herbáceas é geralmente fácil, pois as partes aéreas em rápido crescimento são fontes de intensa produção de auxina, a qual é translocada para a base, estimulando a rizogênese (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Além disso, a capacidade para produzir excesso de auxina *in vitro* (HUBSTENBERGER et al. 1992) pode justificar o enraizamento na ausência de reguladores vegetais para diversas espécies de cactos.

Entretanto, para algumas espécies, o enraizamento pode ser um fator limitante na micropropagação e alguns autores sugerem a utilização de diversas auxinas, sozinhas ou em combinação, para a rizogênese *in vitro* (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; PÉREZ-MOLPHE-BALCH et al. 2002; SANTOS-DÍAS et al. 2003). Para o enraizamento de cactos o ANA, AIA e AIB, em diferentes concentrações, têm sido comumente utilizados (CLAYTON et al. 1990; PAPAFOITIOU et al. 2001; JUÁREZ & PASSERA, 2002; PELAHA et al. 2002; PÉREZ-MOLPHE-BALCH & DÁVILA-FIGUEROA, 2002; FROTA et al. 2004; GARCIA-SAUCEDO et al. 2005; RETES-PRUNEDA et al. 2007).

Apesar do carvão ativado não ter influenciado o enraizamento de *P. gounellei*, para espécies como *Echinocereus schmollii* e *Escontria chiotilla* a adição de 2 g L⁻¹ deste componente ao meio de cultura aumentou significativamente o enraizamento dos brotos (RETES-PRUNEDA et al. 2007). O carvão ativado favorece o enraizamento *in vitro* por, dentre outros fatores, simular condições de escuro que interfere atividade e/ou estabilidade de reguladores vegetais e na qual as raízes fisiologicamente desenvolvem-se melhor além de reter parte dos elementos que compõe o meio, fixar citocininas residuais trazidas nos tecidos das plantas e adsorver compostos tóxicos inibidores do enraizamento (GEORGE, 1993; ASSIS & TEIXEIRA, 1998; GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; PAN & STADEN, 1998).

Reguladores vegetais utilizados na etapa de multiplicação podem ter efeitos negativos no estágio subsequente de enraizamento. Altas concentrações de citocininas usadas para proliferação de brotos podem afetar a indução de raízes (HUBSTENBERGER et al. 1992). Entretanto, apesar dos brotos utilizados neste experimento terem sido oriundos de meios próprios para multiplicação, suplementados com diferentes concentrações de citocininas, não foi observada nenhuma limitação para a rizogênese nos tratamentos.

Aclimatização

Não houve diferença significativa entre os substratos analisados na aclimatização de brotos de *P. gounellei* (Tabela 9). Similarmente, para *Melocactus glaucescens* o percentual de sobrevivência também não diferiu significativamente entre os mesmos substratos testados neste trabalho (RESENDE et al. 2010). Entretanto, estes resultados discordam dos obtidos para as espécies *Mammillaria herrerae* (RETES-PRUNEDA et al. 2007) e *Notocactus magnificus* (MEDEIROS et al. 2006) cujo tipo de substrato foi determinante na capacidade de sobrevivência das espécies após o transplântio.

Tabela 9: Efeito de diferentes substratos na sobrevivência de brotos aclimatizados de *Pilosocereus gounellei*.

Substrato	Sobrevivência (%)
Areia	100a
Terra vegetal	100a
Areia + Terra vegetal	95a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Segundo GRATTAPAGLIA & MACHADO (1998) o substrato de transplântio deve ter uma boa capacidade de retenção de umidade e não compactar excessivamente, comprometendo a drenagem e a aeração do sistema radicular. Contudo, a aclimatização

em substratos com elevada umidade pode ter estimulado o aparecimento de doenças e comprometido a sobrevivência de *Notocactus magnificus* (MEDEIROS et al. 2006).

O tamanho dos brotos de *S. luetzelburgii* interferiu significativamente na sobrevivência (Tabela 10). Não houve sobrevivência para nenhum broto ≤ 2 mm, o que demonstra que o sucesso na aclimatização desta espécie está diretamente relacionado ao tamanho das plantas propagadas. Provavelmente, os brotos ≤ 2 mm apresentaram dificuldade em fixar-se no substrato e emitir raízes o que pode ter comprometido a sua sobrevivência. A dificuldade no enraizamento de partes aéreas pequenas, segundo GRATTAPAGLIA & MACHADO (1998) torna necessária uma fase intermediária de alongamento.

Tabela 10: Efeito do tamanho dos brotos na sobrevivência (%) de *Stephanocereus luetzelburgii*.

Tamanho dos brotos	Sobrevivência (%)
8 – 11 mm	100a
5 – 7 mm	95a
3 – 4 mm	85a
≤ 2 mm	0b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Brotos aclimatizados de *Stephanocereus luetzelburgii* apresentaram elevada sobrevivência imediatamente após a etapa de multiplicação. A eliminação da etapa de enraizamento além de ser desejável do ponto de vista econômico (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; HAZARIKA et al. 2006), melhora a qualidade do sistema radicular formado na planta. A regeneração de raízes diretamente no substrato tende a produzir um sistema radicular mais completo e funcional, com maior número de raízes secundárias; evita a manipulação de plantas de raiz nua, ou poda de raízes, práticas que muitas vezes resultam em má qualidade do transplântio e até na morte das plantas; e impede a fase intermediária de calo, que dificulta a conexão do sistema vascular entre caule e raiz (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). A etapa de enraizamento

também foi eliminada com sucesso durante a micropropagação de *Melocactus glaucescens* (RESENDE et al. 2010). Entretanto, comprometeu a aclimatização de *Notocactus magnificus* (MEDEIROS et al. 2006).

A transferência da planta da condição *in vitro* para a *ex vitro* é uma etapa crítica e representa, em alguns casos, um fator limitante do processo de micropropagação (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; HARTMANN et al. 2011). As condições do ambiente *in vitro* como elevadas concentrações de nutrientes orgânicos e inorgânicos, baixa luminosidade, alta umidade e poucas trocas gasosas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; ROUT et al. 2006) induzem mudanças morfológicas e fisiológicas nas plantas regeneradas, o que segundo alguns autores, torna necessária uma aclimação gradual do laboratório ao campo para a sobrevivência das espécies (BARBOZA et al. 2006; HAZARIKA, 2006; ROUT et al. 2006). No entanto, nenhuma etapa de rustificação foi necessária para a sobrevivência das espécies. Características morfofisiológicas típicas da família Cactaceae e que minimizam o estresse hídrico típico de ambientes xéricos podem justificar as taxas elevadas de sobrevivência, como o metabolismo CAM e a presença de um caule suculento anatomicamente constituído de parênquima aquífero e estruturas secretoras de mucilagem (MALDA et al. 1999; ARRUDA et al. 2005).

Outros representantes da família Cactaceae como *Opuntia ficus-indica* (GARCÍA-SAUCEDO et al. 2005; KHALAFALLA et al. 2007; ÂNGULO-BEJARANO & PAREDES-LÓPEZ, 2011), *Coryphantha retusa* (RUVALCABA-RUIZ et al. 2010), *Mammillaria mathildae* (RUBIO & BARRERA, 2009), *Pilosocereus robinii* (QUIALA et al. 2009), *Opuntia lanigera* (ESTRADA-LUNA et al. 2008), *Nopalea cochenillifera* (VASCONCELOS et al. 2007), *Turbincarpus* spp. (ROSAS et al. 2001; DÁVILA-FIGUEROA et al. 2005), os híbridos, *Schlumbergera*, *Rhipsalidopsis* (SRISKANDARAJAH & SEREK, 2004), *Escobaria minima*, *Mammillaria pectinifera*, *Pelecypora aselliformis* (GIUSTI et al. 2002; PÉREZ-MOLPHE-BALCH & DÁVILA-FIGUEROA, 2002), *Opuntia ellisiana* (JUÁREZ & PASSERA, 2002), *Mammillaria san-angelensis* (RUBLO et al. 2002), *Pelecypora strobiliformis* (PÉREZ-MOLPHE-BALCH & DÁVILA-FIGUEROA, 2002), *Selenicereus megalanthus* (PELAH et al. 2002), *Carnegiea gigantea*, *Pachycereus pringlei*, *Stenocereus thurberi* (PÉREZ-MOLPHE-BALCH et al. 2002) e *Mammillaria*

elongata (PAPAFOTIOU et al. 2001), também apresentaram elevadas taxas de sobrevivência em condições *ex vitro*, o que corrobora os resultados obtidos.

CONCLUSÃO

O potencial organogênico das três espécies estudadas foi potencializado pela adição de auxina ao meio básico. O tipo de explante em *Discocactus zehntneri* e *Stephanocereus luetzelburgii* interferiu significativamente nas variáveis analisadas. Plantas com a idade fisiológica mais elevada são mais apropriadas para a multiplicação de *Pilosocereus gounellei*. As injúrias mecânicas desfavoreceram a multiplicação das três espécies estudadas. Devido à baixa taxa de multiplicação das espécies, sugere-se a utilização de outros tipos citocininas e concentrações mais elevadas de ANA. Brotos de *P. gounellei* enraízam espontaneamente *in vitro* e para *S. luetzelburgii* esta etapa é desnecessária. A sobrevivência de *P. gounellei* não foi comprometida pelos substratos testados e a aclimatização de *S. luetzelburgii* deve ocorrer em brotos maiores que 2 mm.

REFERENCIAS

ANDERSON, Edward F. **The Cactus Family**. Portland: Timber Press, 2001. 776p.

ANGULO-BEJARANO, P. I.; PAREDES-LÓPEZ, O. Development of a regeneration protocol through indirect organogenesis in prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill). **Scientia Horticulturae**, v.128, p.283–288, 2011.

ARRUDA, E. MELO-DE-PINNA, G. F.; ALVES, M. Anatomia dos órgãos vegetativos de Cactaceae da caatinga pernambucana. **Revista Brasileira Botânica**, v.28, n.3, p.589-601, 2005.

ASSIS, Teotonio Francisco; TEIXEIRA, Silvio Lopes. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, Antônio Carlos, CALDAS, Linda Styer, BUSO, José Amauri. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de plantas**. vol.1. Brasília: Embrapa-SPI, 1998, cap.10, p.261-269.

BARBOZA, S. B. S. C. et al. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.2, p.185-194, 2006.

BISPO, N. B. et al. Indução de embriogênese somática em diferentes explantes de aveia. (*Avena sativa* L.). **Ciência Rural**, v.37, n.3, p. 890-893, 2007.

CARNEIRO, L. A. et al. *In vitro* regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L.B. Smith, an endemic bromeliad from Eastern Brazil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.55, p.79–83, 1999.

CHOREÑO-TAPIA, J. M. et al. Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* Haworth Pfeiffer a partir de aréolas. **Revista Chapingo Serie Horticultura**, v.8, n.2, p.183-196, 2002.

CLAYTON, P. W. et al. Micropropagation of members of the Cactaceae subtribe Cactinae. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.115, n.2, p.337-343, 1990.

DÁVILA-FIGUEROA, C. A. et al. *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v. 41, p.540–545, 2005.

ESTRADA-LUNA, A. A. et al. *In vitro* micropropagation of the ornamental prickly pear cactus *Opuntia lanigera* Salm–Dyck and effects of sprayed GA₃ after transplantation to ex vitro conditions. **Scientia Horticulturae**, v.117, p.378–385, 2008.

FEREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Científica Symposium**, v.6, n.2, p.36-41, 2008.

FROTA, H. M. et al. Proliferação e enraizamento *in vitro* de brotos de palma forrageira-*Opuntia ficus-indica* (L.) MILL. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.26, n.2, p. 235-238, 2004.

GARCÍA-SAUCEDO, P. A. et al. Plant regeneration of three *Opuntia* genotypes used as human food. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.80, p.215-219, 2005.

GEORGE, Edwin. F. **Plant propagation by tissue culture. Part. 1. The Technology**, 2ed. Edington: Exegetics, 1993. 574p.

GIUSTI, P. et al. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. **Scientia Horticulturae**, v.95, p.319-332, 2002.

GRATTAPAGLIA, Dario; MACHADO, Marcos A., Micropropagação. In: TORRES, Antônio Carlos, CALDAS, Linda Styer, BUSO, José Amauri. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de plantas**. vol.1. Brasília: Embrapa-SPI, 1998, cap.9, p.183-260.

HARTMANN, Hudson T. **Plant Propagation: principles and practices**. 8 ed. United States: Pearson, 2011. 915p.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v.108, p.105–120, 2006.

HUBSTENBERGER, J. F.; CLAYTON, P. W.; PHILLIPS, G. C. Micropropagation of Cacti. In: BAYAY, Y. P. S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v. 20. Berlin: Springer, 1992. Cap. 4, p.49- 68.

JUÁREZ, M. C.; PASSERA, C. B. *In vitro* propagation of *Opuntia ellisiana* Griff. and acclimatization to field conditions. **Biocell**, v.26, n.3, p.319-324, 2002.

JUDD, Walter S. et al. **Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 612p.

KHALAFALLA, M. M. et al. Micropropagation of cactus (*Opuntia ficus-indica*) as strategic tool to combat desertification in arid and semi arid regions. **International Journal of Sustainable Crop Production**, v.2, n.4, p.1-8, 2007.

LEMOS, E. E. P. et al. Micropropagation of two fodder cactus (*Opuntia ficus-indica*) varieties influenced by position of the explants in the culture medium. **Magistra**, v.22, n.2, p.133-136, 2010.

MALDA, G.; SUZÁN, H.; BACKHAUS, R. *In vitro* cultura as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. **Scientia Horticulturae**, v.81, p.71-87, 1999.

MEDEIROS, L. A. et al. *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.84, p.165-169, 2006.

MOEBIUS-GOLDAMMER, K. G. et al. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (lem.) k. schum. (Cactaceae), an endemic and endangered mexican species. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v.39, p.388–393, 2003.

MOHAMED-YASSEEN, Y. Micropropagation of pitaya (*Hylocereus undatus* Britton et Rose). **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v.38, p.427–429, 2002.

MURASHIGUE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, v.25, p.135-66, 1974.

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

PAN, M. J.; STADEN, J. The use of charcoal in *in vitro* culture – A review. **Plant Growth Regulation**, v. 26, p.155–163, 1998.

PAPAFOTIOU, M. et al. *In vitro* plant regeneration of *Mammillaria elongata* normal and cristate forms. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.65, p.163–167, 2001.

PELAH, D. et al. Organogenesis in the vine cactus *Selenicereus megalanthus* using thidiazuron. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.71, p.81–84, 2002.

PERES, L. E. P. Bases Fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biociências e Desenvolvimento**, v.25, p.44-48, 2002.

PÉREZ-MOLPHE-BALCH E. et al. *In vitro* propagation of three species of columnar cacti from the Sonoran Desert. **Hortscience**, v.37, n.4, p.693–696, 2002.

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**, v.38, p.73–78, 2002.

PHILLIPS, G. C. Invited review: *In vitro* morphogenesis in plants – recent advances. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v.40, p. 342-345, 2004.

QUIALA, E. et al. *In vitro* propagation of *Pilosocereus robinii* (Lemaire) Byles et Rowley, endemic and endangered cactus. **Journal of the Professional Association for Cactus Development**, v.11, p.18-25, 2009.

RAMIREZ-MALAGON, R. et al. *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v.43, p. 660–665, 2007.

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

RETES-PRUNEDA, J. et al. Propagación *in vitro* de especies de *Echinocereus*, *Escontria*, *Mammillaria*, *Melocactus* y *Polaskia* (Cactaceae). **Boletín de la Sociedad Botánica de México**, v.81, p.9-16, 2007.

ROJAS-ARÉCHIGA, M.; VÁZQUEZ-YANES, C. Cactus seed germination: a review. **Journal of Arid Environments**, v.44, p.85–104, 2000.

ROSAS, M. M. et al. Micropropagation of *Turbiniacarpus laui* glass et foster, an endemic and endangered species. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v.37, p.400-404, 2001.

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**, v.24, p.531–560, 2006.

RUBIO, O. R. G.; BARRERA, G. X. M. Conservation *in situ* and *ex situ* of *Mammillaria mathildae*, endemic, endangered cacti of Querétaro City. **Ciencia@uaq**, v.2, n.1, p.3-16, 2009.

RUBLO, A. et al. Auxin induced morphogenetic responses in long-term *in vitro* subcultured *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada (Cactaceae). **Scientia Horticulturae**, v.95, p.341-349, 2002.

RUVALCABA-RUIZ, D.; ROJAS-BRAVO, D.; VALENCIA-BOTÍN, A. J. Propagación *in vitro* de *Coryphantha retusa* (Britton & Rose) un cactus endémico y amenazado. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v.12, p.139-143, 2010.

SANTOS-DÍAZ, M. S. et al. *In vitro* organogenesis of *Pelecypora aselliformis* erhenberg (Cactaceae). **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v.39, p. 480–484, 2003.

SCHMILDT, E. R., AMARAL, J. A. T. Contaminação e reação morfogênica *in vitro* de explantes de mamoeiro. **Revista Ceres**, v.49, n.281, p. 63-70, 2002.

SHIN, D. et al. A shoot regeneration protocol effective on diverse genotypes of sunflower (*Helianthus annus* L.). **In vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, v.36, p.273-278, 2000.

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

TAYLOR, Nigel; ZAPPI, Daniela. **Cacti: of Eastern Brazil**. Richmond, Surrey: Royal Botanic Gardens, Kew, 2004. 499 p.

VALVERDE-CERDAS, L. et al. *In vitro* propagation of *Pithecellobium saman* (Raintree). **In vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, v.33, p.38-42, 1997.

VASCONCELOS, A. G. V. et al. Micropropagação de palma forrageira cv. Miúda (*Nopalea cochenillifera* - Salm Dyck). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.2, n.1, p.28-31, 2007.

WYKA, T. P.; HAMERSKA, M.; WRÓBLEWSKA, M. Organogenesis of vegetative shoots from *in vitro* cultured flower buds of *Mammillaria albicoma* (Cactaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 87, p. 27–32, 2006.

ZAPPI, Daniela. et al. **Plano de ação nacional para conservação das cactáceas**. Brasília : Instituto Chico Mendes de conservação da biodiversidade, ICMBio, 2011, 113p.

ZOGLAMI, G. et al. Genetic stability of long-term micropropagated *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. plantlets as assessed by molecular tools: perspectives for *in vitro* conservation. **Industrial Crops and Products**, v.36, p.59-64, 2012.

CAPÍTULO 3

Criopreservação de sementes de *Discocactus zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* e *Stephanocereus luetzelburgii*

RESUMO

Discocactus zehntneri, *Pilosocereus gounellei* e *Stephanocereus luetzelburgii* são espécies de cactáceas nativas da Bahia que, como outros representantes da família Cactaceae, estão sendo drasticamente afetados tanto com a coleta ilegal quanto com a destruição e fragmentação de habitat. Por conta dos possíveis riscos de extinção das espécies ameaçadas e ainda do potencial de uso destas espécies, algumas ações de conservação *ex situ* são necessárias. O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade fisiológica de sementes de *D. zehntneri*, *P. gounellei* e *S. luetzelburgii* armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) por períodos de 0, 7 e 30 dias. Para tanto, sementes das três espécies previamente armazenadas em sacos de papel à temperatura ambiente, foram transferidas para criotubos e, em seguida, imersas diretamente em nitrogênio líquido por 7 ou 30 dias. Após o tempo de armazenamento, as sementes foram retiradas do tanque de nitrogênio, descongeladas por uma hora a temperatura ambiente e posteriormente desinfestadas quimicamente. As sementes foram inoculadas em placas de petri forradas com duas folhas de papel germitest e umedecidas com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa do papel. O aumento no tempo de exposição das sementes ao nitrogênio líquido não reduziu a germinabilidade de nenhuma das espécies estudadas e para *D. zehntneri* os melhores resultados para germinabilidade e índice de velocidade de germinação ocorreram nas sementes armazenadas por 30 dias. Considerando que os tratamentos criogênicos não reduziram a qualidade fisiológica das sementes em relação ao controle, pode-se indicar a utilização da criopreservação para a conservação *ex situ* de sementes de *D. zehntneri*, *P. gounellei* e *S. luetzelburgii*.

PALAVRAS-CHAVE: Cactos; conservação *ex situ*; crioconservação

ABSTRACT

Discocactus zehntneri, *Pilosocereus gounellei* and *Stephanocereus luetzelburgii* are cacti species native to Bahia and, as other representatives of family Cactaceae, have been dramatically affected by illegal collection as well as the destruction and fragmentation of habitats. Because of the possible risks of extinction of endangered species and potential use of these species, some actions of *ex situ* conservation of cacti are required. The objective of this study was to evaluate the physiological quality of seeds of *D. zehntneri*, *P. gounellei* and *S. luetzelburgii* stored in liquid nitrogen (-196 ° C) for 0, 7 and 30 days. For this purpose, seeds of the three species previously stored in paper sacks at room temperature, were transferred to cryovials and then immersed directly in liquid nitrogen for 7 or 30 days. After the storage period, the seeds were removed from the nitrogen tank, thawed for one hour at room temperature and subsequently chemically sterilized. The seeds were inoculated onto petri dishes lined with two layers of germitest paper wet with distilled water at a ratio of 2.5 times the paper mass. The increased time of exposure of seeds to liquid nitrogen did not reduce the germination rate of any of the species and for *D. zehntneri* the best results for germination rate and speed of germination occurred in seeds stored for 30 days. Considering that the cryogenic treatment did not reduce the physiological quality of seeds compared to control, the use of cryopreservation is suggested for *ex situ* conservation of seeds of *D. zehntneri*, *P. gounellei* and *S. luetzelburgii*.

KEYWORDS: Cacti; cryoconservation; *ex situ* conservation

INTRODUÇÃO

Discocactus zehntneri, *Pilosocereus gounellei* e *Stephanocereus luetzelburgii*, são espécies de cactáceas nativas da Bahia que, como outros representantes da família Cactaceae têm sido drasticamente afetados tanto com a coleta ilegal quanto com a destruição e fragmentação de habitat (HUBSTENBERGER et al. 1992; ROJAS-ARÉCHIGA & VÁZQUEZ-YANES, 2000; ROSAS et al. 2001; SANTOS-DÍAZ et al. 2003; DÁVILA-FIGUEROA et al. 2005; ZAPPI et al. 2011). Segundo ZAPPI et al. (2011) por conta dos possíveis riscos de extinção das espécies ameaçadas e ainda do potencial de uso destas espécies, algumas ações de conservação *ex situ* de cactáceas são necessárias.

A criopreservação é uma alternativa para a conservação dos recursos fitogenéticos a longo prazo que garante a integridade genética do material armazenado, requer um pequeno espaço para a instalação do banco de germoplasma e tem um baixo custo associado (SANTOS, 2001; ALMEIDA et al. 2002; CARVALHO & VIDAL, 2003; ENGELMANN, 2004; MOLINA et al. 2006; KAVIANI et al. 2009; ROCHA et al. 2009; ENGELMANN, 2011; ZAPPI et al. 2011).

Diversos tipos de explantes podem ser utilizados na criopreservação como suspensões celulares, embriões, protoplastos, gemas, calos e pólen (CARVALHO & VIDAL, 2003; SARASAN, 2006; SILVA et al. 2011; SRINIVASAN, 2012). No entanto, a conservação de sementes é a forma mais fácil, comum e eficiente (SANTOS, 2001; GOLDFARB et al. 2010; PENCE, 2010) de conservação *ex situ* pois, além das sementes serem a unidade de propagação natural para a maioria das espécies de plantas superiores (SANTOS, 2001), possuem variabilidade genética, são fáceis de coletar e ocupam um pequeno espaço (LI & PRITCHARD, 2009). Além disso, segundo SILVA et al. (2011) as sementes são as estruturas mais adequadas para fins de conservação por serem sistemas mais organizados.

A maioria das atividades de conservação *ex situ* da biodiversidade vegetal, como a criopreservação, tem como foco as espécies cultivadas (ENGELMANN, 2011; PILATTI et al. 2011). Espécies nativas, raras e ameaçadas, como muitos membros da família Cactaceae, ainda carecem de estudos específicos. Apenas um único estudo referente à criopreservação de cactos, até o momento, está disponível na literatura (VEIGA-BARBOSA et al. 2010).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade fisiológica de sementes de *D. zehntneri*, *P. gounellei* e *S. luetzelburgii* armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) por períodos de 0, 7 e 30 dias.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Frutos maduros de *Discocactus zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* e *Stephanocereus luetzelburgii* foram coletados de diferentes populações em maio e agosto de 2010 nos municípios de Morro do Chapéu e Mucugê, Chapada Diamantina - BA. Após serem retiradas dos frutos, as sementes foram secas em papel de filtro, beneficiadas e, posteriormente, armazenadas em sacos de papel craft à temperatura ambiente até a montagem do experimento (outubro 2011).

Criopreservação

Sementes das três espécies foram transferidas para criotubos (110 sementes por tubo) e, em seguida, imersas diretamente em nitrogênio líquido (-196°C) por 7 ou 30 dias, exceto as sementes do grupo controle que foram imediatamente inoculadas. Após o tempo de armazenamento propriamente dito, as sementes foram retiradas do tanque de nitrogênio, descongeladas por uma hora a temperatura ambiente e posteriormente desinfestadas quimicamente, por um minuto em álcool absoluto e 15 minutos em hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo), e, em seguida, lavadas três vezes em água estéril. As sementes foram inoculadas em placas de petri forradas com duas folhas de papel germitest e umedecidas com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa do papel.

Condições de cultivo

Após a inoculação as unidades experimentais foram mantidas em germinador com $25 \pm 3^\circ \text{C}$ sob luz fluorescente ($60 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$) e fotoperíodo de 12 horas.

Variáveis analisadas, delineamento experimental e análise estatística

As avaliações foram diárias durante 26 dias e foi considerada germinada a semente cuja radícula media mais que dois milímetros. As variáveis analisadas foram baseadas em SANTANA & RANAL (2000) e consistiram de: germinabilidade (%G), tempo médio de germinação (TMG), índice de velocidade de germinação (IVG) e coeficiente de uniformidade de germinação (CUG). Com o objetivo de quebrar a dependência entre a média e a variância os dados de germinabilidade, expressos em porcentagem, foram transformados em arco-seno.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições de 25 sementes cada. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade através do programa estatístico Sisvar 5.1 (FERREIRA, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O aumento no tempo de exposição das sementes ao nitrogênio líquido não reduziu a germinabilidade de nenhuma das espécies estudadas (Tabela 1). Similarmente, não houve diferenças significativas para germinação de sementes de *Discocactus zehntneri* e *Pilosocereus gounellei* submetidas à criopreservação por diferentes períodos, assim também como para outras espécies de cactáceas como *Cereus jamacaru*, *Melocactus concinnus*, *M. paucispinus* e *Micranthocereus flaviflorus* (VEIGA-BARBOSA et al. 2010). Estes resultados também corroboram os obtidos para espécies de outras famílias como *Jatropha curcas* (GOLDFARB et al. 2010; SILVA et al. 2011) e *Prunus avium* (CHMIELARZ, 2009). Entretanto, para *Ricinus communis* (ALMEIDA et al. 2002) e *Melocactus albicephalus* (VEIGA-BARBOSA et al. 2010) o período de armazenamento foi inversamente proporcional ao percentual de germinação das sementes congeladas.

A redução na germinabilidade após a criopreservação pode ser atribuída a contaminação por fungos (SALOMÃO, 2002) e/ou ao elevado teor de umidade inicial das sementes (GONZÁLEZ-BENITO et al. 1998; SALOMÃO, 2002; MOLINA et al. 2006; ROCHA et al. 2009; SILVA et al. 2011). Elevados teores de umidade facilitam a formação de cristais de gelo intracelular que causam ruptura do sistema de

endomembranas e resultam na perda da semi-permeabilidade e da compartimentalização celular (SANTOS, 2001; KAVIANI et al. 2009; GOLDFARB et al. 2010).

Tabela 1: Efeito do período do armazenamento em nitrogênio líquido na germinabilidade (%G), tempo médio de germinação (TMG), índice de velocidade de germinação (IVG) e coeficiente de uniformidade de germinação (CUG) em sementes de *Discocactus zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* e *Stephanocereus luetzelburgii*.

Espécies	Período de armazenamento (dias)		
	0	7	30
	G (%)		
<i>D. zehntneri</i>	0b	3ab	20a
<i>P. gounellei</i>	61a	51a	63a
<i>S. luetzelburgii</i>	0a	3a	6a
	TMG (dias)		
<i>D. zehntneri</i>	0,00a	5,75a	14,16a
<i>P. gounellei</i>	15,55a	16,24a	15,18a
<i>S. luetzelburgii</i>	0,00a	3,25a	13,00a
	IVG		
<i>D. zehntneri</i>	0,000b	0,010b	0,205a
<i>P. gounellei</i>	1,182a	1,137a	1,467a
<i>S. luetzelburgii</i>	0,000a	0,020a	0,020a
	CUG		
<i>D. zehntneri</i>	0,000a	0,000a	0,065a
<i>P. gounellei</i>	0,382a	0,115a	0,087a
<i>S. luetzelburgii</i>	0,000a	0,000a	0,000a

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os resultados demonstram ainda que para *D. zehntneri* a melhor germinabilidade (20%) e índice de velocidade de germinação (0,205) ocorreram nas sementes armazenadas por 30 dias (Tabela 1). Resultados similares foram obtidos para *Astragalus membranaceus*, *Hedysarum austro-kurilense*, *Oxytropis chankaensis*, *O. kamtschatica*, *O. ochotensis*, *O. revoluta*, *O. retusa*, *Sophora flavescens*, *Trifolium lupinaster* (KHOLINA & VORONKOVA, 2012), *Xyris tennesseensis* (JOHNSON et al. 2012), *Melocactus albicephalus*, *M. concinnus*, *M. paucispinus* (VEIGA-BARBOSA et al. 2010), *Ricinus communis* (ALMEIDA, 2002) e *Gossypium hirsutum* (GONZÁLEZ-BENITO et al. 1998; ROCHA et al. 2009). Este aumento na germinabilidade pode ser atribuído as mudanças de temperatura (ALMEIDA et al. 2002; ROCHA et al. 2009) bem como ao rompimento ou a formação de uma rede de fissuras nas estruturas que rodeiam o embrião (SALOMÃO, 2002), que podem ter causado a quebra da dormência física das sementes submetidas a temperaturas ultra baixas. Entretanto, para *Rubus* spp. tratamentos com nitrogênio líquido não superaram a eficiência da escarificação com ácido sulfúrico na quebra da dormência física das sementes (PEACOCK & HUMMER, 1996).

Os baixos percentuais de germinabilidade de *D. zehntneri* obtidos neste trabalho (Tabela 1) corroboram os reportados por VEIGA-BARBOSA et al. (2010). Segundo estes autores e alguns estudos anteriores (CAPÍTULO 1) esta espécie deve apresentar algum tipo de dormência. No entanto, a causa de baixa germinabilidade obtida para *S. luetzelburgii* (Tabela 1) ainda necessita de investigações dado que os tratamentos aplicados para a quebra de dormência não tiveram resultados satisfatórios (CAPÍTULO 1).

Apesar dos protocolos para criopreservação de sementes de algumas espécies ressaltarem a necessidade de uma etapa de dessecação do material vegetal (KAVIANI et al. 2009; GRAIVER et al. 2011), para *D. zehntneri*, *P. gounellei* e *S. luetzelburgii*, a ausência da etapa de crioproteção não resultou na perda da viabilidade das sementes (Tabela 1). Estes resultados que corroboram os obtidos por outros autores (SALOMÃO, 2002; VEIGA-BARBOSA et al. 2010; JOHNSON et al. 2012; KHOLINA & VORONKOVA, 2012) além de simplificar os protocolos para criopreservação reduz significativamente os custos. Segundo ENGELMANN (2004; 2011) alguns materiais tais como sementes ortodoxas e gemas dormentes exibem um processo de desidratação natural e podem ser criopreservados sem nenhum pré-

tratamento. A manutenção da qualidade física e fisiológica de sementes tolerantes a dessecação está relacionada a características físicas intracelulares, como minimização de vacuolação, proteção da integridade do DNA e ordenado dismantelamento de elementos do citoesqueleto, balanço entre espécies reativas de oxigênio e antioxidantes, proteínas LEA abundantes, acúmulo de carboidratos, composição de lipídeos, substâncias endógenas anfífilas, oleosinas, dentre outras (BERJAK & PAMMENTER, 2008).

Após o congelamento não foi observado nenhum dano físico, tais como rachaduras ou quebra de estruturas da semente, nem o desenvolvimento anormal das plantas. Resultados similares foram obtidos para *Astragalus membranaceus*, *Hedysarum austro-kurilense*, *H. sachalinense*, *Oxytropis chankaensis*, *O. kamtschatica*, *O. ochotensis*, *O. revoluta*, *O. retusa*, *Sophora flavescens*, *Trifolium lupinaster*, *Vicia amurensis* (KHOLINA & VORONKOVA, 2012), *D. zehntneri*, *P. gounellei*, *Melocactus concinnus*, *M. paucispinus*, *M. albicephalus*, *Micranthocereus flaviflorus* (VEIGA-BARBOSA et al. 2010), *Rubus ursinus*, *R. leucodermis*, *R. eustephanos*, *R. multibracteatus*, *R. chamaemorus*, *R. parviflorus* (PEACOCK & HUMMER, 1996) e outras 66 espécies tropicais de sementes ortodoxas (SALOMÃO, 2002). Entretanto, estes resultados discordam dos encontrados por SILVA et al. (2011) em que períodos prolongados de exposição ao nitrogênio líquido resultaram no desenvolvimento de cotilédones aderidos, atrofiados e aclorofilados, na formação de calos na face adaxial dos cotilédones e na base do hipocótilo e em plantas constituídas apenas de hipocótilo.

CONCLUSÃO

A criopreservação não alterou a qualidade fisiológica das sementes e por isso pode ser um método indicado para a conservação *ex situ* de sementes de *D. zehntneri*, *P. gounellei* e *S. luetzelburgii*. No entanto, sugere-se a avaliação por um maior tempo de armazenamento.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F. A. C. Crioconservação das sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.6, n.2, p.295-302, 2002.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. From Avicennia to Zizania: Seed Recalcitrance in Perspective. **Annals of Botany**, v.101, p.213–228, 2008.
- CARVALHO, Julita Maria Frota Chagas; VIDAL, Márcia Soares. **Crioconservação no Melhoramento Vegetal**. Campina Grande: Embrapa, 2003, 22p.
- CHMIELARZ, P. Cryopreservation of dormant *orthodox* seeds of forest trees: mazzard cherry (*Prunus avium* L.). **Annals Forest Science**, v. 66, p.405, 2009.
- DÁVILA-FIGUEROA, C. A. et al. *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v. 41, p.540–545, 2005.
- ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v.40, p.427–433, 2004.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v.47, p.5-16, 2011.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Científica Symposium**, v.6, n.2, p.36-41, 2008.
- GOLDFARB, M.; DUARTE, M. E. M.; MATA, M. E. R. M. Armazenamento criogênico de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) Euphorbiaceae. **Biotemas**, v.23, n.1, p.27-33, 2010.
- GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; CARVALHO, J. M. F.; PÉREZ, C. Effect of desiccation and cryopreservation on the germination of embryonic axes and seeds of cotton. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, n.1, p.17-20, 1998.
- GRAIVER, N.; CALIFANOVA, A.; ZARITZKY, N. Partial dehydration and cryopreservation of *Citrus* seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p.2544–2550, 2011.

HUBSTENBERGER, J. F.; CLAYTON, P. W.; PHILLIPS, G. C. Micropropagation of Cacti. In: BAYAY, Y. P. S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. v. 20. Berlin: Springer, 1992. cap. 4, p.49- 68.

JOHNSON, T.; CRUSE-SANDERS, J. M.; PULLMAN G. S. Micropropagation and seed cryopreservation of the critically endangered species Tennessee yellow-eye grass, *Xyris tennesseensis* Kral. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v.1, p.1-8, 2012.

KAVIANI, B. et al. Cryopreservation of seeds of lily [*Lilium Iedebourii* (Baker) Bioss]: Use of sucrose and dehydration. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.16, p.3809-3810, 2009.

KHOLINA, A. B.; VORONKOVA, N. M. Seed cryopreservation of some medicinal legumes. **Journal of Botany**, v.2012, p.1-7, 2012.

LI, D.; PRITCHARD, H. W. The science and economics of *ex situ* plant conservation. **Trends in Plant Science**, v.14, n.11, p.614-621, 2009.

MOLINA, T. F. et al. Crioconservação em sementes de cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.3, p.72-81, 2006.

PEACOCK, D. N.; HUMMER, K. E. Pregermination studies with liquid nitrogen and sulfuric acid on several *Rubus* species. **Hortscience**, v.31, n.2, p.238–239, 1996.

PENCE, V. C. The possibilities and challenges of *in vitro* methods for plant conservation. **Kew Bulletin**, v.65, p.539–547, 2010.

PILATTI, F. K. et al. *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v.47, p.82-98, 2011.

ROCHA, M. S. et al. Crioconservação de sementes de algodão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.13, n.3, p.312–318, 2009.

ROJAS-ARÉCHIGA, M.; VÁZQUEZ-YANES, C. Cactus seed germination: a review. **Journal of Arid Environments**, v.44, p.85–104, 2000.

ROSAS, M. M. et al. Micropropagation of *Turbinicarpus laui* glass et foster, an endemic and endangered species. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v.37, p.400-404, 2001.

SALOMÃO, A. N. Tropical seed species' responses to liquid nitrogen exposure. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.14, n.2, p.133-138, 2002.

SANTANA, D. G.; RANAL, M. A. Análise Estatística na Germinação. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p.205-237, 2000.

SANTOS-DÍAZ, M. S. et al. *In vitro* organogenesis of *Pelecyphora aselliformis* erhenberg (Cactaceae). **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v.39, p. 480–484, 2003.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação do germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.20, p.60-65, 2001.

SARASAN, V. Conservation *in vitro* of threatened plants – progress in the past decade. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v.42, p.206–214, 2006.

SILVA, R. C. et al. Potencial germinativo e morfoanatomia foliar de plântulas de pinhão-mansão originadas de germoplasma criopreservado. **Pesquisa Agropecuária de Brasileira**, v.46, n.8, p.836-844, 2011.

SRINIVASAN, S. Techniques to prevent cryopreservation damage in agriculture-a review. **International Journal of Universal Pharmacy and Life Sciences**, v.2, n.1, p. 41-47, 2012.

VEIGA-BARBOSA, L. et al. Germination and cryopreservation of several cactus species from NE Brazil. **Seed Science and Technology**, v.38, p.218-224, 2010.

ZAPPI, Daniela et al. **Plano de ação nacional para conservação das cactáceas**. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBio, 2011, 113p.

CONCLUSÕES GERAIS

1. Meios de cultura com potencial hídrico reduzido não inviabilizam a germinação de *Pilosocereus gounellei* e *Stephanocereus luetzelburgii*;
2. A baixa germinabilidade *in vitro* de *Discocactus zehntneri* pode estar associada a uma dormência fisiológica;
3. Novos estudos deverão ser conduzidos a fim de esclarecer os mecanismos que promovem a germinação de *S. luetzelburgii*;
4. Os meios MS/2 e MS, respectivamente, devem ser utilizados para o crescimento *in vitro* de *P. gounellei* e *S. luetzelburgii*;
5. As repicagens favorecem o crescimento das para as três espécies estudadas;
6. O potencial organogênico das três espécies estudadas foi potencializado pela adição de auxina ao meio básico;
7. O tipo de explante em *D. zehntneri* e *S. luetzelburgii* interferiu significativamente nas variáveis analisadas;
8. Plantas com a idade fisiológica mais elevada são mais apropriadas para a multiplicação de *P. gounellei*;
9. As injúrias mecânicas desfavoreceram a multiplicação das três espécies estudadas;
10. Devido à baixa taxa de multiplicação das espécies estudadas sugere-se a utilização de outros tipos citocininas e concentrações mais elevadas de ANA;
11. Brotos de *P. gounellei* enraízam espontaneamente;
12. A etapa de enraizamento *in vitro* é desnecessária para *S. luetzelburgii*;
13. A sobrevivência de *P. gounellei* não foi comprometida pelos substrados testados;

14. A aclimatização de *S. luetzelburgii* deve ocorrer em brotos maiores que 2 mm.

15. A criopreservação não alterou a qualidade fisiológica das sementes e por isso pode ser um método indicado para a conservação *ex situ* de sementes das três espécies estudadas. No entanto, sugere-se a avaliação por um maior tempo de armazenamento.

RESUMO

A família Cactaceae apresenta cerca de 100 gêneros e 1500 espécies distribuídas em uma ampla diversidade de climas e ecossistemas, do norte do Canadá à Patagônia, sendo mais abundantes em regiões áridas e semiáridas. Devido à elevada diversidade e valor, principalmente ornamental, as cactáceas vêm sendo severamente impactadas tanto com a coleta predatória quanto com a destruição e fragmentação de habitat que, conseqüentemente, tem ameaçado de extinção muitos dos seus representantes. Nesse contexto, a micropropagação bem como a criopreservação de sementes podem ser alternativas para a conservação desta família. O objetivo deste trabalho foi estabelecer protocolos para a germinação, estabelecimento e propagação *in vitro* além de avaliar a qualidade fisiológica de sementes criopreservadas de *Discocactus zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* e *Stephanocereus luetzelburgii*. Durante o estabelecimento *in vitro*, a redução do potencial hídrico do meio de cultura não reduziu a germinabilidade de *P. gounellei* e *S. luetzelburgii* e o carvão ativado acelerou a germinação de *D. zehntneri* além de aumentar a germinabilidade de *S. luetzelburgii*. Sementes de *D. zehntneri* apresentaram fotoblastismo neutro e temperaturas constantes e alternadas não interferiram na germinação, contudo a pré-embebição em ácido giberélico (GA₃) aumentou a sua germinabilidade. Os meios MS/2 e MS favoreceram o crescimento de *P. gounellei* e *S. luetzelburgii* respectivamente, enquanto as repicagens potencializaram o crescimento das três espécies em estudo. As injúrias mecânicas não favoreceram a morfogênese *in vitro* das espécies analisadas, entretanto, 1,34 µM de ácido naftalenoacético (ANA), em média, aumentou a taxa de multiplicação de *P. gounellei* e *S. luetzelburgii* e o explante longitudinal apresentou os melhores resultados para a brotação desta última espécie. Os melhores resultados para a multiplicação de *P. gounellei* ocorreram nos explantes derivados de plantas mais velhas (106 semanas). O carvão ativado e o ácido indolbutírico (AIB) não potencializaram o enraizamento *in vitro* de brotos *P. gounellei* e os brotos desta espécie bem como de *S. luetzelburgii* foram aclimatizados com mais de 85% de sobrevivência. Visto que os tratamentos criogênicos não reduziram a qualidade fisiológica das sementes em relação ao controle, pode-se indicar a utilização da criopreservação para a conservação *ex situ* de sementes de *D. zehntneri*, *P. gounellei* e *S. luetzelburgii*.

PALAVRAS-CHAVE: Cactaceae. Criopreservação. Cultura de Tecidos. Germinação.

ABSTRACT

(Micropropagation and conservation of *Discocactus zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* and *Stephanocereus luetzelburgii* native cacti Chapada Diamantina, Bahia.) The family Cactaceae has about 100 genera and 1500 species distributed in a wide variety of climates and ecosystems from northern Canada to Patagonia, being more abundant in arid and semiarid regions. Due to high diversity and value, especially ornamental, the Cactaceae have been severely impacted by predation as well as the destruction and fragmentation of habitats. This, consequently, has endangered many of its representatives. In this context, micropropagation and cryopreservation of seeds can be alternatives for the conservation of this family. The objective of this study was to establish protocols for *in vitro* germination, establishment and propagation and to evaluate the physiological quality of cryopreserved seeds from *Discocactus zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* and *Stephanocereus luetzelburgii*. For *in vitro* establishment reducing the water potential of the culture medium did not reduce the germinability of *P. gounellei* and *S. luetzelburgii* and the activated charcoal accelerated the germination of *D. zehntneri* besides increasing the germination of *S. luetzelburgii*. Seeds of *D. zehntneri* are neutral photoblastic and constant and alternating temperatures did not affect germination, but the pre-soaking in gibberellic acid (GA₃) increased their germination. MS/2 and MS media promoted the growth of *P. gounellei* and *S. luetzelburgii*, respectively, while subcultures potentiated the growth of the three species under study. Mechanical injuries did not favor *in vitro* morphogenesis of the species studied. However, 1.34 μ M naphthaleneacetic acid (NAA), on average, increased the multiplication rate of *P. gounellei* and *S. luetzelburgii* while the longitudinal explants stimulated multiplication of the latter species. The best results for the multiplication of *P. gounellei* occurred in explants derived from older plants (106 weeks). The charcoal and butyric acid (IBA) did not potentiate the *in vitro* rooting of shoots for *P. gounellei* and shoots of this species and of *S. luetzelburgii* were acclimatized with more than 85% survival. The cryogenic treatment did not reduce the physiological quality of seeds compared to control. Thus, the use of cryopreservation is suggested for *ex situ* conservation of seeds of *D. zehntneri*, *P. gounellei* and *S. luetzelburgii*.

KEYWORDS: Cactaceae. Cryopreservation. Tissue Culture. Germination.

ANEXO

Cálculo das variáveis de germinação

CÁLCULO DAS VARIÁVEIS DE GERMINAÇÃO

As variáveis analisadas foram baseadas calculadas segundo SANTANA & RANAL (2000) e consistiram de:

GERMINABILIDADE (%G) – porcentagem do número total de sementes germinadas ao final da avaliação.

TEMPO MÉDIO DE GERMINAÇÃO (TMG)

$$\bar{t} = \frac{\sum_{i=1}^k n_i t_i}{\sum_{i=1}^k n_i}$$

onde:

t_i : tempo entre o início do experimento e a i -ésima observação (dia ou hora);

n_i : número de sementes que germinam no tempo t_i (não o número acumulado, mas o número referido para a i -ésima observação);

k : último dia da observação.

ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG)

$$C.V.G. = \frac{\sum_{i=1}^k f_i}{\sum_{i=1}^k f_i x_i} 100$$

onde:

f_i : número de sementes germinadas no i -ésimo dia;

x_i : número de dias contados da semeadura até o dia da leitura (i);

k : último dia da observação.

COEFICIENTE DE UNIFORMIDADE DE GERMINAÇÃO (CUG)

$$CUG = \frac{\sum_{i=1}^k n_i}{k \sum_{i=1}^k (\bar{D} - D_i)^2 n_i}$$

onde:

n_i : número de sementes germinadas no i -ésimo dia;

D_i : número de dias contados da instalação do experimento até o dia da leitura (i);

k : último dia da observação.

REFERÊNCIA

SANTANA, D. G.; RANAL, M. A. Análise Estatística na Germinação. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p.205-237, 2000.