



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

HUGO DE BRITO LEITE

FORMAÇÃO DE BROTAÇÕES E DE RAÍZES EM SEGMENTOS CAULINARES DE
***Pilosocereus chrysostele* JUVENIS *IN VITRO* EM FUNÇÃO DE CITOCININA**

FORTALEZA - CE

2013

HUGO DE BRITO LEITE

**FORMAÇÃO DE BROTAÇÕES E DE RAÍZES EM SEGMENTOS CAULINARES DE
Pilosocereus chrysostele JUVENIS IN VITRO EM FUNÇÃO DE CITOCININA**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: 20 / 12 / 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Diva Correia (Orientadora)
Pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical

Prof. Dr. Enéas Gomes Filho (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (CC-UFC)

Prof. Dra. Cristina Paiva da S. Carvalho
Universidade Federal do Ceará (CC-UFC)

Prof. Dr. Emmanuel de Sousa Jereissati
Universidade Federal do Ceará (CC-UFC)

Aos meus pais, família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Maria do Carmo Ferreira de Brito Leite e Wilson da Silva Leite, por acreditarem no projeto e terem investido na educação através do ensinamento de seus valores;

À Dra. Diva Correia por ter acreditado no meu potencial. Agradeço pela disponibilidade de tempo e paciência ao longo dessa jornada e pelas críticas e sugestões relevantes feitas durante a sua orientação. Em especial, pelo carinho e preocupação demonstrados;

Ao prof. Dr. Enéas Gomes Filho, coorientador, pelo exemplo de honestidade, ética, profissionalismo e por todo apoio e confiança depositados em mim e por todo apoio;

Ao prof. Dr. Joaquim Enéas Filho, por sua contribuição para o desenvolvimento desse trabalho e pela disponibilização do Laboratório de Fisiologia Vegetal;

Aos integrantes do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Agroindústria Tropical, Myllon Nobre, Vanessa Pereira e Mirela;

Aos colegas de LabFive, Rafael Miranda, Carlos Eduardo, Lineker Lopes, Gyedre Araújo, Alexcyane, Elton Marques, Elaine, Jones, Evaldo, Daniel, Thiago Augusto e Luckas Huriel, vulgo lukita;

Aos amigos de graduação, Celso Marinones, Ítalo Gabriel, Victor ‘Segundo’ Teixeira, Roberta Laiz, Cláudia, Stefanie Ferreira, Vanessa, Emanuel Francelino, ao finado ‘Padim’, Roberta Cristiane, Talita, Andréa Costa, Dalton, por tantos momentos ao longo desses quatro anos;

E, em especial, a Karine Thiers, pela companhia, apoio ao longo da caminhada e dedicação em me ajudar a chegar cada vez mais longe sem medir esforços;

Aos primos Markus Vinicius, Diego Leite e Dieyson Fernandes pela amizade incondicional;

Ao amigo de infância e para toda a vida, Thiago Fonteles;

À Maria Gildemar de Oliveira e Gilmar Ferreira da Costa pela contribuição direta na realização dessa conquista;

À toda minha família, pelo apoio, compreensão e afeto. Em especial, à tia Lúcia de Fátima, maninha, por ter sempre incentivado a buscar conhecimento;

Em memória de Alcides Santos e Jackson de Carvalho por sua inestimável contribuição;

A todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho e minha formação.

"A suprema arte da guerra é derrotar o inimigo sem lutar." (Sun Tzu)

RESUMO

Na região semiárida do Nordeste brasileiro, encontram-se várias cactáceas de importância para o ecossistema regional. Algumas apresentam potencial para uso como planta ornamental e como forrageira para a alimentação do gado no período das secas. *Pilosocereus chrysostele* é uma cactácea colunar que possui poucas informações disponíveis na literatura científica. Adicionalmente, sofre constante ação antrópica. Avanços do conhecimento sobre métodos de propagação são importantes para a multiplicação dessa espécie. Assim, a micropropagação torna-se relevante para a disponibilidade de mudas. O estudo teve como objetivo avaliar o efeito da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) na morfogênese em *P. chrysostele*. O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, CE. Foram utilizadas plantas de *P. chrysostele* obtidas a partir da sementeira *in vitro* com altura entre 4,0 cm e 4,5 cm. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 6, sendo o fator A, tipos de explante (apical e basal) e o fator B, concentrações de citocinina (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg L⁻¹ de BAP), totalizando doze tratamentos, cinco repetições com um explante por frasco. Foi utilizado meio de cultura JADS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 1,8 g L⁻¹ de agente solidificante. O experimento foi mantido em sala de crescimento em temperatura de 27 ± 2° C, fotoperíodo de 12 horas e radiação fotossintética de 30 μmol m⁻² s⁻¹. Aos 90 dias de cultivo, foram avaliados o número de brotações, além da caracterização do vigor das brotações, a presença de raízes e a altura do explante. Cortes caulinares apical e basal de *P. chrysostele* podem ser utilizados como fonte de explante cultivados em meio de cultura suplementado com até 1 mg L⁻¹ da citocinina BAP. Concentrações acima de 1 mg L⁻¹ de BAP apresentam hiperhidria nas brotações.

Palavras-Chave: cactácea, citocinina, hiperhidria, micropropagação.

ABSTRACT

In the Brazilian semiarid northeast region, several cacti species are of great importance to the regional ecosystem. Some have potential to be used as ornamental plants and as livestock forage during the dry season. *Pilosocereus chrysostele* is a columnar cacti which has little scientific literature information available. It also suffers frequent human action. Advances in the knowledge of this species propagation methods are important for its proliferation. Therefore, micropropagation is relevant to the seedling availability. The study aimed to evaluate the effect of cytokinin in *P. chrysostele* morphogenesis. The experiment was conducted at Embrapa Tropical Agroindustry, in Fortaleza, Brazil. *P. chrysostele* plants with heights between 4.0 cm and 4.5 cm obtained from *in vitro* seeding were used. The experimental design was completely randomized in 2 x 6 factorial, being A factor explant types (apical and basal) and B factor concentrations of cytokinin (0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 and 8.0 mg L⁻¹ of BAP) in a total of twelve treatments, having five replicates per explant in a bottle. JADS culture medium supplemented with 30 g L⁻¹ sucrose and 1.8 g L⁻¹ of solidifying agent were used. The experiment was conducted in a growth chamber at temperature of 27 ± 2 ° C, in a 12 hour photoperiod and a photosynthetic irradiance of 30 μmol m⁻² s⁻¹. At the 90th culture day, the shoots number was evaluated, besides the characterization of the shoots vigor, the presence of roots and the explant height. Apical and basal *P. chrysostele* stalk cuttings can be used as a source of explants when cultured in up to 1 mg L⁻¹ BAP supplemented medium. Concentrations above 1 mg L⁻¹ BAP can result in hyperhydric of the shoots.

Keywords: cacti, cytokinin, hyperhydric, micropropagation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – *Pilosocereus chrysostele* em desenvolvimento no município de Monsenhor Tabosa, CE. 15
- Figura 2** – Distribuição de *Pilosocereus chrysostele* (em destaque) e outras cactáceas de ocorrência no Estado do Ceará. 16
- Figura 3** – Planta de *Pilosocereus chrysostele* aos 90 dias de cultivo *in vitro*; Acessos de *Pilosocereus chrysostele* mantidos na coleção de cactáceas da Embrapa Agroindústria Tropical em Fortaleza, CE. 17
- Figura 4** – *Pilosocereus chrysostele*, cultivado *in vitro* durante 8 meses. 22
- Figura 5** – Planta de *Pilosocereus chrysostele* cultivada *in vitro* com o segmento caulinar apical e o basal evidenciado. 24
- Figura 6** – Número médio de brotações obtidos em segmentos caulinares, apical e basal, de *Pilosocereus chrysostele* juvenis, em função da concentração de citocinina BAP (6-benzilaminopurina), em mg L⁻¹ aos 90 dias de cultivo *in vitro*. 27
- Figura 7** - Crescimento de brotações em segmentos caulinares, apical e basal, de *Pilosocereus chrysostele* juvenis aos 90 dias de cultivo. 29
- Figura 8** - Crescimento de raízes em segmentos caulinares, apical e basal, de *Pilosocereus chrysostele* juvenis aos 90 dias de cultivo. 32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Definição dos tratamentos utilizados no Experimento.	24
Tabela 2 – Resumo da análise de variância para número de brotações e número de explantes com raízes em segmentos caulinares em função de concentrações de citocinina.	26
Tabela 3 – Localização da formação de brotações no explante, tamanho, coloração e crescimento das brotações em segmentos caulinares, apical e basal, de <i>Pilosocereus chrysostele</i> juvenis, em função da concentração de citocinina BAP aos 90 dias de cultivo <i>in vitro</i>	30
Tabela 4 - Porcentagem de enraizamento em segmentos caulinares, apical e basal, de <i>Pilosocereus chrysostele</i> juvenis em função de concentrações de citocinina aos 90 dias de cultivo <i>in vitro</i>	31

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AIB – Ácido indolbutírico

AIA – Ácido indolilacético

ANA – Ácido naftalenoacético

BAP – 6-Benzilaminopurina

CAM – Metabolismo ácido das crassuláceas

JADS – **J**uan Alfonso Rodrigues Ataíde, **A**ntonio Natal Gonçalves, **D**iva Correia, **S**ilvia
Cristina Vettorazzo

MS – Murashige & Skoog

2-iP – N,6-isopenteniladenina

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
1.1.	Caatinga	12
1.2.	Família <i>Cactaceae</i>	13
1.3.	Gênero <i>Pilosocereus</i>	14
1.3.1	<i>Pilosocereus chrysostele</i>	15
1.4.	Métodos de propagação.....	17
1.4.1.	Propagação <i>in vitro</i>	18
1.5.	Reguladores de crescimento.....	19
2.	OBJETIVO.	21
3.	MATERIAL E MÉTODOS.	22
3.1.	Local	22
3.2.	Material genético	22
3.3.	Condução do experimento	23
3.4.	Análise Estatística	24
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1.	Número de brotações	26
4.2.	Observações visuais	27
4.2.1.	Formação de raízes	31
5.	CONCLUSÕES.....	33
	REFERÊNCIAS.....	34

1. INTRODUÇÃO

1.1 Caatinga

A Caatinga é o único bioma exclusivamente brasileiro compreendendo parte dos Estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Alagoas, Bahia e norte de Minas Gerais. Ocupa uma área estimada em 930.000 km², correspondendo à maior parte da região semiárida do Nordeste do Brasil (VALENTE JUNIOR, 2010). Esse bioma é constituído por florestas arbóreas ou arbustivas, onde algumas árvores e arbustos apresentam espinhos, microfilia e características xerofíticas (SERVIÇO GEOLÓGICO DO BRASIL, 2005). Essa vegetação é proporcionalmente a menos estudada entre as regiões naturais brasileiras, com grande parte do esforço científico estando concentrado em alguns poucos pontos em torno das principais cidades da região. É a região natural brasileira menos protegida, pois as unidades de conservação cobrem menos de 2% do seu território, além de continuar passando por um extenso processo de alteração e deterioração ambiental provocado pelo uso insustentável dos seus recursos naturais, o que está levando à rápida perda de espécies únicas, à eliminação de processos ecológicos e à formação de extensos núcleos de desertificação em vários setores da região (TABARELLI; SILVA, 2003).

No bioma Caatinga existe uma proporção expressiva de plantas endêmicas. Diversas dessas plantas são comumente utilizadas pela população por suas propriedades terapêuticas, como forragem para o gado ou para fins ornamentais (ANDRADE, 2008; ZAPPI et al., 2011). Contrastando com sua relevância biológica, esse bioma pode ser considerado um dos mais ameaçados do Brasil. Grande parte de sua superfície já foi bastante modificada pela utilização e ocupação humana. Além disso, muitos estados são carentes de medidas efetivas de conservação dessa biodiversidade (TABARELLI; SILVA, 2003).

Segundo Cândido et al. (2005), a pecuária na região semiárida, ao longo do tempo, tem constituído atividades básicas das populações rurais, onde culturas forrageiras são adotadas como alternativas estratégicas de alimentação adequada à época das secas. Essa área apresenta uma precipitação pluviométrica média anual inferior a 800 mm, um índice de aridez de até 0,5 com risco de seca acima de 60%. Os sistemas agrícolas das regiões semiáridas devem ser baseados em cultivos adequados, apropriados a suportarem condições de falta de água, temperaturas elevadas, solos pobres que exijam poucos insumos

energéticos, e que sejam de fácil manejo no plantio, para que proporcionem alimento e forragem para a agricultura de subsistência (QUEIROZ, 2009).

1.2 Família Cactaceae

Cactaceae é uma família neotropical com 124 gêneros e 1.438 espécies facilmente reconhecidas pelos seus caules espinhosos, com brotos diferenciados longos que produzem folhas fotossintetizantes e brotos curtos (aréolas) (LORENZI; SOUZA, 2012). 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). 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).

Os centros de diversidade da família Cactaceae são o México, o Brasil e a costa leste dos Andes (HUNT et al., 2006; ZAPPI et al., 2007; CALVENTE, 2011). De acordo com Zappi et al. (2010) existem 233 espécies de cactáceas no Brasil, distribuídas em 37 gêneros e estão subdivididas em três subfamílias Pereskioideae, Opuntioideae e Cactoideae. A região Nordeste do Brasil possui quase 30% das espécies de Cactáceas que ocorrem no Brasil, com 74% delas endêmicas da Caatinga, um dos biomas mais ameaçados do mundo (CALVENTE, 2011). O gênero *Opuntia* é representado no Brasil por mais de 150 espécies (TAYLOR; ZAPPI, 2004) e os indivíduos deste grupo são comumente conhecidos como "Opuntia" ou "Palmas-forrageiras".

As cactáceas apresentam grande importância regional, principalmente pelo fato das mesmas serem utilizadas na alimentação animal, sendo seu uso requisitado, principalmente, em épocas de seca, quando a carência de plantas alimentícias é maior. Além disso, há relatos da utilização de cactáceas para fins medicinais, paisagísticos, alimentação humana, para prevenir a erosão do solo, como cercas vivas, em construções rurais e domésticas, algumas sendo comercializadas em lojas, supermercados e viveiros (SHEDBALKAR et al., 2010; LUCENA, 2012; ZOGHLAMI et al., 2012). As principais cactáceas nativas usadas para diferentes fins pertencem aos gêneros *Cereus*, *Melocactus* e *Pilosocereus*, representados principalmente por *Cereus jamacaru* (mandacaru), *Pilosocereus gounellei* (xiquexique) e

Melocactus zehntneri e *Melocactus bahiensis* (coroa-de-frade) (CORREIA et al., 2012a). Apesar do grau de singularidade em termos de gêneros e espécies endêmicas, com relação às Américas, as cactáceas brasileiras vêm sendo severamente impactadas pela destruição e fragmentação de hábitat bem como pela coleta desenfreada para satisfazer o comércio de ornamentais e, como consequência, alguns táxons encontram-se sob risco de extinção (ZAPPI et al., 2011).

A anatomia interna das cactáceas é constituída por células condutoras do xilema e do floema, como os demais grupos de plantas que são vasculares. Mas, geralmente elas possuem tecido xilemático que apresenta maior proporção de células do parênquima, quando comparada às células lignificadas, formando o parênquima aquífero. Essa família compreende espécies com adaptações morfológicas, fisiológicas e ecológicas para ambientes extremos (SOFFIATTI; ANGYALOSSY, 2003) como, por exemplo, a capacidade de armazenar grandes quantidades da água nos seus caules, a ausência de folhas, a presença de espinhos e metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) (SÁNCHEZ-SOTO et al., 2010).

1.3 Gênero *Pilosocereus*

O gênero *Pilosocereus* engloba 37 espécies com ocorrência no México, Caribe e outros países da América Latina (TAYLOR; ZAPPI, 2004). No Brasil, o gênero é representado por 29 espécies distribuídas nas regiões Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Norte (LISTA DAS ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL, 2013). No Estado do Ceará foram registradas seis espécies: *P. crhysostele*, *P. catingicola*, *P. gounellei*, *P. pachycladus*, *P. flavipulvinatus* e *P. piauhyensi* (MENEZES et al., 2011).

Plantas do gênero *Pilosocereus* podem apresentar crescimento de arbustivo ao arbóreo, havendo espécies anãs com altura em torno de 30 cm; seus ramos são curtos, geralmente retos e maciços, mucilaginosos, de coloração verde ao cinza com cobertura de cera azul e auréolas largas (ZAPPI, 1994). As flores apresentam formas diferentes com a abertura noturna, sendo polinizadas por morcegos e mariposas; os frutos são globosos achatados com deiscência lateral, adaxial, abaxial ou apical e presença de remanescente floral (TAYLOR; ZAPPI, 2004).

1.3.1 *Pilosocereus chrysostele*

Pilosocereus chrysostele (Figura 1) é uma cactácea colunar que apresenta vários ramos partindo de uma haste principal, que geralmente são eretas. Os frutos são globosos, levemente achatados e deiscentes por uma fenda abaxial ou adaxial (TAYLOR; ZAPPI, 2004). Essa espécie é comumente encontrada na Caatinga, ao lado de estradas, em afloramentos rochosos e em solos areno-pedregosos.

Entre as cactáceas colunares destaca-se *Pilosocereus chrysostele* subsp. *cearensis*, o qual é endêmico do Estado do Ceará com ocorrência na Serra da Meruoca, no município de Campos Belos, nas cidades do Crato, de Irauçuba, de Itapajé, de Jaguaribe, de Pereiro, de Quixadá, de Santa Quitéria e de Sobral (Figura 2) (MENEZES et al., 2011).

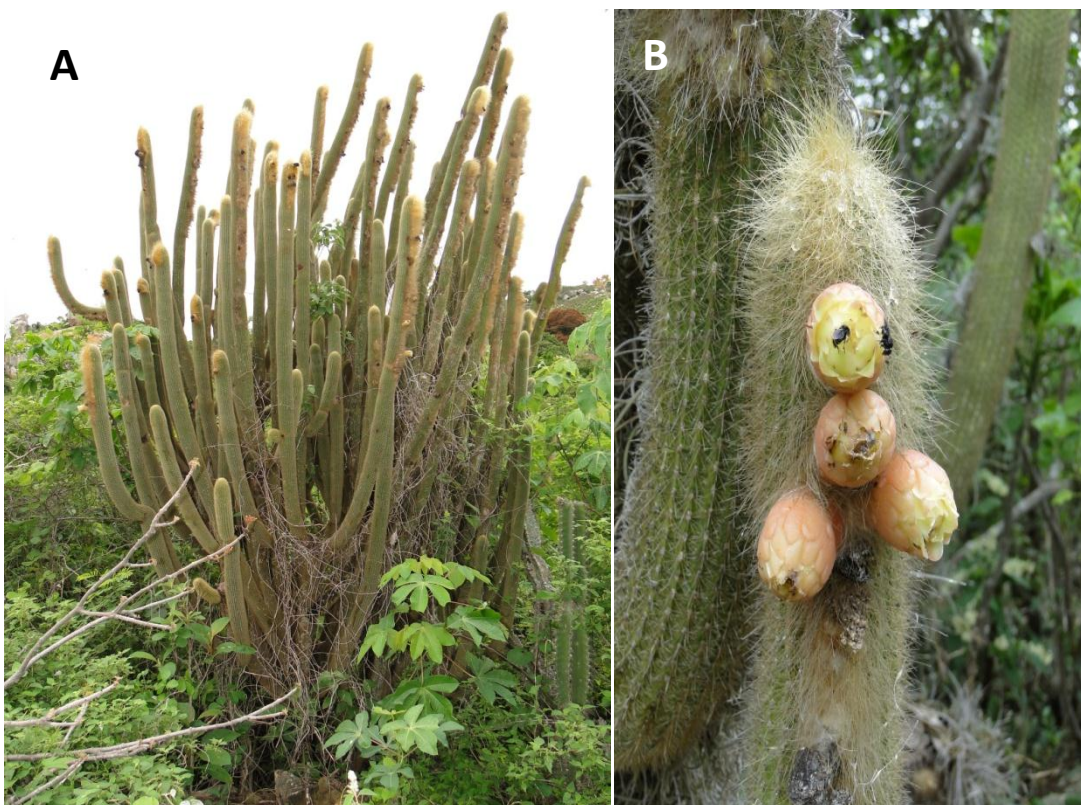
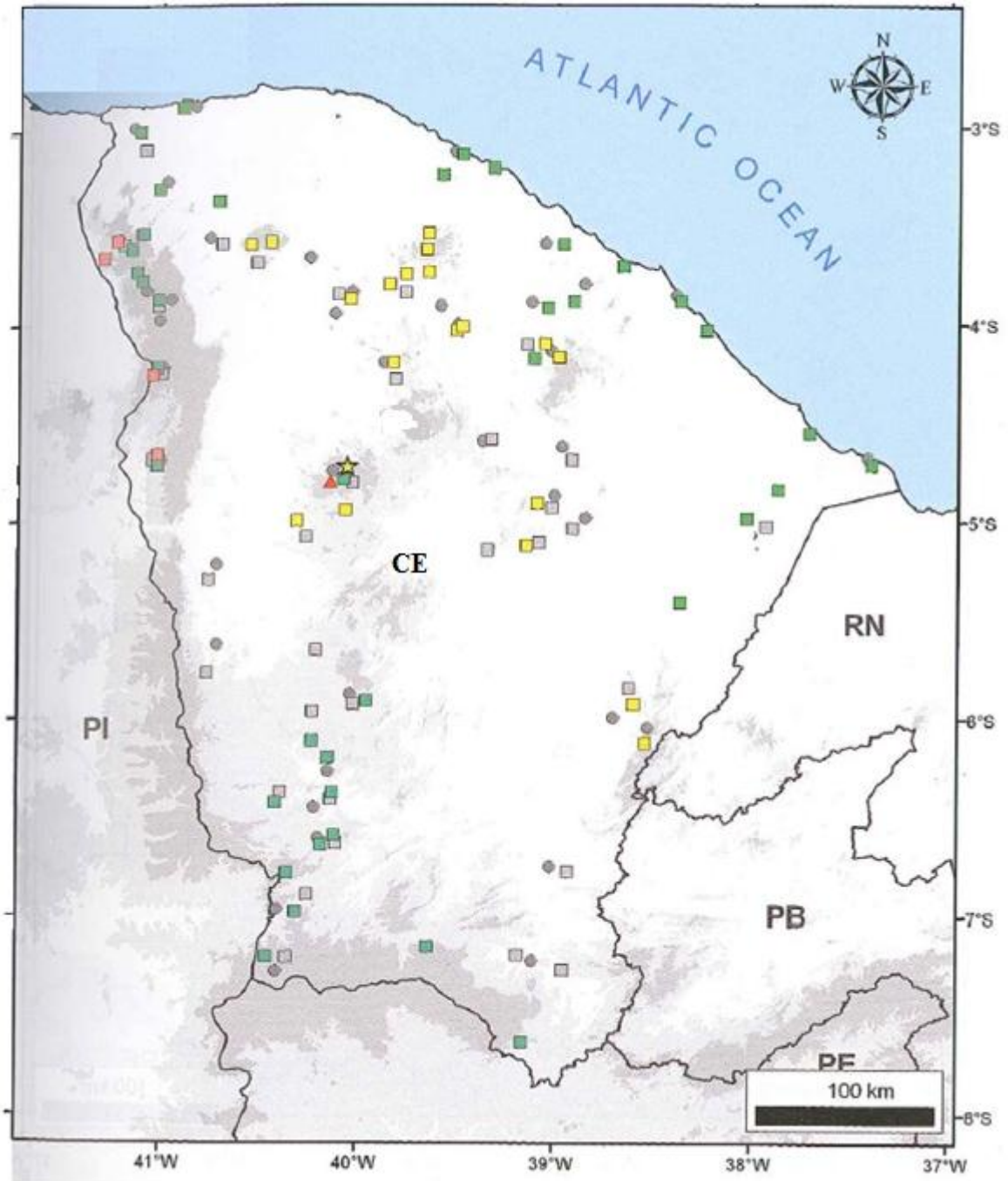


Figura 1 - *Pilosocereus chrysostele* em desenvolvimento no município de Monsenhor Tabosa, CE (A); Flor em detalhe (B). Foto: Diva Correia, 2010.



- | | |
|---|---------------------------------------|
| ■ <i>Pilosocereus pachycladus</i> subsp. <i>pernambucoensis</i> | ■ <i>Pilosocereus flavipulvinatus</i> |
| ■ <i>Pilosocereus cattingicola</i> subsp. <i>salvadorensis</i> | ■ <i>Pilosocereus gounellei</i> |
| ■ <i>Pilosocereus chrysostele</i> subsp. <i>cearensis</i> | ▲ <i>Brasiliopuntia brasiliensis</i> |
| ★ <i>Pilosocereus chrysostele</i> subsp. <i>chrysostele</i> | ● <i>Cereus jamacaru</i> |

Figura 2 - Distribuição de *Pilosocereus chrysostele* (em destaque) e outras cactáceas de ocorrência no Estado do Ceará. Fonte: Menezes et al., 2011.

1.4 Métodos de propagação

A propagação das cactáceas pode ser realizada de forma sexuada ou assexuada. Na propagação sexuada, a maioria das plântulas cresce lentamente, mas podem ser produzidas em grande quantidade (ABUD et al., 2010). Adicionalmente, esse método de propagação permite a manutenção da variabilidade genética, possibilitando a seleção de genótipos de interesse, sendo utilizada principalmente em programas de melhoramento genético, para reproduzir plantas com fins de conservação, reintrodução em áreas degradadas e comercialização (RUBLUO et al., 1996). Ademais, a multiplicação de cactáceas por sementes, devido ao baixo custo de produção, representa uma alternativa viável para os países que carecem de alta tecnologia para o aproveitamento comercial dos recursos genéticos vegetais (REYES, 1994). A propagação assexuada realizada por meio de cultivo *in vitro* (Figura 3A), de brotos, estacas (Figura 3B) e enxerto é restrita à multiplicação e clonagem de materiais elites ou raros, principalmente para fins conservacionistas e comerciais (RUBLUO et al., 1996).

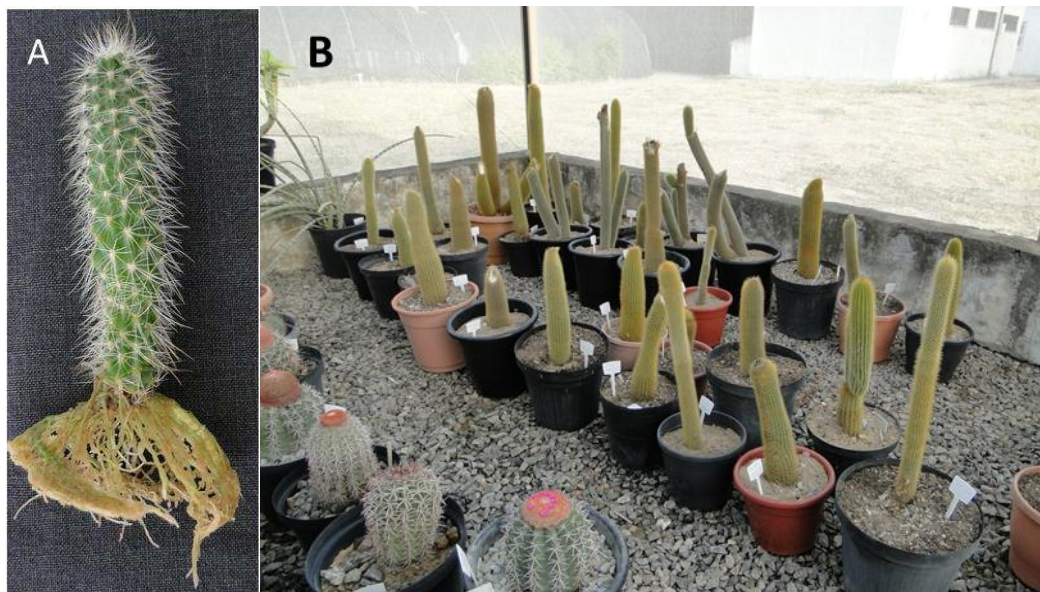


Figura 3 - Planta de *Pilosocereus chrysostele* aos 90 dias de cultivo *in vitro* (A); Acessos de *Pilosocereus chrysostele* mantidos na coleção de cactáceas da Embrapa Agroindústria Tropical em Fortaleza, CE (B). Fotos: Diva Correia, 2013.

A exploração comercial dos cactos e de outras plantas consideradas suculentas representa uma alternativa viável, pois dispensa o uso excessivo de água, e, como podem ser multiplicadas tanto por sementes quanto via vegetativa, possuem baixo custo de produção (REYES, 1994). Porém, faz-se necessária a exploração racional desses recursos, sendo importante o avanço do conhecimento biológico dessas espécies e o desenvolvimento de

técnicas eficientes de propagação para a produção de mudas, em escala comercial, evitando a extração predatória na natureza (CORREIA et al., 2012b).

1.4.1 Propagação *in vitro*

A cultura de tecidos vegetais baseia-se na capacidade da totipotência das células (TORRES et al., 2000). Representa um método de propagação assexuada e engloba várias técnicas onde a mais utilizada é a micropropagação já empregada para algumas espécies em escala comercial, como por exemplo, bananeira, batata-semente, morangueiro, gérbera, orquídeas, etc.

Alguns estudos já foram conduzidos utilizando cactáceas tais como: *Cereus peruvianus* (OLIVEIRA et al., 1995), *Opuntia ficus-indica* (COSTA et al., 2001), *Notocactus magnificus* (GALLO et al., 2006), *Mammillaria albicoma* (WYKA et al., 2006) e *Melocactus zehntneri* (ANSELMO, 2011; CORREIA et al., 2011a). Exceto Costa et al. (2001), que utilizou o meio de cultura B5, e Anselmo (2011) e CORREIA et al. (2011a), que utilizaram o meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995), os demais trabalhos fizeram uso do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), o mais utilizado em cultivo *in vitro* de plantas. De acordo com Correia et al. (2012b) a escolha do meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995) para o cultivo *in vitro* de cactáceas deu-se em razão de ele apresentar aproximadamente o dobro da concentração de cálcio ($5,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e de magnésio ($3,0 \text{ mmol L}^{-1}$) quando comparado às concentrações desses nutrientes existentes no meio de cultura MS. A importância do cálcio e do magnésio na nutrição mineral de cactáceas é citada por Rubluo et al. (1996). Entre outras diferenças na composição desses meios de cultura citam-se: 1) concentração de íons totais (JADS - 52 mmol L^{-1} ; MS - 94 mmol L^{-1}), 2) relação $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (JADS 5,5:1 ; MS 1,9:1), 3) fonte de cálcio (JADS - $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; MS - CaCl_2), 4) concentrações reduzidas de nitrogênio, potássio, boro, zinco e cloro e, maiores de fósforo, enxofre, cobre, ferro, sódio, cobalto em meio JADS do que em meio MS e, 5) ausência de iodo em meio JADS.

Entretanto, o sucesso no estabelecimento *in vitro* das cactáceas pode ser comprometido devido a morfologia da maioria das espécies, repleta de espinhos e pelos, que facilita a presença de microrganismos (MERCIER; KERBAUY, 1994; CHÁVEZ et al., 2006; MEDEIROS et al., 2006). Nesse contexto, o estabelecimento *in vitro* via sementes dessas espécies pode ser uma alternativa viável, não somente em virtude da maior facilidade para a desinfestação superficial, mas também pela manutenção da variabilidade genética das plantas

obtidas (CORREIA et al., 2011b). Portanto, para o estabelecimento *in vitro* é interessante a utilização de plantas oriundas da germinação de sementes *in vitro* derivadas de diferentes populações (MERCIER; NIEVOLA, 2003).

No entanto, apesar de algumas espécies de cactáceas já apresentarem protocolos de multiplicação, esses estudos ainda são escassos se comparados com os conhecimentos já obtidos para outras famílias de plantas, sobretudo para as espécies nativas (ZAPPI et al., 2011). Até o momento, não há relatos na literatura científica de trabalhos envolvendo a micropropagação de *Pilosocereus chrysostele*.

1.5 Reguladores de crescimento

Fitohormônios ou hormônios vegetais são um grupo de substâncias orgânicas naturais que influenciam, sob baixas concentrações, processos fisiológicos importantes como crescimento, diferenciação e desenvolvimento de plantas, além de atuarem, como mensageiros químicos, podendo inibir ou estimular esses processos (KERBAUY, 2012).

O termo regulador de crescimento é normalmente empregado para compostos naturais (fitohormônio e substâncias naturais de crescimento) ou sintéticos que exibem atividades no controle do crescimento e desenvolvimento da planta (DAVIES, 2010).

Segundo Kerbauy (2012) as principais classes de hormônios vegetais são: giberelinas, ácido abscísico, etileno, auxinas e citocininas. As giberelinas possuem a capacidade de promover o crescimento caulinar e o alongamento celular. O ácido abscísico está envolvido com a proteção ao estresse hídrico e no desenvolvimento de sementes. Já o etileno tem papel importante na divisão e expansão celular, crescimento e diferenciação da parte aérea e no amadurecimento de frutos. Enquanto as auxinas e citocininas estão relacionadas a funções importantes na regulação do crescimento e desenvolvimento de plantas.

As auxinas estão relacionadas, principalmente, ao crescimento da parte aérea, além de estimular o desenvolvimento de calos e o enraizamento vegetal. O fluxo de auxina vindo das gemas apicais inibe o crescimento de gemas laterais, fenômeno conhecido como dominância apical. Caso o crescimento da gema apical seja interrompido, o nível de hormônio diminui e as gemas laterais se desenvolvem. De acordo com Taiz e Zeiger (2012) foi constatado que

embora a dominância apical possa ser determinada primariamente pelas auxinas, estudos fisiológicos indicam que as citocininas executam um papel importante em iniciar o crescimento de gemas laterais (DAVIES, 2010; TAIZ; ZEIGER, 2012). Para Hoppen (2011), os estudos que foram realizados por Skoog e Miller (1957), sugeriram que a morfogênese vegetal é regulada por hormônios vegetais, principalmente as auxinas e citocininas. Esses autores verificaram que existe uma relação inversa entre os dois hormônios: quando o nível de auxina está mais elevado, contribui para o surgimento de raízes e quando o conteúdo de citocinina está alto, favorece o surgimento de gemas laterais. Assim, para ocorrer à quebra da dominância apical, estimulada pela auxina, é retirado o ápice da planta, ficando os segmentos caulinares e esses segmentos são utilizados como explantes na micropropagação para promover o desenvolvimento de gemas laterais, e conseqüentemente, a formação de brotos (TAIZ; ZEIGER, 2012). Segundo Deberch e Read (1991) é um método direto de regeneração de plantas por meio da indução do crescimento e da proliferação de gemas. Segundo Schuch e Erig (2005), as concentrações de citocininas para a multiplicação de gemas estão entre 0,1 mg L⁻¹ e 5,0 mg L⁻¹ e, entre as citocininas comercialmente disponíveis, a benzilaminopurina (BAP) geralmente apresenta ação mais rápida, induzindo a formação de gemas, além de ser economicamente mais viável por apresentar menor custo.

Todavia, 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 formação de brotos (HARTMANN, 2011). Para a indução de enraizamento, ANA (ácido naftalenoacético), AIA (ácidoindolacético) e AIB (ácidoindolbutírico) são as auxinas sintéticas frequentemente utilizadas para espécies de cactáceas (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 cactácea (ESTRADA-LUNA et al., 2008).

2. Objetivo

Avaliar a formação de brotações e de raízes em dois tipos de segmentos caulinares de *Pilosocereus chrysostele* juvenis em função de concentrações de citocinina.

3. Material e Métodos

3.1 Local

O estudo foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Agroindústria Tropical situado no município de Fortaleza, Ceará, durante o período de março de 2013 a junho de 2013.

3.2 Material genético

Foram utilizadas plantas de *Pilosocereus chrysostele* oriundas de sementeira *in vitro*.

Para obtenção das plantas de *P. chrysostele* cultivadas *in vitro*, as sementes foram retiradas de frutos coletados de plantas localizadas no Estado do Ceará. Foi utilizada a metodologia descrita por Correia et al. (2011a) para a desinfestação das sementes e a obtenção das plantas *in vitro*.



Figura 4 - Condições de crescimento para obtenção de plantas de *Pilosocereus chrysostele* *in vitro*. Foto: Diva Correia, 2013

3.3 Condução do experimento e delineamento experimental

O crescimento das plantas ocorreu em meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 1,8 g L⁻¹ de agente solidificante Gelrite®, em frascos de vidro de capacidade de 250 mL, cada um contendo 40 mL de meio. O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 antes da esterilização por autoclavagem a 121°C durante 15 minutos. O cultivo dessas plantas foi realizado em sala de crescimento à temperatura de 26 °C ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 horas e radiação fotossintética de 30 μmol m⁻² s⁻¹ (Figura 4). Foram utilizadas plantas cultivadas *in vitro* durante 12 meses após a semeadura com altura do caule em torno de 4 cm (Figura 5A).

Em câmara de fluxo laminar, os caules das plantas foram seccionados transversalmente estabelecendo-se dois tipos de explante: o segmento caulinar apical e o segmento caulinar basal com tamanho aproximado de 2 cm cada. Os explantes foram inoculados em meio de cultura JADS suplementado com citocinina BAP (6-benzilaminopurina - 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 mg L⁻¹), 30 g L⁻¹ de sacarose e 1,8 g L⁻¹ de agente solidificante Gelrite®, com ajuste do pH em 5,8 antes da esterilização em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Foram utilizados frascos de 250 mL com 40 mL de meio de cultura.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 6, sendo o fator A, tipos de segmentos caulinares (apical e basal) (Figura 5) e o fator B, as concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg L⁻¹), com 12 tratamentos (Tabela 1), 5 repetições com 5 frascos por repetição e um explante por frasco.

Aos 90 dias de cultivo, foram avaliados o número de brotações por explante com tamanho igual ou superior a 5 mm e o número de explantes com raízes.

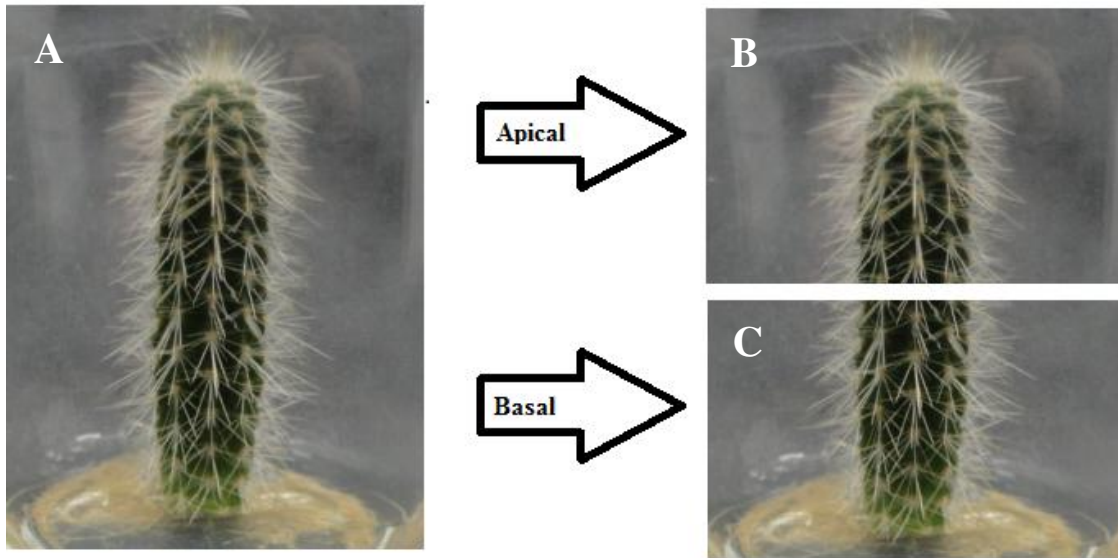


Figura 5 - Planta de *Pilosocereus chrysostele* cultivada *in vitro* durante 12 meses após a semeadura e com aproximadamente 5 cm de altura (A) e o segmento caulinar apical (B) e o segmento caulinar basal (C), ambos com aproximadamente 2 cm cada. Fotos: Diva Correia, 2013.

Tabela 1 - Definição dos tratamentos utilizados no experimento

Tratamentos	Tipo de segmento caulinar	Concentração de citocinina BAP em mg L ⁻¹
1	Apical	0,0
2	Basal	0,0
3	Apical	0,5
4	Basal	0,5
5	Apical	1,0
6	Basal	1,0
7	Apical	2,0
8	Basal	2,0
9	Apical	4,0
10	Basal	4,0
11	Apical	8,0
12	Basal	8,0

3.4 Análise Estatística

Os dados foram avaliados pela análise de variância (teste F) com significância a 1% de probabilidade. Para a variável número de brotações, foi realizada a análise de regressão tendo como variável dependente o número de brotações e como variável independente, a concentração de BAP. A escolha do modelo foi baseada nos coeficientes de determinação

ajustados (R^2) e na significância do teste F. Para a variável número de explantes com raízes, a comparação entre as médias foi realizada pelo teste de Tukey com significância a 5% de probabilidade.

4. Resultados e Discussão

O resultado da análise de variância para número de brotações e número de raízes desenvolvidas em explantes caulinares de *Pilosocereus chrysostele juvenis* cultivados *in vitro* encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Resumo da análise de variância para número de brotações e número de explantes com raízes em segmentos caulinares, apical e basal, de *Pilosocereus chrysostele juvenis* aos 90 dias de cultivo em função de concentrações de citocinina. Embrapa Agroindústria Tropical. Fortaleza, CE, 2013

Fontes de variação	GL	Quadrados Médios	
		Número de brotações (n ^o)	Explantes com raízes (n ^o)
Concentração de BAP (A)	5	94,0300**	10874,6666**
Tipo de segmento caulinar (B)	1	400,4166**	666,6666
A x B	5	41,4166	106,6666
Resíduo	48	25,2083	433,3333
CV (%)		50,97	42,20

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Na Tabela 2 pode-se verificar que houve efeito significativo das concentrações de citocinina e do tipo de segmento caulinar para número de brotações, e do tipo de segmento caulinar para número de explantes com raízes. Não foi observada interação significativa entre concentrações de citocinina e tipos de segmentos caulinares.

4.1 Número de brotações

O início da indução de brotações foi observado aos 30 dias de cultivo independente da concentração de citocinina.

Pode-se observar na Figura 6, uma tendência quadrática para a formação de brotações em ambos os tipos de segmentos caulinares. A formação de brotações sofreu incremento com o aumento da concentração de citocinina até 4 mg L⁻¹ de BAP e redução na presença de 8 mg

L⁻¹ de BAP. Essa resposta sugere que concentrações acima desses valores de BAP limitem o desenvolvimento de gemas.

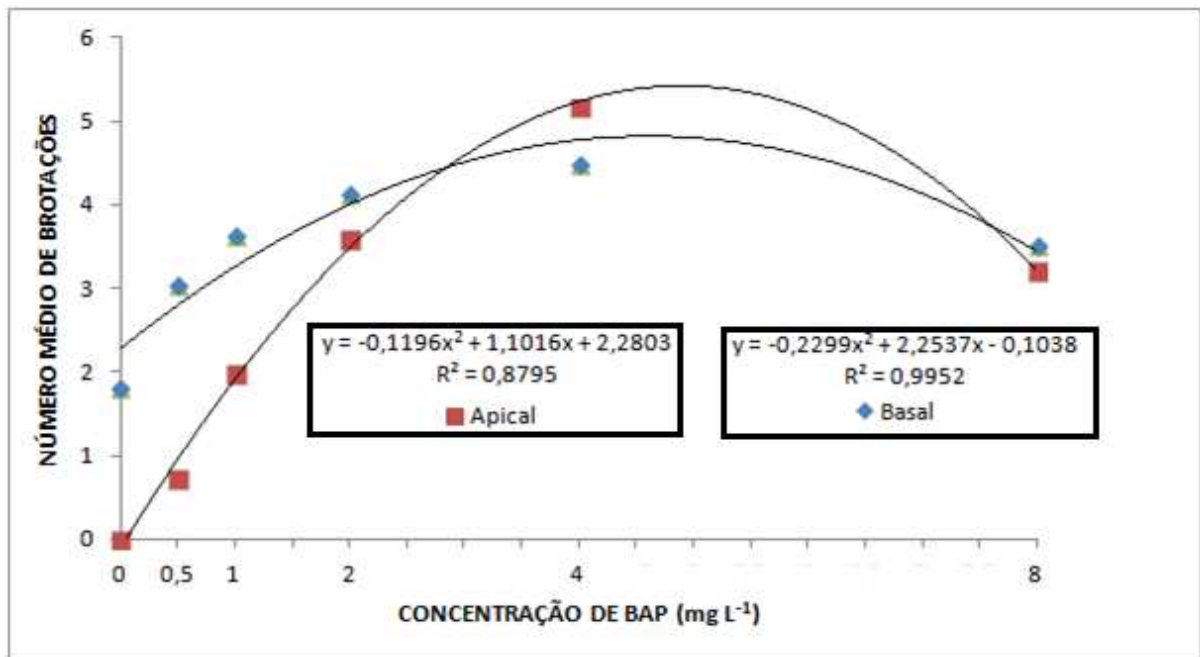


Figura 6 – Número médio de brotações obtidos em segmentos caulinares, apical e basal, de *Pilosocereus chrysostele* juvenis, em função da concentração de citocinina BAP (6-benzilaminopurina), em mg L⁻¹ aos 90 dias de cultivo *in vitro*. Fortaleza, 2013

Anselmo (2011) e Correia et al., (2011b) em estudos feitos com *Melocactus zehntneri* (coroa-de-frade) uma cactácea globular nativa do Nordeste do Brasil, observaram que as maiores médias de brotação foram obtidas com 4 mg L⁻¹ e 8 mg L⁻¹ de citocinina BAP e que segmentos caulinares basais apresentaram as maiores quantidades de brotações quando comparados aos segmentos caulinares apicais. Nos mesmos estudos também foi observado que para coroa-de-frade, o uso de concentrações acima de 4 mg L⁻¹ da citocinina BAP levam ao aparecimento de hiperhidria em ambos os tipos de segmentos.

4.2 Observações visuais

Para ambos os tipos de segmentos caulinares, foi observado que em concentrações acima de 1 mg L⁻¹ de BAP, as brotações apresentavam aspecto vítreo ou seja, hiperhidria (Figura 7). Segundo Hazarika et al. (2006), plantas com aspecto vítreo são caracterizadas por apresentarem excesso de absorção de água, baixos níveis de lignina e

celulose, resultando na redução da parede celular. Este fato já foi observado na micropropagação de algumas espécies de cactáceas (GIUSTI et al., 2002; SANTOS-DÍAS et al., 2003; ANSELMO, 2011; CORREIA et al., 2011b). 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 (HARTMANN, 2011). Para Ziv e Ariel (1994), o excesso de regulador de crescimento no meio de cultura, por um tempo prolongado pode causar alterações genéticas, fisiológicas e morfológicas. Segundo PÉREZ-MOLPHE-BALCH et al. (2002) a hiperhidria pode impedir o enraizamento e a sobrevivência *ex vitro*, embora a hiperhidricidade não contribua para a diminuição do número de brotações. Nesse estudo, a redução para formação de brotações somente foi observada acima de 4 mg L⁻¹ de BAP. Resultados similares a esse estudo também foram alcançados por Anselmo, 2011 e Correia et al., 2011b em dois tipos de segmentos caulinares de *Melocactus Zehntneri* em 80 dias de cultivo.

A presença de hiperhidria em culturas *in vitro* deve-se a ocorrência de alterações fisiológicas. Essas alterações podem estar relacionadas com excesso de citocinina (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), de nutrientes do meio de cultivo (HARTMANN, 2011) e/ ou influência de outro fator ambiental específico que interage com a cultura necessitando de mais investigação, como por exemplo, testar concentrações de até 1 mg L⁻¹ de BAP para a *P. chrysostele* e/ou outras fontes de citocinina como realizado por Oliveira et al. 2008 em *Cereus jamacaru*, uma cactáceas colunar nativa do Brasil. Nesse estudo foi observado que o uso de BAP ou de N,6-isopenteniladenina (2-iP) favorecem a formação de brotações em meio de cultura MS suplementado com até 2 mg L⁻¹. Todavia, na presença de 2-iP, as brotações desenvolvidas apresentavam boa qualidade e crescimento normal quando comparadas aquelas crescidas na presença de BAP com 1,0 mg L⁻¹ e 2,0 mg L⁻¹, as quais mostravam-se intumescidas e altura reduzida.

[BAP]
mg L⁻¹

APICAL

BASAL

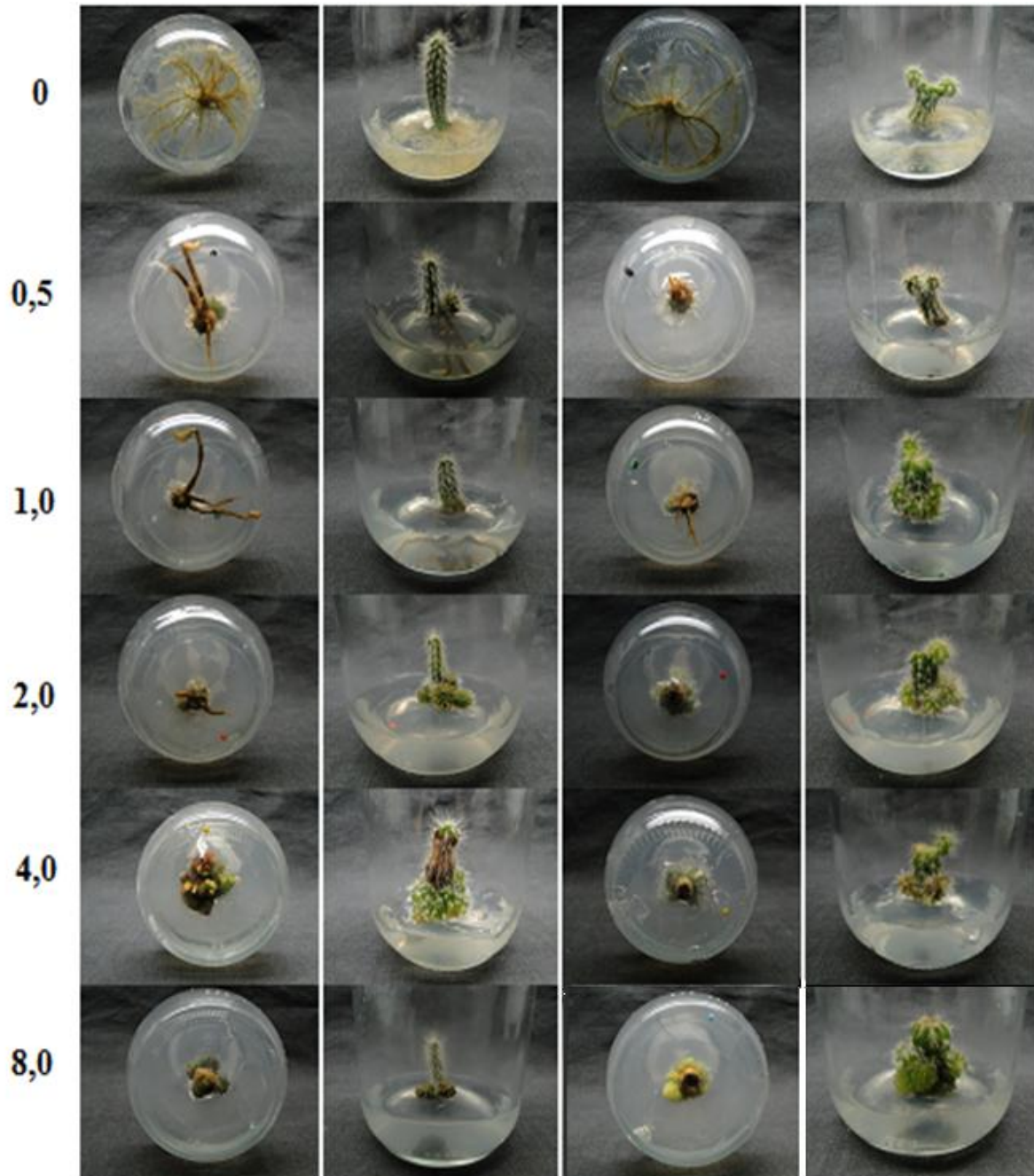


Figura 7 – Crescimento de brotações em segmentos caulinares, apical e basal, de *Pilosocereus chrysostele* juvenis, em função da concentração de citocinina BAP (6-benzilaminopurina), em mg L⁻¹ aos 90 dias de cultivo.

Na Tabela 3 encontram-se as características visuais da morfogênese em brotações formadas em segmentos caulinares, basal e apical, cultivados em meio de cultura JADS suplementado com diferentes concentrações de citocinina BAP. As brotações foram avaliadas quanto à localização (origem) no explante, ao tamanho, à coloração e crescimento.

Tabela 3 – Localização da formação de brotações no explante, tamanho, coloração e crescimento das brotações em segmentos caulinares, apical e basal, de *Pilosocereus chrysostele* juvenis, em função da concentração de citocinina BAP (6-benzilaminopurina), em mg L⁻¹, aos 90 dias de cultivo *in vitro*

Tipo de segmento caulinar	Concentração de citocinina BAP, em mg L ⁻¹						
	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	
Apical	Local	Não há	Região inferior	Região superior e inferior	Região inferior	Região superior e inferior	Região superior e inferior
	Tamanho	Não há	Variando de 0 a 15 mm	Variando de 0 a 15 mm	Variando de 0 a 15 mm	Variando de 0 a 15 mm	Variando de 0 a 15 mm
	Cor	Não há	Verde-escuro	Verde - claro e verde – escuro	Verde - claro e verde – escuro	Verde - claro e verde - escuro	Verde – escuro
	Crescimento	Não há	Reduzido/uniforme	Médio/uniforme	Intenso/desuniforme	Intenso/desuniforme	Intenso/desuniforme
Basal	Local	Região Superior	Região superior	Região superior e inferior	Região superior e inferior	Região superior e inferior	Região superior e inferior
	Tamanho	Variando de 0 a 20 mm	Variando de 0 a 15 mm	Variando de 0 a 15 mm	Variando de 0 a 15 mm	Variando de 0 a 15 mm	Variando de 0 a 10 mm
	Cor	Verde - claro e verde – escuro	Verde - claro e verde - escuro	Verde - claro e verde - escuro	Verde - claro e verde – escuro	Verde - claro e verde - escuro	Verde - escuro
	Crescimento	Médio/uniforme	Médio/uniforme	Intenso/desuniforme	Intenso/desuniforme	Intenso/desuniforme	Intenso/desuniforme

Pode-se inferir pelos dados obtidos na Tabela 4 e na Figura 7 que há um gradiente hormonal na planta que originou os dois tipos de segmentos caulinares apical e basal, da base para o ápice da planta favorável à citocinina. Esse fato é evidente em ambos os segmentos caulinares cultivados durante 90 dias na ausência de citocinina onde só houve formação de brotações em segmentos basais devido à quebra da dominância apical causada pelo corte transversal realizado no caule da planta que originou os dois tipos de segmentos. Em ambos os segmentos caulinares cultivados na presença de citocinina observa-se que a formação de brotações se intensifica na região inferior de segmentos caulinares apicais e na região superior de segmentos basais até a concentração de 0,5 mg L⁻¹ de BAP. Nessas regiões dos segmentos caulinares, o número de brotações se intensifica e reduz de tamanho com o aumento da concentração de citocinina. Oliveira et al. (2008), avaliando a produção de biomassa de brotações de *Cereus jamacaru in vitro*, também observaram tendência de redução da biomassa a partir da concentração de 2,0 mg L⁻¹ de BAP ou de 2-iP.

4.2.1 Formação de raízes

Na Tabela 4 e Figura 8 pode-se observar que com o aumento da concentração de citocinina houve uma redução na formação de raízes em ambos os tipos de segmentos caulinares evidenciando o efeito da citocinina para a formação de brotações (Figura 7; TABELA 4) e de inibição à indução de raízes. Na ausência de citocinina houve 100% de formação de raízes em ambos os tipos de segmentos caulinares o que enfatiza a dominância apical onde as auxinas são produzidas no ápice da planta (KERBAUY, 2012).

Tabela 4 – Porcentagem de enraizamento em segmentos caulinares, apical e basal, de *Pilosocereus chrysostele juvenis* em função de concentrações de citocinina aos 90 dias de cultivo in vitro

Tipo de segmento caulinar	Concentração de BAP (mg L ⁻¹)					
	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0
Apical	100	60	72	52	28	4
Basal	100	52	56	40	24	4

[BAP]
mg L⁻¹

APICAL

BASAL

0,0

0,5

1,0

2,0

4,0

8,0

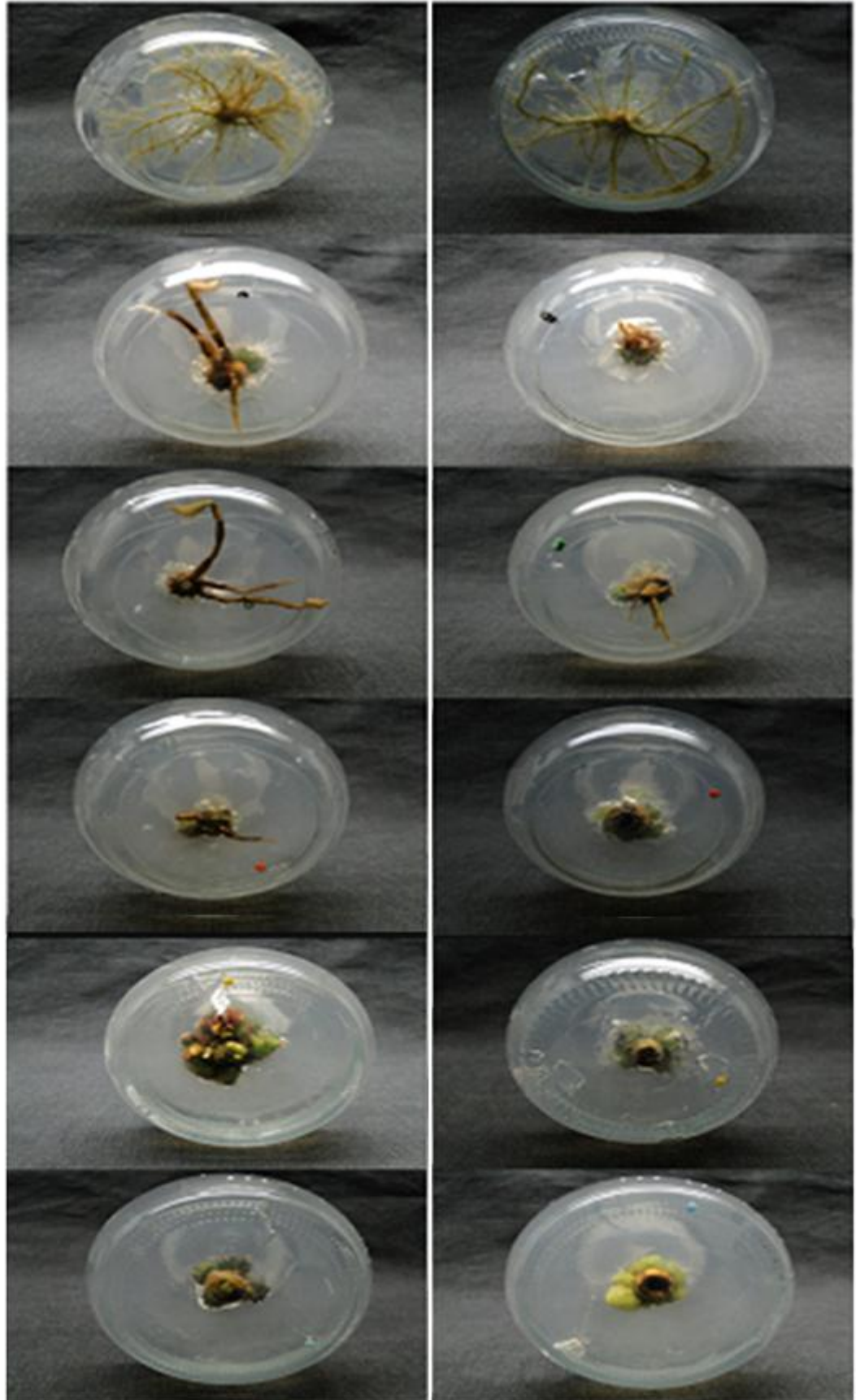


Figura 8 – Crescimento de raízes em segmentos caulinares, apical e basal, de *Pilosocereus chrysostele* juvenis em função da concentração de citocinina BAP (6-benzilaminopurina), em mg L⁻¹ aos 90 dias de cultivo.

5. CONCLUSÕES

Segmentos caulinares apical e basal, de *P. chrysostele* juvenis, cultivados em meio de cultura JADS durante 90 dias: induzem brotações com até 1 mg L⁻¹ de citocinina BAP, favorecem o desenvolvimento de brotações com hiperhidria em concentrações superiores a 1 mg L⁻¹ e reduzem a formação de raízes com o aumento da concentração de BAP.

Referências

ABUD H. F., GONÇALVES N. R., REIS R. de G. E, PEREIRA D. de S. P e BEZERRA A. M. E. Germinação e expressão morfológica de frutos, sementes e plântulas de *Pilosocereus pachycladus* Ritter. Revista **Ciência Agrônômica**, Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE v. 41, n. 3, p. 468-474, jul-set, 2010.

ANDRADE, C. T. da S. Cactos úteis na Bahia: ênfase no Semiárido. Pelotas: **USEB**, 2008. p. 125.

ANSELMO, G. C. **Multiplicação *in vitro* de coroa-de-frade (*Melocactus zehntneri*) a partir de material juvenil**. 2011. 53 f. Monografia (Graduação), Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Depto de Biologia, Fortaleza.

CÂNDIDO, M. J. D.; ARAÚJO, G. G. L.; CAVALCANTE, M. A. B. Pastagens no ecossistema Semi-árido Brasileiro: atualização e perspectivas futuras. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Goiânia. **Anais...** Goiânia: SBZ, 2005.

CALVENTE, A.; ZAPPI, D. C.; FOREST, F. & LOHMANN, L. G. 2011. Molecular phylogeny of tribe Rhipsalideae (Cactaceae) and taxonomic implications for Schlumbergera and Hatiora. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 58: 456-468.

CHÁVEZ, L. C.; MORALES RUBIO E.; TREVINO NEAVEZ, J. F. La germinación *in vitro* una alternativa para obtener explantes em cactaceas. **Zonas Áridas**, Lima. N. 10, p. 129-133, 2006.

CORREIA, D.; ANSELMO, G. C.; SILVA JUNIOR, J. M. T.; NASCIMENTO, E. H. S.; MORAIS, J. P. S.; COELHO, P. J. A. Effect of cytokinin and kind of explant upon friar crown *in vitro* shoot formation. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 923, p. 183-188, 2011b.

CORREIA, D.; GONÇALVES, A. N.; COUTO H. Y. Z.; RIBEIRO, M. C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **IPEF**, Piracicaba, n. 48/49, p. 107-116, 1995.

CORREIA, D.; NASCIMENTO, E. H. S.; ANSELMO, G. C.; SILVA, J. M. T. J.; MORAIS, J. P. S. **Tipo de corte em caule juvenil de coroa-de-frade para formação de brotos *in vitro***. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2012b, 6 p. (Embrapa Agroindústria Tropical, Comunicado Técnico, 188).

CORREIA, D.; NASCIMENTO, E. H. S. do; ARAÚJO J. D. M.; OLIVEIRA, A. E. R. **Produção de Mudanças de Xique-Xique**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2012a, 7 p. (Embrapa Agroindústria Tropical, Circular Técnica, 40).

CORREIA, D.; NASCIMENTO, E. H. S. do; ARAÚJO, J. D. M.; ANSELMO, G. C.; COELHO, P. J. A. **Germinação de sementes de cactáceas *in vitro***. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011a, 6 p. (Embrapa Agroindústria Tropical, Comunicado Técnico, 181)

COSTA P. S.; SOARES, A. A.; ARNHOLDT-SCHMITT, B. Studies on the induction of embryogenic globular structures in *Opuntia ficus-indica*. **Journal of the Professional Association for Cactus Development**. México. n. 4, p. 66-74, 2001.

CPRM. Serviço Geológico do Brasil. Geologia, tectônica e recursos minerais do Brasil, **Sistema de Informações Geográficas-SIG**. 2005. Disponível em: <http://www.cprm.gov.br/rehi/atlas/paraiba/relatorios/CORE062.pdf>. Acesso em: 23 out. 2013.

DAVIES, P. J. *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction*, **Springer**, Dordrecht, The Netherlands. Action. 2010. 801 p.

DEBERGH, P. C.; READ, P.E. Micropropagation. In: DEBERGH, P. C., ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer, p. 1-13, 1991.

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**, Netherland, v.117, p.378–385, 2008.

GALLO L. A.; MEDEIROS L. A.; RIBEIRO R. C. S.; OLIVEIRA E. T.; PAYÃO M. E. S. *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Netherlands v. 84, n. 2, p. 165-169, 2006.

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

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

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

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

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

HOPPEN C. Efeito de Diferentes Fontes de Fitorreguladores na Morfogênese de Diferentes Procedências e Explantes de *Jatropha curcas* L. Cultivados *in vitro*. **UFPR**, Curitiba. 2011. p. 26 – 35.

HUNT, D.; TAYLOR, N. P. & CHARLES, C. **The New Cactus Lexicon**, 2 v., dh publications, Milborne Port. 2006, 560 p.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 431 p.

LISTA DAS ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL 2013. Cactáceas. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 25 nov. 2013.

LORENZI, H.; SOUZA, V.C. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. 3ª edição. Nova Odessa, SP: Instituto *Plantarum*, 2012. 768 p.

LUCENA, C.M.; Costa, G.M.; Sousa, R.F.; Carvalho, T.K.N.; Marreiros, N.A.; Alves, C.A.B.; Pereira, D.D.; Lucena, R.F.P. 2012. Conhecimento local sobre cactáceas em comunidades rurais na mesorregião do sertão da Paraíba (Nordeste, Brasil). **Biotemas**. João Pessoa, v.25, n.3.

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

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

MENEZES, M.O.T.; TAYLOR, N.P.; MACHADO, M.C.; COELHO, P.J.A.; CORREIA, D. Diversity and distribution of Cactaceae in Ceará state, northeastern Brazil. **Bradleya**, Milton Keynes, v. 29, p. 13-42, 2011.

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

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

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

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

OLIVEIRA, S. A., Machado, M. F. P. S.; Prioli, A. J. *In vitro* propagation of *Cereus peruvianus* Mill (Cactaceae). **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, Lavras, MG. n. 31: p. 47–50, 1995.

OLIVEIRA, A. B.; DINIZ; J. N.; ALMEIDA, J. L. Multiplicação e enraizamento *in vitro* do mandacaru (*Cereus jamacaru* P. DC.). **Plant Cell Cult. Micropropag.**, Lavras, v. 4, n. 1, p. 48-54, 2008.

PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E.; DÁVILA-FIGUEROA, C. A. *In vitro* propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, Netherland, v. 38, p. 73–78, 2002.

QUEIROZ, L. P. (2009) **Leguminosas da caatinga** - Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, 467 p.

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

REYES, J. S. Métodos para la propagación de Cactáceas Mexicanas. **Amaranto**, México, v. 7, n. 2, p. 1-12, 1994.

RUBLUO, A.; REYES J.; GARAY B.; BARRIOS E.; BRUNNER I. Métodos de propagación biotecnológicos y convencionales en cactáceas para zonas áridas. In: IZQUIERDO, J.; PALOMINO, G. (Ed.). **Técnicas convencionales y biotecnológicas para la propagación de plantas de zonas áridas**. Santiago: Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe, 1996. p. 4.

SÁNCHEZ-SOTO, B. REYES-OLIVAS A.; GARCÍA-MOYA E.; TERRAZAS T. Germinación de tres cactáceas que habitan la región costera del noroeste de México. **Interciencia**, México. v. 35, n. 4, p. 299-305, 2010.

SANTOS-DÍAZ, M. S. MÉNDEZ-ONTIVEROS, R., ARREDONDO-GÓMEZ, A., SANTOS-DIAZ, M. De L. *In vitro* organogenesis of *Pelecypora aselliformis erhenberg* (Cactaceae). **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, Netherland, v. 39, p. 480–484, 2003.

SCHUCH, M.W.; ERIG, A.C. Micropropagação de plantas frutíferas. In. FACHINELO, J.C. et al. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2005. p. 155-173.

SHEDBALKAR, U. U. ADKI, V. S.; JADHAV, J. P.; BAPAT, V. A. *Opuntia* and other cacti: applications and biotechnological insights. **Tropical Plant Biology**, v. 3, p. 136-150, 2010.

SKOOG F.; MILLER C, O Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultivated *in vitro*. **Symp. Soc. Exp. Biol.** v. 11, p. 118-131, 1957.

SOFFIATTI, P.; ANGYALOSSY, V. Stem anatomy of *Cipocereus* (Cactaceae). **Bradleya**, Milton Keynes v. 21, p. 39-48, 2003.

TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (2003) Áreas e ações prioritárias para conservação da biodiversidade da caatinga. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M., SILVA, J. M. C. (Eds) **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Recife – ed.Universitária da UFPE. Cap. 20, 777-796 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5 ed, Porto alegre: Artmed, 2012. 820 p.

TAYLOR, N. P.; ZAPPI, D. C. **Cacti of Eastern Brazil**. 1. ed. Kew: Royal Botanic Gardens. 2004, 499 p.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. **Glossário de Biotecnologia Vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128 p.

VALENTE JUNIOR, A. S. (2010). Semiárido em transformação: panorama socioeconômico e entraves para o desenvolvimento In: Batista Filho, M.; Miglioli, T. C. (Org.). **Viabilização do Semiárido do Nordeste: um enfoque multidisciplinar**. Recife: Liceu. p.69-81.

WYKA, P.T., HAMERSKA, M. AND WRABLEWSKA, M. Organogenesis of vegetative shoots from *in vitro* cultured flower buds of *Mammillaria albicoma* (Cactaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Netherlands. v. 87: 27-32. 2006.

ZAPPI, D. C. **Pilosocereus (Cactaceae)**. The genus in Brazil. Kew: Royal Botanic Gardens, 1994, 160 p.

ZAPPI, D.; TAYLOR N., RIBEIRO-SILVA S.; et al. **Plano de ação nacional para conservação das cactáceas**. 7 Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBio, 2011, 113p.

ZAPPI, D. C.; AONA, L. Y. S. & TAYLOR, N. 2007. **Cactaceae**. in: WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G. J.; MELHEM, T. S. & GIULIETTI, A. M. (eds.). Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo, 5:163-193.

ZAPPI, D. C., TAYLOR, N. P. & MACHADO, M. C. **Cactaceae**. in: FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, F. A.; BICUDO, C. E. M.; CANHOS, D. A. L.; CARVALHO, JR. A. A.; COSTA, A.; COSTA, D. P.; HOPKINS, M.; LEITMAN, P. M.; OHMANN, L. G.; NIC LUGHADHA, E.; MAIA, L. C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M. P.; NADRUZ COELHO, M. A.; PEIXOTO, A. L.; PIRANI, J. R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L. P.; SOUZA, S.; SOUZA, V. C.; STEHMANN, J. R.; SYLVESTRE, L. S.; WALTER, B. M. T. & ZAPPI, D. C. (eds.). Catálogo de Plantas e fungos do Brasil, Jardim botânico do Rio de Janeiro, vol., 1: 822 – 832. 2010.

ZIV, M.; ARIEL, T. Vitification in relation to stomatal deformation and malfunction in carnation leaves in vitro. In: LUMDSEN, P.J. et al. (Eds.). **Physiology, growth and development of plants in culture**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p.142-154, 1994.

ZOGLAMI, N.; BOUAMAMA, B.; KHAMMASSI, M.; GHORBEL A. Genetic stability of long-term micropropagated *Opuntia ficusindica* (L.) Mill. Plantlets as assessed by molecular tools: perspectives for *in vitro* conservation. **Industrial Crops and Products**, v.36, p. 59-64, 2012.