



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS**

DARLYSON TAVARES GUIMARÃES

**GERMINAÇÃO *IN VITRO*, DESENVOLVIMENTO INICIAL E
MICROPROPAGAÇÃO DE *CEREUS JAMACARU* EM MEIOS
DE CULTURA SIMPLIFICADOS.**

**SUMÉ - PB
2016**

DARLYSSON TAVARES GUIMARÃES

**GERMINAÇÃO *IN VITRO*, DESENVOLVIMENTO INICIAL E
MICROPROPAGAÇÃO DE *CEREUS JAMACARU* EM MEIOS
DE CULTURA SIMPLIFICADOS.**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

**Orientador: Professor Dr. Franklin Ferreira de Farias Nóbrega.
Coorientadora: Dra. Marina Medeiros Araújo Silva.**

**SUMÉ - PB
2016**

G963g Guimarães, Darlyson Tavares.
Germinação *in vitro*, desenvolvimento inicial e micropropagação de *Cereus jamacaru* em meios de cultura simplificados. / Darlyson Tavares Guimarães. - Sumé - PB: [s.n], 2016.

48 f.

Orientador: Prof. Dr. Franklin Ferreira de Farias Nóbrega;
Orientador^a: Prof^a. Dr^a. Marina Medeiros de Araújo Silva.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Biotecnologia. 2. Germinação *in vitro*. 3. Cactácea – *Cereus jamacaru*. I. Título.

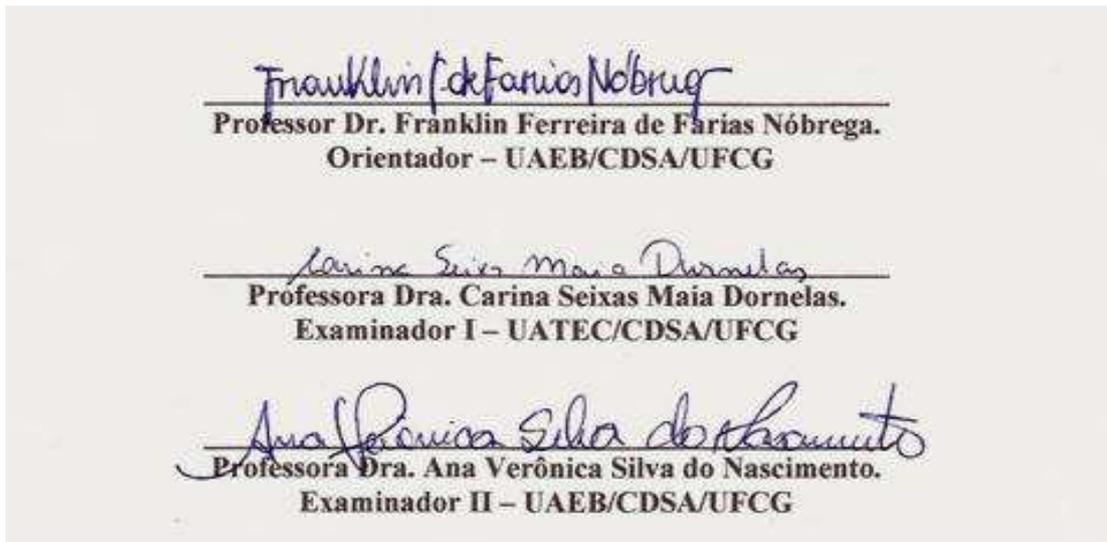
CDU: 60 (043.3)

DARLYSSON TAVARES GUIMARÃES

**GERMINAÇÃO *IN VITRO*, DESENVOLVIMENTO INICIAL E
MICROPROPAGAÇÃO DE *CEREUS JAMACARU* EM MEIOS
DE CULTURA SIMPLIFICADOS.**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

BANCA EXAMINADORA:



Trabalho aprovado em: 19 de outubro de 2016.

SUMÉ - PB

AGRADECIMENTOS

A Deus, agradeço pela minha vida e por toda força, saúde e coragem concedidas durante toda minha caminhada.

Aos meus pais, Djair Ribeiro e Rubia Tavares, que sempre me ensinaram os verdadeiros valores de um homem, cultivando a educação e o respeito em primeiro lugar. E por nunca medirem esforços para estarem dispostos a me ajudar, com paciência e incentivo, em cada uma das coisas que faço, mesmo na distância. Ao meu irmão Douglas Guimarães, pela parceria e convivência durante esses anos. Vocês são minha fortaleza!

As minhas avós, Maria e Mercês (in memoriam) por toda preocupação e carinho que tiveram todas as vezes que chegava o meu dia de viajar até Sumé.

A minha tia Diana, pelos conselhos e incentivos durante minha vida acadêmica.

Aos meus amigos e companheiros de apartamento, Rodolfo e Eliélson, pela confiança e companheirismo durante todo o tempo que estivemos juntos. Compartilhamos tristezas e muitas alegrias, e a nossa convivência me fez bem. Vocês são meus irmãos de coração.

As minhas grandes amigas e irmãs, Jéssica Renally e Magali, que me acompanharam durante toda a graduação e estão presentes na minha vida até hoje. O apoio e ajuda de vocês foram essenciais para a realização desse trabalho. Sem as duas essa caminhada teria sido ainda mais difícil.

A Jéssica Moreira e Ana Carla, que sempre me ajudaram da melhor forma possível, contribuindo em todos os aspectos para meu crescimento pessoal e profissional. Com vocês eu dividi sonhos, problemas e soluções.

Aos meus amigos de graduação da turma 2012: André, Maysa, Aisla, Suelen, Yasmim, Renato, Jaqueline, Neto, Magna, Mayk, Éder, Semyres, Carol e Ellen. De estudos a farras nós aproveitamos tudo... Vocês fazem parte da minha história.

A Elder, Catarina e Jéssica Leite, pela significativa amizade de vocês e pelas diversas vezes que me hospedaram nesse último período de curso, saibam que tem lugar especial em meu coração. E aos demais amigos do QG: Felipe, Canígia, Laura, Jéssica Dayse, Mônica, Caio e Geórgia, pelo apoio e inesquecíveis momentos de descontrações.

A Livia, Yuren e André Luíz, pelos grandes laços de amizade que se fortalecem cada vez mais e por toda força e ajuda a mim concedidas nesses dias.

A Luana e Jéssica Lorena pelas diversas contribuições em meus trabalhos, onde sempre se dispuseram a ajudar.

Aos professores, amigos e colegas do CERTBIO, em especial meu supervisor Rossemberg Cardoso e Wladimir e Alecsandra, pelas experiências trocadas, ajudas concedidas e oportunidades oferecidas.

Ao Prof, Dr. Jean César, um profissional no qual eu procuro me espelhar, que sempre me ajudou nos mais diversos problemas da vida acadêmica, de bancas a seminários. E ao meu orientador de iniciação científica Prof. Dr. Aldre Jorge, pelas oportunidades que me foram dadas e pelas orientações repassadas.

Ao INSA pela disponibilidade do Laboratório de cultivo *in vitro* de plantas, onde esta pesquisa foi desenvolvida.

A Laís, pelas inúmeras contribuições para este trabalho, da coleta às análises estatísticas, e por todos os momentos vividos e lanches compartilhados no LaCIP. És especial para mim.

A minha coorientadora Dra. Marina Medeiros, amiga e excelente profissional com quem tive a honra de compartilhar momentos e aprendizados. Foi a pessoa que me abriu os caminhos da cultura de tecidos vegetais e do LaCIP, me deixando um legado de conhecimentos dessa área de atuação. Saiba que você contribuiu bastante para minha formação profissional. Muito obrigado!

Ao meu orientador Prof. Dr. Franklin Nóbrega, por me acompanhar desde o terceiro período da graduação, me incentivando e oferecendo grandes oportunidades de aprendizado e crescimento profissional. Obrigado por toda confiança em mim depositada, e por ser esse magnífico professor. Aprendi bastante com o Senhor.

A todos que de alguma forma contribuíram para o êxito deste trabalho, meu muito obrigado.

*"Para se ter sucesso, é necessário amar de verdade o que se faz.
Caso contrário, levando em conta apenas o lado racional, você simplesmente desiste.
É o que acontece com a maioria das pessoas."*

Steve Jobs

RESUMO

Cereus jamacaru DC é uma cactácea típica da Caatinga, com importância para a sustentabilidade e conservação deste bioma, e muito explorada para uso ornamental e forrageiro. O cultivo *in vitro* é uma ferramenta biotecnológica que vem sendo aplicada para a germinação, multiplicação e conservação de diferentes espécies de cactáceas nativas, porém, é uma técnica onerosa, que pode ter seus custos reduzidos pela modificação de alguns fatores, como o meio de cultura. Esse trabalho objetivou avaliar a germinação *in vitro* e a micropropagação de *Cereus jamacaru*, utilizando diferentes meios de cultura, citocininas e fontes de luz. O experimento foi conduzido no Laboratório de cultivo *in vitro* de plantas do INSA e ocorreu em duas etapas: na germinação *in vitro* e desenvolvimento inicial das plântulas foram usados meios de cultura simplificados ($\frac{1}{2}$ CK e CK), compostos pelos fertilizantes Calcinit e Kristalon, e duas diferentes fontes de luz (fluorescente e LED), enquanto na micropropagação foi utilizado o meio de cultura CAC suplementado com 2 mg L⁻¹ das citocininas BAP, KIN, TOP e TDZ. Os resultados mostraram que o tratamento LED + $\frac{1}{2}$ CK apresentou o maior percentual de germinação (83%) e que as lâmpadas de LED propiciaram um melhor desenvolvimento das plântulas quando comparadas ao uso de fluorescentes; no entanto, a fonte de luz não interferiu na taxa de sobrevivência das plantas, que foi de 100% em ambos os tratamentos, após 30 dias de aclimatização. Para a etapa de multiplicação, o meio adicionado de BAP induziu a formação média de 4,3 brotos por explante inoculado, seguido por TOP (3,1), KIN (2,5) e TDZ (0,9). Contudo, a altura das brotações foi inversamente proporcional ao número de brotos. Diante do exposto, os meios de cultura simplificados podem ser utilizados para o cultivo *in vitro* de mandacaru.

Palavras-chave: Biotecnologia. Citocininas. Cultura de tecidos vegetais. Mandacaru sem espinho. Qualidade da luz.

ABSTRACT

Cereus jamacaru is a typical cactaceous from Caatinga, with importance for the sustainability and conservation of this biome, and exploited for ornamental and forage use. *In vitro* culture is a biotechnological tool that has been applied for germination, multiplication and conservation of different species of native cacti, however, it is a costly technique, which may have their costs reduced by modifying of some factors such as the culture medium. This study aimed to evaluate the *in vitro* germination and micropropagation of *Cereus jamacaru* using different culture media, cytokinins and light sources. The experiment was carried out in the Laboratório de cultivo *in vitro* de plantas of INSA, and took place in two stages: *in vitro* germination and early development of seedlings were used simplified culture media ($\frac{1}{2}$ CK and CK), composed of Calcinit and Kristalon fertilizers, and two different light sources (fluorescent and LED), while in micropropagation stage was used the CAC culture medium supplemented with 2 mg L⁻¹ of the cytokinins BAP, KIN, TOP and TDZ. The results showed that the LED + $\frac{1}{2}$ CK treatment exhibit the highest germination percentage (83%), and the LED lamps provided a better seedling development when compared to fluorescent; however, the light source do not interfere in the plant survival rate, which was 100% in both treatments after 30 days of acclimatization. For multiplication step, the medium containing BAP induced the formation of 4.3 shoots per explant inoculated, followed by TOP (3.1), KIN (2.5) and TDZ (0.9). However, the height of the shoots was inversely proportional to the number of shoots. Given the above, simplified culture media may be used for *in vitro* culture of mandacaru.

Keywords: Biotechnology. Cytokinins. Plant tissue culture. Mandacaru without thorn. Light quality.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Introdução de *Cereus jamacaru* ao cultivo *in vitro*: A) Planta adulta sem presença de espinhos; B) Fruto utilizado para retirada das sementes; C) Sementes após retirada da polpa e lavagem; D) Assepsia das sementes em câmara de fluxo laminar. Barra = 5 mm. 29

Figura 2 - Cultivo *in vitro* de *Cereus jamacaru*: A) Plantas germinadas após 40 dias de cultivo; B) Presença de bactérias provavelmente endofíticas no meio de cultura; C) Aspecto das plântulas cultivadas sob FL em meio ½ CK (esquerda) e CK (direita) após 80 dias de cultivo; D) Aspecto das plântulas cultivadas sob LED em meio ½ CK (esquerda) e CK (direita) após 80 dias de cultivo. E) Início da aclimatização das plântulas; F) Plântulas aclimatizadas aos 30 dias. Barra = 1 cm. 34

Figura 3 - Micropropagação de *Cereus jamacaru*: A) Explantes apresentando brotações (→) e calos (*) em meio suplementado com TOP; B) Brotações obtidas em meio suplementado com KIN; C) Brotações obtidas em meio suplementado com BAP; D) Formação de calos em meio suplementado com TDZ. Barra = 1 cm. 38

Gráfico 1 - Número médio de brotações formadas por explante inoculado na micropropagação de mandacaru (*Cereus jamacaru*), aos 40 dias de cultivo. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$). 39

Gráfico 2 - Altura média das brotações obtidas na micropropagação de mandacaru (*Cereus jamacaru*), aos 40 dias de cultivo. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$). 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição dos meios de cultura simplificados CK e CAC utilizados na germinação e multiplicação *in vitro* de mandacaru, respectivamente. 30

Tabela 2 – Percentual de germinação e contaminação de *Cereus jamacaru* aos 15, 30 e 40 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes meios de cultura e fontes de luz. 32

Tabela 3 – Efeito do meio de cultura e do tipo de luz fornecida no desenvolvimento da parte aérea e das raízes de plântulas de mandacaru (*Cereus jamacaru*) após 80 dias de cultivo *in vitro*, e após 30 dias de aclimatização. 36

Tabela 4 – Percentual de explantes responsivos e de resposta morfogênica encontrada após 40 dias de cultivo *in vitro* em meio de multiplicação com diferentes citocininas..... 37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIA	Ácido indolacético
ANA	Ácido naftalenoacético
BAP	6-benzilaminopurina
CAC	Meio de cultura simplificado para micropropagação
CK	Meio de cultura composto por Calcinit e Kristalon
CRP	Comprimento da raiz principal
FL	Fluorescente
JADS	Meio de cultura de Correia et al. (1995)
KIN	Cinetina
LED	Diodo emissor de luz
MFPA	Massa fresca da parte aérea
MFR	Massa fresca das raízes
MS	Meio de cultura Murashige e Skoog (1962)
MSPA	Massa seca da parte aérea
MSR	Massa seca das raízes
NPK	Fertilizante químico composto por Nitrogênio, Fósforo e Potássio
TDZ	Tidiazuron
TOP	Topolina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS.....	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
3.1	FAMÍLIA <i>CACTACEAE</i>	17
3.2	MANDACARU.....	18
3.3	CULTIVO <i>IN VITRO</i>	20
3.4	MEIO DE CULTURA.....	21
3.5	GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i>	23
3.6	EFEITOS DA LUZ NO CULTIVO <i>IN VITRO</i>	24
3.7	MICROPROPAGAÇÃO.....	25
3.8	ACLIAMATIZAÇÃO.....	26
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1	EXPERIMENTO I – GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>CEREUS JAMACARU</i>	28
4.2	EXPERIMENTO II – MICROPROPAGAÇÃO DE <i>CEREUS JAMACARU</i>	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1	EXPERIMENTO I – GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>CEREUS JAMACARU</i> ...	32
5.2	EXPERIMENTO II – MICROPROPAGAÇÃO DE <i>CEREUS JAMACARU</i>	37
6	CONCLUSÃO.....	41
	REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

A família Cactaceae está distribuída em todo o Brasil, que abriga o terceiro centro de diversidade de cactáceas, com mais de 230 espécies divididas em 34 gêneros, das quais 184 são endêmicas (SILVA et al., 2011). As cactáceas são muito apreciadas como plantas ornamentais e, no Brasil, diversas espécies são cultivadas com esta finalidade, incluindo o mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C.), planta típica da Caatinga, com importância para a sustentabilidade e conservação deste bioma. Seus frutos são consumidos por animais nativos da região e seus caules são utilizados pelos agricultores como forragem para os ruminantes (SILVA et al., 2005). O mandacaru sem espinho é uma cactácea muito procurada para uso ornamental e forrageiro, entretanto, poucas informações existem sobre tal espécie, evidenciando a importância do aumento do conhecimento sobre a sua biologia reprodutiva e propagação vegetativa (CORREIA et al., 2011).

Mudas de cactáceas podem ser produzidas via sementeira, estaquia, enxertia ou, ainda, por cultivo *in vitro* (PÉREZ-MOLPHE-BALCH et al., 2015). Este último pode ser definido como o cultivo em ambiente artificial, sob condições assépticas e controladas, de células vegetais isoladas, tecidos ou órgãos, que podem dar origem a plantas inteiras. Suas técnicas podem ser amplamente utilizadas para o estudo do metabolismo, fisiologia, desenvolvimento e propagação de plantas com propriedades desejáveis (LAKSHMANA et al., 2005; POLESI, 2010). Para as cactáceas, tal ferramenta biotecnológica vem sendo aplicada em estudos de germinação, multiplicação e conservação de diferentes espécies, incluindo aquelas nativas e adaptadas ao Semiárido brasileiro (SILVA; FERREIRA, 2016).

Diversos fatores podem influenciar no êxito do cultivo *in vitro*. O sucesso no estabelecimento da técnica depende, em geral, da seleção do explante, do meio de cultura e dos reguladores de crescimento utilizados, além da fonte de iluminação presente no ambiente de cultivo (GUPTA; JATOTHU, 2013). O meio de cultura fornece os nutrientes necessários para o crescimento e desenvolvimento dos tecidos vegetais, podendo conter diferentes formulações nutricionais, de acordo com os requerimentos de cada espécie (SILVA; FERREIRA, 2016). Os meios MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e JADS (CORREIA et al., 1995) são os mais utilizados no cultivo *in vitro* de cactáceas.

Alguns componentes do meio de cultura podem ser substituídos, a fim de torná-lo menos oneroso, reduzindo assim o custo final da muda obtida. Os meios simplificados, formulados à base de fertilizantes comerciais em substituição aos macro e micronutrientes normalmente empregados, vem sendo aplicados especialmente para espécies de orquídeas

(COLOMBO *et al.*, 2012; BERKA *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2016) e tem apresentado resultados similares ou superiores aos meios tradicionais. Adicionalmente, para induzir a multiplicação, são utilizados reguladores de crescimento, sobretudo o BAP (6-benzilaminopurina). No entanto, outras citocininas, isoladas ou combinadas com auxinas, têm proporcionado altas taxas de multiplicação, aliviado distúrbios fisiológicos e favorecido o enraizamento e a aclimatização das plantas micropropagadas (WERBROUCK, 2010; GUO *et al.*, 2011).

Considerando a importância do cultivo *in vitro* como ferramenta para a propagação das cactáceas, a fim de produzir plantas de qualidade para suprir a demanda do mercado e dos programas de conservação da biodiversidade, o objetivo deste estudo foi avaliar o uso de meios simplificados, bem como de citocininas e fontes de luz, em diferentes etapas do cultivo *in vitro* do mandacaru.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a germinação *in vitro*, o desenvolvimento inicial das plântulas e a micropropagação de *Cereus jamacaru* D.C., utilizando meios de cultura simplificados, diferentes reguladores de crescimento e fontes de luz.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o processo de germinação *in vitro* das sementes de mandacaru, assim como a ocorrência de contaminação;
- Estudar a influência do meio de cultura e da fonte de luz na germinação e no desenvolvimento inicial das plântulas, bem como na aclimatização das mesmas;
- Testar o uso de diferentes citocininas na multiplicação *in vitro* de mandacaru.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 FAMÍLIA CACTACEAE

A família Cactaceae é constituída de aproximadamente 124 gêneros e 1.440 espécies, que ocorrem quase exclusivamente no continente americano, com exceção da espécie *Rhipsalis baccifera*, a qual pode ser encontrada, também, na África, em Madagascar, e na Ásia, no Sri Lanka (SILVA et al., 2011). O México e o sul dos Estados Unidos são considerados o maior centro de diversidade genética de cactáceas, seguidos da região dos Andes, que inclui a Bolívia, a Argentina e o Peru. O Brasil abriga o terceiro centro de diversidade de cactáceas, com cerca de 34 gêneros e 230 espécies, das quais 184 são endêmicas (SILVA et al., 2011). Na região semiárida do Nordeste brasileiro ocorrem diversas cactáceas de grande importância para fauna e flora regional. Entre estas, destaca-se o mandacaru (*Cereus jamacaru* D.C.), o facheiro (*Pilosocereus pachycladus* Ritter), o xiquexique (*Pilosocereus gounellei* ((A. Webw. ex K. Schum.) Bly. Ex Rowl.)) e a coroa-de-frade (*Melocactus bahiensis* Britton & Rose) (CAVALCANTI; RESENDE, 2007).

No Brasil, as cactáceas contribuem substancialmente para a sustentabilidade do bioma Caatinga, principalmente como alternativa para o sertanejo e para a fauna local, já que os cactos, entre outras espécies, constituem a principal fonte de alimentos para os ruminantes nas épocas de secas prolongadas (CAVALCANTI; RESENDE, 2007). Além do potencial forrageiro e alimentício, as cactáceas destacam-se pelas características ornamentais, em função das variações de formas, tamanhos e flores (NOBEL, 2002). Mais de 300 espécies de cactos são cultivadas mundialmente como ornamentais e comercializadas em lojas, supermercados e viveiros (NASCIMENTO, 2011). Em decorrência do seu uso, as cactáceas são submetidas à exploração intensiva, e, como resultado, as populações dessas espécies têm sido drasticamente afetadas, de modo que muitas delas passaram a correr risco de extinção. Estudos de métodos de propagação das cactáceas constituem uma alternativa para a sua multiplicação, o que favorece a conservação e a redução do extrativismo (CORREIA et al., 2011). As cactáceas podem ser multiplicadas por sementes ou propagação vegetativa via estacas ou brotos. A reprodução *in vivo* ou *in vitro*, por meio da germinação de sementes, é uma alternativa à multiplicação das cactáceas, proporcionando manutenção da variabilidade genética e o aumento da disponibilidade de mudas tanto para os viveiristas e pecuaristas quanto para projetos que visem à conservação (CORREIA et al., 2011). RESENDE et al.

(2010) trabalharam com propagação *in vitro* de *Melocactus glaucescens*, demonstrando que a cultura de tecidos é uma boa alternativa para a propagação de cactos. A reprodução das plântulas *in vitro*, embora de custo mais elevado, permite o seu rápido desenvolvimento em comparação com as obtidas por germinação em viveiros ou nos sistemas naturais (DIAS et al., 2008).

3.2 MANDACARU

Dentre as espécies existentes na Caatinga, as representantes da família Cactaceae desenvolveram adaptações para sobreviver em ambientes áridos, que tem como principal fator limitante a água. Algumas destas plantas pertencem ao gênero *Cereus*, representado principalmente por *Cereus jamacaru* DC, conhecido popularmente como mandacaru; um cacto colunar que pode ou não apresentar espinhos (CORREIA et al., 2010).

O mandacaru é um arbusto grande ou arvoreta de 3 a 8 metros de altura, suculento, de caule multiarticulado em ramificações candelabriformes, distribuído em toda a Caatinga do Nordeste Brasileiro e do Vale do Rio São Francisco, ocorrendo em abundância em diferentes tipos de solos, bem como sobre afloramentos rochosos (BRITO et al., 2007). As folhas são substituídas pelos ramos articulados de cor verde, com espinhos nos vértices, que fazem o papel destas. As flores são solitárias, grandes (12-15 cm de comprimento), fixadas nos vértices dos ramos, apresentando cor branca e amarela, que se abrem a noite. Os frutos são bagas deiscentes carnosas de 10-12 cm de comprimento, com superfície glabra e cor vermelho-lilás, contendo muitas sementes pretas dispersas na polpa branca (LORENZI; MATOS, 2002). O mandacaru é uma cactácea típica da Caatinga, com importância para a sustentabilidade e conservação desse bioma. Seus frutos são consumidos por animais nativos da região, suas flores são visitadas por abelhas melíferas e seus caules são cortados e usados pelos agricultores como forragem para os ruminantes, uma alternativa nos períodos de seca prolongada (SILVA et al., 2005). Destaca-se ainda pelo seu potencial ornamental, medicinal e industrial (LUCENA et al., 2012), sendo também considerada uma planta símbolo do Nordeste brasileiro (ANDRADE, 1989). No processo de extração dos caules, os pecuaristas queimam os espinhos, pois estes dificultam o manejo e a utilização do mandacaru na alimentação dos animais (CAVALCANTI; RESENDE, 2006). Adicionalmente, a queima dos espinhos pode causar danos ao meio ambiente e é um desafio enfrentado pelo agricultor (CAVALCANTI; RESENDE, 2007), daí a importância de estudos envolvendo a variedade sem espinhos.

O desmatamento, o desenvolvimento agrícola e o pisoteio animal vem causando a fragmentação do habitat natural das cactáceas. Além disso, existe a coleta extrativista e ilegal de grandes quantidades de sementes e plantas para o abastecimento do mercado ornamental (SILVA et al., 2011). O mandacaru sem espinho é muito utilizado como planta ornamental e apresenta elevado potencial para a alimentação animal, em função do seu teor proteico em torno de 10,7% (CAVALCANTI; RESENDE, 2006), além da vantagem de não possuir espinhos, o que facilita o manejo e evita acidentes aos animais e ao homem. Entretanto, poucas informações existem sobre a origem desse material, evidenciando a importância do aumento do conhecimento sobre a biologia reprodutiva e a propagação vegetativa dessa espécie. Além das aplicações do mandacaru na forragicultura, existe também a possibilidade de sua utilização na alimentação humana, principalmente no uso de seus frutos que são bastante atrativos em cor e sabor. O uso de cactáceas na alimentação humana já é bastante difundido em alguns países, como México e Peru, onde os frutos e cladódios de cactos são considerados iguarias (NOBEL, 2002). Os frutos apresentam teores de proteínas em torno de 5%, que é o aceitável para uma alimentação humana saudável, e a planta apresenta níveis de proteínas brutas e fibras indicadas para a alimentação animal (BARBOSA *et al.*, 2007).

Apesar da importância ecológica e econômica das espécies tropicais e nativas como o mandacaru, são poucas as informações sobre os fatores envolvidos na sua germinação (LIMA et al., 2008). A inexistência de estudos básicos sobre a biologia dessa planta, no que se referem às suas formas de propagação, principalmente a sexuada, dificulta os estudos com essa espécie. Dessa maneira, torna-se relevante obter informações sobre: o comportamento germinativo das sementes, os fatores requeridos para iniciar a germinação, como luz e temperatura, bem como os componentes envolvidos na mobilização de suas reservas. Essas informações poderão também fornecer subsídios para o melhor conhecimento dos aspectos reprodutivos e ecológicos de plantas de regiões áridas e semiáridas, bem como subsídios taxonômicos para a identificação de novas espécies de cactáceas, particularmente aquelas do gênero *Cereus* (ALENCAR *et al.*, 2012).

3.3 CULTIVO *IN VITRO*

O cultivo *in vitro* é uma ferramenta biotecnológica em que células, tecidos, órgãos e/ou plantas inteiras são isolados de um organismo vegetal, desinfestados e cultivados de forma asséptica em um meio nutritivo, sob condições controladas de densidade de fluxo de fótons, fotoperíodo e temperatura (CARVALHO *et al.*, 2011). O êxito de sua aplicação

envolve diferentes fatores, tais como a composição do meio de cultura, o ambiente de cultivo e o genótipo estudado, dentre outros. O objetivo é obter nova planta idêntica à original, ou seja, realizar uma clonagem vegetal que é definida como uma propagação assexuada de células ou organismos de modo a obter um novo indivíduo, mantendo-se o genótipo idêntico àquele do ancestral comum (TORRES *et al.*, 2000; POLESI, 2011). Trata-se de uma área da biotecnologia que compreende vários métodos de propagação vegetal em laboratório, amplamente utilizada como ferramenta para o estudo do metabolismo, fisiologia, desenvolvimento e reprodução de plantas com propriedades desejáveis, tais como resistência a pragas e acúmulo de substâncias ativas de interesse comercial (POLESI, 2011).

A teoria da totipotencialidade formulada por Matthias Schleiden & Theodor Schwann, em 1838, pode ser dita que constitui um dos primeiros fundamentos da cultura *in vitro*; ela afirma que a célula é autônoma, portanto, contém o potencial necessário para originar um organismo completo; nesse caso, uma planta completa (BARRUETO CID, 2001). É claro que essa capacidade deve manifestar-se sob especiais condições de estímulo (TAMBARUSSI, 2009). Assim, espera-se que a exposição dos explantes a um ambiente *in vitro* estimule reações diversificadas nos diferentes tipos celulares, fazendo com que somente algumas células desse explante respondam às condições de cultura *in vitro*, levando à regeneração de um novo indivíduo. Haberlandt, um fisiólogo vegetal austro-húngaro, por volta de 1902, imbuído dessa teoria, foi o primeiro a manipular um sistema de cultura *in vitro* de plantas, procurando estabelecer e consolidar um sistema de micropropagação. Infelizmente, por limitações técnicas da época, seus esforços falharam. A partir de 1952, a cultura de tecidos de plantas se desenvolveu, com mais descobertas e aplicações (BARRUETO CID, 2001).

Atualmente, a cultura de tecidos constitui excelente ferramenta para clonagem de plantas em escala comercial, além de colaborar na realização de estudos de transformação genética e na conservação de espécies vegetais, resultando em plantas saudáveis, vigorosas e geneticamente superiores, que podem ser multiplicadas massivamente. Com a evolução da técnica na segunda metade do século passado, muitos avanços relacionados ao cultivo celular têm sido obtidos, desde a descoberta dos reguladores de crescimento, dos trabalhos pioneiros em melhoramento até a aplicação na engenharia genética e na transformação genética de plantas. Esses estudos têm maior enfoque na germinação e crescimento *in vitro*, micropropagação, organogênese, embriogênese, conservação e intercâmbio de germoplasma, diferenciação, mutagênese, hibridação, produção de metabólitos secundários, fusão de protoplastos, entre outros, demonstrando o potencial da técnica de cultivo *in vitro* para

inúmeras espécies e áreas de pesquisa, generalizando sua aplicação (QUISEN; ANGELO, 2008).

O cultivo *in vitro* de cactáceas vem sendo estudado há mais de 50 anos, especialmente no que se refere à micropropagação por ativação de aréolas (LEMA-RUMÍŃSKA; KULUS, 2014), além de trabalhos de germinação e conservação (CORREIA et al., 2011; SILVA et al., 2011). Para as distintas técnicas aplicadas são testadas diferentes formulações de meio de cultura, tipos e concentrações de reguladores de crescimento, tipos de explantes, formas de assepsia do material vegetal e condições de incubação (SILVA; FERREIRA, 2016). Contudo, ainda é necessário o desenvolvimento de estudos adicionais com a manipulação de outros fatores e o aperfeiçoamento dos protocolos, a fim de reduzir os custos de produção e o tempo demandado no processo.

3.4 MEIO DE CULTURA

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos vegetais fornecem as substâncias essenciais para o seu crescimento e desenvolvimento *in vitro*. As mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas *ex vitro*, são conservadas em material vegetal *in vitro*. Por isso, os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender as necessidades específicas *in vitro* (UNEMOTO et al., 2007). Não há meio de cultura específico adequado às exigências de gêneros, espécies e clones. Em geral, é difícil compreender o motivo pelo qual certas combinações de meio e condições de cultivo obtêm sucesso e outras fracassam (VENTURA et al., 2002).

Com isso, tem-se buscado alternativas quanto à composição dos meios nutritivos que se aproximem da composição do endosperma ou do saco embrionário e possibilitem o desenvolvimento dos embriões, independentemente do estágio em que se encontram. O meio de cultura adequado, tanto para propagação quanto para a cultura de embriões, deve ser adaptado para cada espécie. Embora diferentes meios sejam capazes de manter os microcultivos de embriões, o mais frequentemente utilizado é o MS, que se caracteriza pela sua elevada concentração em sais minerais (MURASHIGE; SKOOG, 1962; PEREIRA et al., 2006). Os meios de cultura podem ter seu custo reduzido pela simplificação dos mesmos (STANCATO et al., 2001). Uma maneira é produzir um meio de cultura através da utilização de fertilizantes químicos compostos por nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) e produtos

orgânicos como tomate, banana e água de coco. Estes componentes podem substituir os elementos químicos indicados nas tradicionais composições usadas universalmente para micropropagação (CAMPOS, 2002). A utilização de fertilizantes agrícolas é um potencial para diminuir custos de produção e aumentar a produtividade sem comprometer a qualidade nutricional da biomassa (PRIMO *et al.*, 2015), porém, com exceção de espécies de orquídeas (SU *et al.*, 2012), o uso de fertilizantes comerciais não é uma prática comum (CARVALHO *et al.*, 2013).

Estudos *in vitro* com orquídeas demonstram que a diminuição de custos é possível pela simplificação dos meios de cultura atuais, principalmente pelo emprego de fertilizantes como base de meios de cultura, visando à produção em larga escala (STANCATO *et al.*, 2001; DEZAN *et al.*, 2012). Nos estudos de Dezan *et al.* (2012), o meio à base do fertilizante Hyponex[®], para plântulas de *Schomburgkia gloriosa*, cultivadas em meio de cultura MS composto por metade da concentração de macro-nutrientes, apresentou resultado igual ao MS para número de raízes; o meio com Krystalon Laranja[®] obteve, juntamente com o meio MS, melhores valores para massa seca total. Bilce e Karsburg (2009) observaram que um maior número de plântulas de *Cattleya nobile* com 1 a 3 primórdios foliares e com primórdios radiculares foi obtido no meio com fertilizante B&G[®]. Os resultados de Primo *et al.* (2015) também indicam que os fertilizantes agrícolas são uma interessante fonte alternativa de nutrientes para o cultivo da microalga *Chlorella* sp. Já para a micropropagação da mandioca, Carvalho *et al.* (2013) concluíram que o meio de cultura mais eficiente é o MS suplementado com 12,5 mg L⁻¹ de fertilizante solúvel e adicionado de 0,01 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético, benzilaminopurina e ácido giberélico.

Os valores de custos dos componentes do meio de cultura podem ser elevados na produção de plântulas *in vitro* em larga escala, portanto o intuito da troca dos macro e micronutrientes do meio MS por fertilizantes é uma forma de economizar e facilitar a compra de reagentes para a produção do meio nutritivo, tornando-o mais simples e mais econômico (FERREIRA *et al.*, 2016). Para produção de 1 litro de meio nutritivo contendo os macro e micronutrientes de MS, se faz necessário um custo aproximado de R\$ 1,85, enquanto que a utilização dos fertilizantes (meio nutritivo simplificado) tem um custo de apenas R\$ 0,006, totalizando uma economia de 99% por litro de meio produzido (FERREIRA *et al.*, 2016).

3.5 GERMINAÇÃO *IN VITRO*

A germinação é uma etapa importante para iniciação da cultura *in vitro* de tecidos vegetais, sendo também uma estratégia promissora na obtenção de plantas em grande quantidade. Tanto as características intrínsecas quanto os fatores ambientais interferem nas respostas de germinação e desenvolvimento de diferentes espécies (KULKAMI et al., 2006).

A germinação *in vitro* é utilizada, principalmente, em espécies cujas taxas de germinação em condições naturais são insuficientes para a obtenção de material vegetal destinado a experimentação e/ou atendimento a demandas comerciais. A dormência de sementes é um fator que pode diminuir estas taxas, dificultando o estabelecimento de culturas *in vitro*. Além disso, existem plantas cujas sementes são desprovidas de endosperma, necessitando de associações com outros organismos para a nutrição inicial do embrião e prosseguimento da sucessão dos eventos metabólicos associados a germinação (COUTO et al., 2004). Muitas espécies de cactáceas apresentam crescimento lento e baixa germinação de sementes. Assim, considerando que a germinação *in vitro* de sementes de cactáceas é frequentemente elevada, em torno de 70-100%, esta técnica torna-se imprescindível, além de permitir maior uniformidade no processo germinativo (MEDEIROS et al., 2006; PÉREZ-MOLPHE-BALCH et al., 2015). A germinação *in vitro* comparada à germinação em condições naturais apresenta como vantagens: evitar problemas de aborto embrionário, reduzir o tempo necessário à ocorrência do processo, aumentar a taxa de germinação, além de sincronizá-la (RETES-PRUNEDA et al., 2007).

A germinação das sementes de mandacaru, como as de outras plantas tropicais, é incrementada quando expostas a temperaturas mais elevadas, como as de 25 e 35°C, sendo inibidas em temperaturas extremas como 15 e 35°C. As temperaturas de 25° e 30°C, associadas com a luz branca, correspondem às condições mais indicadas para os testes de germinação em laboratório com sementes de mandacaru (ALENCAR et al., 2012). Em estudo conduzido por Coelho et al. (2009), sementes de *C. jamacaru*, inoculadas e mantidas *in vitro* sob fotoperíodo de 12 horas com intensidade luminosa de 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, apresentaram 92,6% de germinação. Em outro estudo realizado por Socolowski et al. (2010), sementes de *Cereus perambucensis* germinaram acima de 95% sob luz contínua.

De acordo com a resposta à presença de luz, as sementes podem ser classificadas em fotoblásticas positivas, aquelas beneficiadas pela luz; fotoblásticas negativas, quando são prejudicadas pela luz e fotoblásticas neutras, aquelas que são insensíveis a presença de luz

(MARCOS FILHO, 2005). Alguns estudos com cactáceas têm mostrado uma relação entre o fotoblastismo e a forma de vida dessas plantas. As sementes dos cactos colunares se mostram indiferentes à luz, enquanto que as sementes dos cactos globosos são normalmente fotoblásticas positivas (ROJAS-ARÉCHIGA; VÁSQUEZ-YANES, 2000). No caso do mandacaru, estudo realizado por Meiado *et al.* (2010) permitiu constatar que esta espécie apresenta fotoblastismo positivo e que a qualidade da luz pode influenciar no tempo e no sincronismo da germinação.

3.6 EFEITOS DA LUZ NO CULTIVO *IN VITRO*

Em laboratórios de cultura de tecidos de plantas as salas de crescimento, geralmente, são equipadas com lâmpadas fluorescentes que emitem luz branca de similaridade espectral entre as bandas. A irradiância fornecida afeta o desenvolvimento das plantas, principalmente por meio de alterações fotomorfogênicas, alterações estas observadas, principalmente, na formação dos tecidos do mesofilo e na ineficiência do mecanismo de abertura e fechamento dos estômatos, afetando sua funcionalidade (REZENDE *et al.*, 2008). As salas de crescimento também representam um dos maiores custos na produção de mudas micropropagadas, tornando a técnica bastante onerosa. Nesse contexto, ressalta-se a importância de pesquisas relacionadas à busca de fontes de luz mais econômicas e que proporcionem melhor desenvolvimento das plantas sob condições *in vitro* (SCIVITTARO *et al.*, 2011).

Os diodos emissores de luz (LEDs) consistem na tecnologia mais moderna de iluminação existente no mercado. Desde a sua invenção em 1963, os LEDs têm sido constantemente aperfeiçoados, sendo de uso crescente em eletroeletrônicos, projetos arquitetônicos, centros cirúrgicos, televisores, semáforos, faróis de veículos, lanternas, controles remotos, aparelhos celulares, câmeras de segurança de uso noturno, etc (SCIVITTARO *et al.*, 2011). Nos últimos anos, seu uso estendeu-se para ambientes de cultivo de plantas micropropagadas (NHUT *et al.*, 2003). Os LEDs destacam-se das demais fontes de luz por possuírem alta eficiência no processo de geração de luz com baixa produção de calor, longo período de vida, comprimento de onda específico, massa e volume reduzidos (ROCHA *et al.*, 2010). O comprimento de onda gerado pelos LEDs está relacionado com a cor da luz que emitem, sendo os LEDs azuis, verdes e vermelhos os mais comuns no mercado. Esse conhecimento é importante, pois a eficiência fotossintética também depende do(s) comprimento(s) de onda emitido(s) (SCIVITTARO *et al.*, 2011).

Estudos da qualidade de luz na micropropagação ainda são escassos e também não são claros os efeitos do espectro e dos níveis de irradiância no crescimento de plântulas durante o cultivo *in vitro* (BRAGA et al., 2009). Alguns deles revelam que, com a variação na qualidade da luz, pode-se manipular o crescimento *in vitro* de diversas espécies, de maneira alternativa à adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura. A qualidade espectral afeta também estruturalmente a anatomia das folhas, parecendo exercer maiores efeitos durante a expansão foliar, exibindo alto grau de plasticidade tanto anatômico como fisiológico (DOUSSEAU et al., 2008). A qualidade da luz influencia ainda a germinação, inibição de alongamento do hipocótilo, expansão dos cotilédones e das folhas, biossíntese de pigmentos, alongamento do caule e indução ao florescimento (TAIZ; ZEIGER, 2013). A utilização dos LEDs na propagação *in vitro* foi avaliada nos cultivos de orquídea *Cymbidium* (HUAN; TANAKA, 2004), morango (ROCHA et al., 2010) e crisântemo (KIM et al., 2004), com resultados expressivos na qualidade da muda produzida e maior eficiência no processo produtivo. Alterações do número de estômatos nas folhas de crisântemo foram observadas com diferentes combinações de LED, o que levou à conclusão de que o ajuste e a escolha da fonte desse tipo de luz são importantes para o sistema de iluminação artificial durante o cultivo *in vitro* (KIM et al., 2004).

3.7 MICROPROPAGAÇÃO

Além dos aspectos do melhoramento genético de plantas, a cultura de tecidos vem sendo aplicada, de maneira mais prática e com maior impacto, na propagação vegetativa *in vitro* ou micropropagação, que é a multiplicação rápida de indivíduos vegetais. Essa rapidez deve-se, entre outros fatores, à possibilidade de obter elevado número de explantes a partir de uma planta matriz, e a velocidade da multiplicação é devida ao controle, tanto do meio como das condições ambientais nas quais se conduz a multiplicação (QUISEN; ANGELO, 2008). A micropropagação tem como principal objetivo a aceleração dos métodos convencionais de propagação vegetativa (DONATO et al. 2005). A micropropagação se tornou a saída para o cultivo de muitas plantas que possuem limitações na propagação sexuada, além da alta taxa de multiplicação e qualidade em comparação aos métodos tradicionais (LIMA; MORAES, 2006).

As principais vantagens das plantas propagadas *in vitro* (microplantas) são: a rapidez com que se obtém um grande número de mudas em instalações reduzidas e a obtenção de

plantas livres de doenças e pragas, o que reduz a dispersão de organismos fitoparasitas (LIMA; MORAES, 2006). Plantas micropropagadas, quando comparadas às plantas oriundas de propagação convencional, geralmente sobrevivem mais no campo, crescem mais rapidamente nos primeiros estádios de desenvolvimento, possuem maior precocidade, florescendo até quatro meses antes, além de apresentarem uniformidade de produção, proporcionando colheitas superiores (POLESI, 2011).

Embora existam protocolos variados de cultura de tecidos, faz-se necessário avaliar a qualidade do sistema comercial de micropropagação, uma vez que esta é influenciada por diversos fatores como taxa de multiplicação, altura das plantas, presença e intensidade de estiolamento, forma, coloração e tamanho das folhas, formação de calos, desenvolvimento de raízes, perdas por contaminação microbiana, oxidação e eficiência da aclimatização (LIMA; MORAES, 2006). Por essa razão, há um grande requerimento de cuidados que vão desde o estabelecimento destas plantas *in vitro* até a manutenção destas, durante os meses de desenvolvimento. Dessa forma, o aprimoramento constante dos processos de multiplicação e o controle de qualidade das mudas, aliado à redução de custos, têm sido essenciais para aceitação dessa técnica no mercado.

Os reguladores de crescimento são substâncias sintéticas que produzem efeitos semelhantes aos dos hormônios. Ao serem adicionados ao meio de cultura, em concentrações específicas, possuem papel essencial no crescimento e morfogênese durante o cultivo *in vitro* de plantas. As citocininas são um dos principais grupos de reguladores de crescimento usados na micropropagação, destacando-se por promover a quebra da dominância apical e divisão celular, potencializando a formação de brotações (MESSCHMIDT *et al.*, 2008). Dentre as mais utilizadas estão a 6-benzilaminopurina (BAP) e a Kinetina (KIN), contudo, outros tipos também estão sendo aplicados nos trabalhos de cultivo *in vitro* e vêm apresentando resultados satisfatórios, como o Tiazuron (TDZ) e as Topolinas (TOP) (GUO *et al.*, 2011; WERBROUCK, 2010). Normalmente, na micropropagação de cactáceas, as citocininas são utilizadas para quebrar a dormência das gemas laterais, já que a área meristemática é incluída no tecido das aréolas (OJEDA-ZACARÍAS *et al.*, 2012).

3.8 ACLIMATIZAÇÃO

O termo aclimatização nada mais é do que os processos que ocorrem para a passagem da planta que está *in vitro*, para o ambiente, ou seja, é a adaptação climática desta planta para

o novo ambiente, sendo este processo todo realizado artificialmente (GUERRA; NODARI, 2006). O processo de aclimatização deve ser realizado cuidadosamente, devido à diferença existente nas condições em que as plantas se encontravam *in vitro* em relação às condições do ambiente na casa de vegetação. A irradiância é bem maior e a umidade do ar é muito mais baixa quando comparadas às condições *in vitro*, sendo a perda de água o principal problema (XAVIER, 2010). Com a transferência das plantas para a casa de vegetação mudanças significativas ocorrem na anatomia e morfologia, principalmente as relacionadas com a epiderme, diferenciação do mesófilo, além do número e estrutura dos cloroplastos. Os estômatos mudam sua forma de circular para elípticos, entretanto, as mudanças mais importantes estão no desenvolvimento da cutícula, na formação de cera e na eficiência da regulação estomática da transpiração (XAVIER, 2010). Deve-se considerar também que elas possuem uma baixa capacidade fotossintética, devido às suas organelas fotossintéticas ainda não estarem bem desenvolvidas (GUERRA; NODARI, 2006).

Um fator importante na aclimatização de mudas é o substrato, devendo apresentar boa coesão entre as partículas e adequada aderência junto às raízes (CALVETE, 2000). Desta forma, a seleção do substrato é fundamental no crescimento e desenvolvimento das plantas micropropagadas, influenciando diretamente no sucesso da aclimatização. Tendo em vista a diversidade dos substratos e de suas características, torna-se difícil escolher o substrato ou a mistura, que atenda as condições para o ótimo crescimento e desenvolvimento das plantas na aclimatização (LIMA *et al.*, 2007).

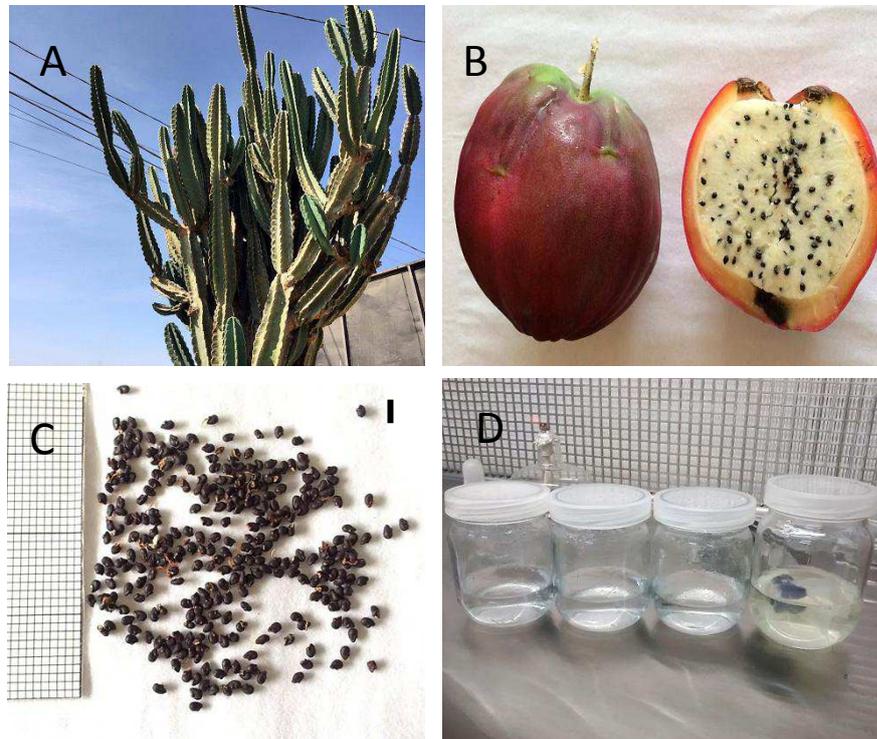
4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos, ambos realizados no Laboratório de Cultivo *in vitro* de Plantas (LaCIP), do Instituto Nacional do Semiárido (INSA), em Campina Grande, Paraíba. No primeiro, foi estudada a germinação *in vitro* do mandacaru, bem como o desenvolvimento inicial das plântulas e sua aclimatização, enquanto no segundo foi estudada a multiplicação desta espécie, a partir das plântulas obtidas no experimento I. A pesquisa ocorreu no período de maio a outubro de 2016, totalizando 180 dias de experimentos.

4.1 EXPERIMENTO I - GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE *CEREUS JAMACARU*

Frutos foram coletados de plantas sem espinhos (Figura 1A e B), mantidas na área da Estação Experimental do INSA. A extração das sementes foi realizada mediante a abertura dos frutos e retirada da polpa, a qual foi friccionada em uma peneira metálica sob água corrente até ser eliminada. As sementes (Figura 1C) foram, então, lavadas com detergente neutro e desinfestadas por imersão em álcool 70% durante um minuto e em hipoclorito de sódio (NaOCl 5%) adicionado de 0,5 mL de Tween 20, onde permaneceram sob agitação durante 15 minutos. Em câmara de fluxo laminar, procedeu-se o tríplice enxágue em água destilada estéril (Figura 1D) e a inoculação das sementes em meios de cultura simplificados, compostos por duas concentrações dos fertilizantes solúveis Calcinit e Kristalon (CK e ½ CK) (Tabela 1), adicionados de vitaminas, 100 mg L⁻¹ de inositol e 30 g L⁻¹ de sacarose. Os meios tiveram o pH ajustado para 5,8, foram gelificados com 6 g L⁻¹ de ágar, distribuídos em frascos e, em seguida, esterilizados em autoclave (120 °C e 1 atm, por 20 minutos).

Figura 1 - Introdução de *Cereus jamacaru* ao cultivo *in vitro*: (A) Planta adulta sem presença de espinhos; B) Fruto utilizado para retirada das sementes; C) Sementes após retirada da polpa e lavagem; D) Assepsia das sementes em câmara de fluxo laminar. Barra = 5 mm.



Fonte: Imagens do pesquisador.

Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 h de luz, temperatura de 25 ± 2 °C e expostos a duas diferentes fontes de luz: lâmpadas fluorescentes brancas (FL) e diodos emissores de luz brancos (LED), com intensidades luminosas de 47 e $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. Os percentuais de germinação e contaminação foram avaliados semanalmente durante 80 dias, sendo realizado um subcultivo para o mesmo meio aos 40 dias. Ao final do período de cultivo *in vitro* foram realizadas avaliações biométricas; para tanto, com o auxílio de uma régua milimetrada foram medidas a altura e o diâmetro do cladódio, e o comprimento da raiz principal, assim como a massa da matéria fresca, obtida em balança analítica, e a massa da matéria seca, obtida após a secagem em estufa (65 °C) e posterior pesagem, realizadas tanto para parte aérea quanto para a radicular

Parte das plântulas obtidas foi aclimatizada em casa de vegetação, em bandejas de polietileno contendo substrato Basaplant (Base®), com rega semanal, onde permaneceu por 30 dias para a verificação da taxa de sobrevivência.

Tabela 1 - Composição dos meios de cultura simplificados CK e CAC utilizados na germinação e multiplicação *in vitro* de mandacaru, respectivamente.

Componentes	Tipo de meio de cultura	
	CK (mg L ⁻¹)	CAC (mg L ⁻¹)
Macronutriente (mM)		
Nitrato de amônio - NH ₄ NO ₃	-	-
Nitrato de potássio - KNO ₃	-	1900
Fosfato monobásico de potássio - KH ₂ PO ₄	-	170
Sulfato de magnésio hepta-hidratado - MgSO ₄ . 7 H ₂ O	-	370
Cloreto de cálcio di-hidratado - CaCl ₂ . 2H ₂ O	-	440
Nitrato de cálcio tetra-hidratado - CaNO ₃ . 4H ₂ O	-	-
Micronutriente (uM)		
Sulfato de manganês tetra-hidratado - MnSO ₄ . 4H ₂ O	-	22,3
Ácido bórico - H ₃ BO ₃	-	6,2
Sulfato de zinco hepta-hidratado - ZnSO ₄ . 7H ₂ O	-	8,6
Iodeto de potássio - KI	-	0,83
Molibdato de sódio di-hidratado - Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	-	0,25
Sulfato de cobre penta-hidratado - CuSO ₄ . 5 H ₂ O	-	0,025
Cloridato de cobalto hexa-hidratado - CoCl ₂ . 6 H ₂ O	-	0,025
Fe.EDTA		
Na ₂ EDTA . 2H ₂ O	-	37,3
FeSO ₄ . 7H ₂ O	-	27,8
Composto orgânico		
Tiamina.HCl (vitamina B1)	0,1	0,1
Piridoxina.HCl (vitamina B6)	0,5	0,5
Ácido nicotínico (vitamina PP)	0,5	0,5
Glicina	2,0	2,0
Mio-inositol	100	100
Sacarose	30000	30000
Fertilizantes		
Calcinit*	840	2420
Kristalon**	742	-

* N - 15,5%; Ca - 19%

** N - 3%; P₂O₅ - 11%; K₂O - 32%; MgO - 4%; S - 11%; B - 0,025%; Mo - 0,004%; Cu-EDTA - 0,01%; Zn-EDTA - 0,025%; Fe-EDTA - 0,07%; Mn-EDTA - 0,04%

Fonte: Contruída com os dados da pesquisa.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 2, constando de dois meios de cultura (CK e ½ CK) x duas fontes de iluminação (FL e LED), totalizando quatro tratamentos. Foram utilizadas 10 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um frasco contendo 10 sementes. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando o programa SISVAR versão 5.3 (FERREIRA, 2011).

4.2 EXPERIMENTO II - MICROPROPAGAÇÃO DE *CEREUS JAMACARU*

Plântulas com tamanho superior a 2 cm, obtidas a partir da germinação *in vitro* (Experimento I), serviram como fonte de explantes para a fase de multiplicação. Após a quebra da dominância apical, o cladódio foi seccionado transversalmente em segmentos de 1 cm que foram cortados ao meio em sentido longitudinal. O explante foi, então, inoculado com a parte cortada em contato com o meio de cultura. Para a indução da formação de brotações foi utilizado o meio de cultura CAC (Tabela 1), contendo 2 mg L⁻¹ de uma das seguintes citocininas: 6-benzilaminopurina (BAP), kinetina (KIN), topolina (TOP) e tidiazuron (TDZ), totalizando quatro tratamentos.

Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 h de luz, temperatura de 25 ± 2 °C e intensidade luminosa de 50 μmol m² s⁻¹, provida por LEDs. Após 60 dias foi contabilizado o número de brotações formadas por explante inoculado e medida a altura das brotações.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com sete repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um frasco contendo dois explantes. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando o programa SISVAR versão 5.3 (FERREIRA, 2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXPERIMENTO I - GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE *CEREUS JAMACARU*

Os tratamentos utilizados propiciaram taxas de germinação acima de 72% aos 40 dias de cultivo *in vitro* (Tabela 2, Figura 2A), sendo o LED + ½ CK aquele que resultou em maior percentual de germinação, desde a primeira avaliação, seguido de FL + ½ CK. Tal resultado pode estar relacionado a uma maior disponibilidade de água no meio de cultura, devido a menor concentração de sais utilizada nestes tratamentos. Segundo Abreu (2008), embora as espécies de cactos habitem ambientes que possuem baixa disponibilidade hídrica, elas necessitam de maior quantidade de água para germinarem.

Tabela 2 - Percentual de germinação e contaminação de *Cereus jamacaru* aos 15, 30 e 40 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes meios de cultura e fontes de luz.

Tratamentos	Germinação (%)			Contaminação (%)		
	15	30	40	15	30	40
FL + ½ CK	59	70	76	4	18	29
FL + CK	66	72	74	6	6	7
LED + ½ CK	73	80	83	5	14	15
LED + CK	66	72	72	0	23	51

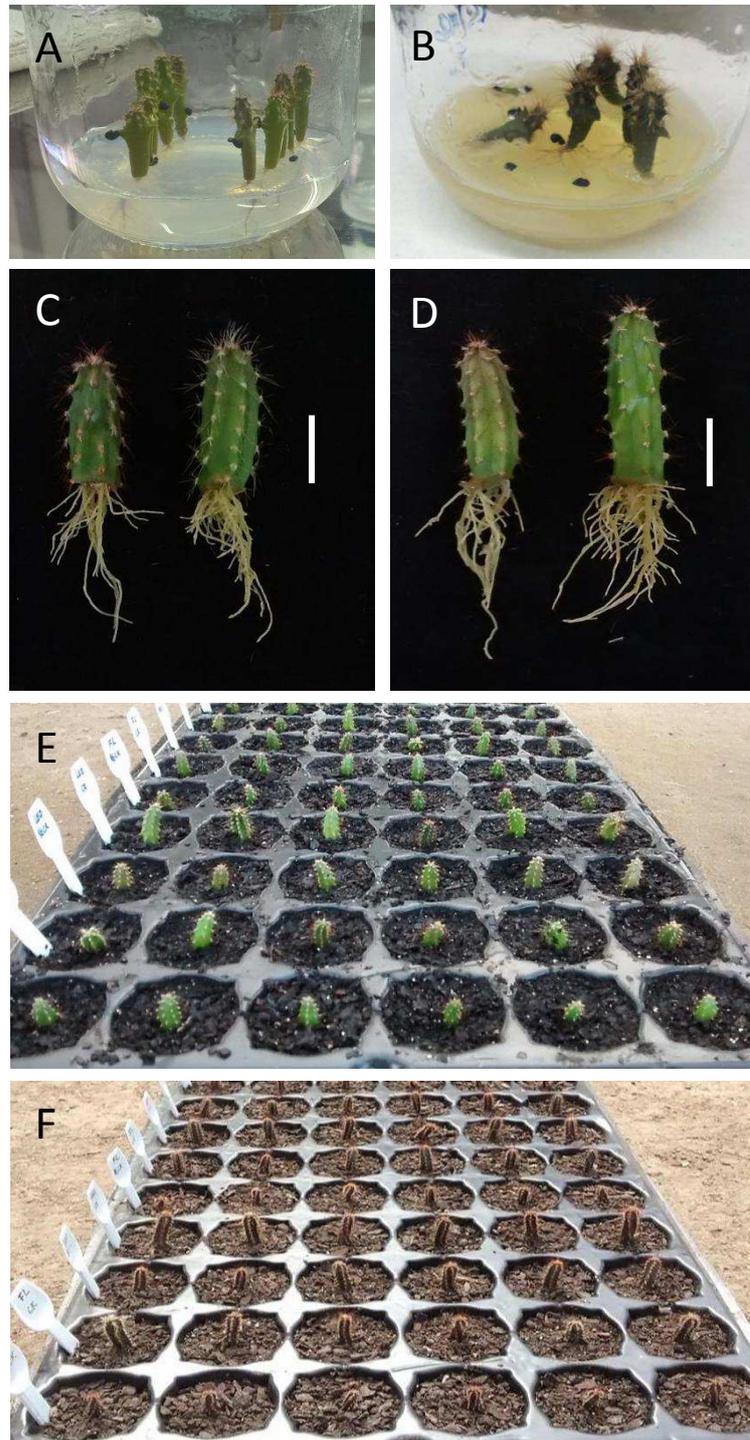
Fonte: Construída com os dados da pesquisa.

A utilização de meios de cultura com menor concentração iônica em relação ao meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) tem permitido elevadas taxas de germinação de sementes de mandacaru. Martínez et al. (2016) conseguiram taxa de germinação de 91,25% em meio CK e Correia et al. (2011) obtiveram 92,6% em meio JADS, enquanto Rêgo et al. (2009) obtiveram 60% de germinação com meio MS. Em alguns casos, o meio MS completo pode inibir ou retardar a germinação de sementes de espécies de cactos (LEMA-RUMÍNSKA; KULUS, 2014; PÉREZ-MOLPHE-BALCH et al., 2015). Neste sentido, o uso de meios

simplificados também é interessante do ponto de vista da redução dos custos de produção de mudas obtidas via cultura de tecidos. Segundo Ferreira et al. (2016), a substituição do meio MS por aqueles obtidos a partir de fertilizantes agrícolas, como é o caso do $\frac{1}{2}$ CK e CK utilizados neste trabalho, permite uma economia de 99% por litro de meio de cultura.

C. jamacaru é uma espécie que apresenta fotoblastismo positivo, no entanto, ao estudar o efeito da qualidade da luz, Meiado et al. (2010) verificaram que tal fator não interferiu na germinabilidade desta espécie, mas favoreceu o tempo médio e a sincronização da germinação natural, especialmente com o uso da luz fluorescente branca em relação as cores vermelho, vermelho-distante e azul. Alencar et al. (2012), estudando a combinação dos fatores luz e temperatura na germinação do mandacaru, também relataram que a qualidade da luz (fluorescente branca e vermelha) não interferiu na taxa de germinação, contrariamente a temperatura. Estudos relacionados à germinação de cactáceas frente ao espectro emitido por lâmpadas de LED não foram encontrados, contudo, resultados positivos têm sido relatados para diferentes espécies cultivadas *in vitro* (GUPTA; JATOTHU, 2013).

Figura 2 - Cultivo *in vitro* de *Cereus jamacaru*: A) Plantas germinadas após 40 dias de cultivo; B) Presença de bactérias provavelmente endofíticas no meio de cultura; C) Aspecto das plântulas cultivadas sob FL em meio $\frac{1}{2}$ CK (esquerda) e CK (direita) após 80 dias de cultivo; D) Aspecto das plântulas cultivadas sob LED em meio $\frac{1}{2}$ CK (esquerda) e CK (direita) após 80 dias de cultivo; E) Início da aclimatização das plântulas; F) Plântulas aclimatizadas aos 30 dias. Barra = 1 cm.



Fonte: Imagens do pesquisador.

Quanto à contaminação, o maior percentual observado foi no tratamento LED + CK, onde pouco mais da metade das sementes inoculadas apresentou contaminação bacteriana até os 40 dias de cultivo *in vitro* (Tabela 2, Figura 2B). Ressalta-se que em todos os tratamentos, a contaminação foi decorrente de bactérias, provavelmente endofíticas, não interferindo na germinação das sementes. Lima et al. (2015) identificaram a presença de uma colonização natural de bactérias endofíticas em microplantas de *C. jamacaru* cultivadas *in vitro* em meio JADS, e afirmaram que tais microrganismos não exibem efeitos adversos sobre a espécie.

O percentual de hipoclorito de sódio utilizado (5%) foi eficiente na remoção de possíveis contaminantes fúngicos e não ocasionou fitotoxicidade, contrariamente ao relatado por Rêgo et al. (2009) que, ao utilizarem hipoclorito de sódio 2%, obtiveram 60% de contaminação e redução da taxa de germinação para esta mesma espécie. Já Martínez et al. (2016), observaram que o uso de desinfestantes em concentração mais baixa (1,25%) não foi eficiente para eliminar os contaminantes superficiais (exógenos) presentes nas sementes de mandacaru, enquanto o hipoclorito de sódio 2,5% apresentou percentual de contaminação de 20%, também decorrente de bactérias endofíticas. A ação do hipoclorito de sódio se dá pela entrada na parede celular do microrganismo (fungo ou bactéria), causando alterações no metabolismo celular e morte do agente infestante (ESTRELA et al., 2002).

De modo geral, as plântulas expostas à ação das lâmpadas LED, para os dois tipos de meio de cultura utilizados, especialmente o CK, apresentaram maior altura e massa fresca da parte aérea (Tabela 3, Figura 2C e D). Estrada et al. (2016) estudando o cultivo *in vitro* de *Anthurium andreanum*, obtiveram maior altura da parte aérea para as plantas expostas aos LEDs brancos em relação a FL. De acordo com Rocha et al. (2010), a menor eficiência no crescimento das plantas na presença de lâmpadas fluorescentes decorre do fato destas emitirem diferentes comprimentos de onda entre 350 e 750 nm, enquanto somente aqueles entre 400 e 700 nm são considerados importantes para a fotossíntese e fotomorfogênese. Este é um fator relevante, uma vez que um cladódio melhor desenvolvido pode favorecer a sobrevivência da planta caso esta venha a ser aclimatizada, bem como possibilitar a extração de um maior número de explantes, caso a planta obtida seja utilizada como matriz para a fase de multiplicação *in vitro*.

Tabela 3 - Efeito do meio de cultura e do tipo de luz fornecida no desenvolvimento da parte aérea e das raízes de plântulas de mandacaru (*Cereus jamacaru*) após 80 dias de cultivo *in vitro*, e após 30 dias de aclimatização.

Variáveis	FL		LED	
	1/2 CK	CK	1/2 CK	CK
Altura (cm)	1,66 bA	1,76 bA	1,96 aB	2,34 aA
Diâmetro (cm)	0,64 aA	0,58 bA	0,60 aA	0,70 aA
CRP (cm)	2,47 aA	1,75 aB	2,65 aA	2,27 aA
MFPA (g)	0,29 bA	0,37 bA	0,43 aB	0,55 aA
MFR (g)	0,022 bB	0,038 bA	0,035 aB	0,053 aA
MSPA (g)	0,009 aA	0,012 bA	0,011 aB	0,017 aA
MSR (g)	0,002 aA	0,002 bA	0,002 aB	0,004 aA
Sobrevivência (%)	100	100	100	100

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas para fonte de luz e maiúsculas para meio de cultura, diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Comprimento da raiz principal (CRP), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca das raízes (MFR), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca das raízes (MSR).

Quanto ao diâmetro dos cladódios, não houve diferença entre os tratamentos; contudo, os fatores estudados interferiram no desenvolvimento radicular (Tabela 3). Para o comprimento da raiz principal e massa fresca da raiz, valores inferiores foram encontrados em plantas cultivadas em FL + CK e FL + 1/2 CK, respectivamente, podendo-se inferir que o tipo de luz utilizada interferiu mais no desenvolvimento das raízes do que o meio de cultura. Berka et al. (2014) também não observaram influência do meio no comprimento médio de raízes de plântulas de orquídeas cultivadas *in vitro* com o fertilizante Kristalon ou com 1/2 MS. Para a massa seca da parte aérea e radicular, melhores resultados foram encontrados em LED + CK, demonstrando o efeito da qualidade da luz e da disponibilidade de nutrientes no acúmulo de massa seca em plantas cultivadas *in vitro*. Resultado semelhante foi obtido por Assis (2015) que concluiu que houve um aumento no acúmulo de biomassa em plantas de *Solidago canadensis* cultivadas sob iluminação com lâmpadas de LED. Castro et al. (2005), estudando o desenvolvimento *in vitro* de mandacaru, obtiveram melhores resultados para altura, massa fresca e seca da parte aérea utilizando o meio MS adicionado de ácido naftalenacético (ANA - 0,01 mg L⁻¹), contudo, para a massa fresca e seca das raízes não houve diferença estatística, apesar do uso da auxina. Os resultados obtidos deixam evidentes que a qualidade da luz interfere de modo positivo no crescimento e desenvolvimento de *C. jamacaru*, e até de forma mais evidente do que a composição nutricional do meio de cultura.

Posteriormente, as plantas obtidas foram levadas ao ambiente *ex vitro* para a etapa de aclimatização (Figura 2E) e, nesta fase, foi possível observar taxa de sobrevivência de 100%, após 30 dias (Figura 2F), para as plantas provenientes de todos os tratamentos utilizados *in vitro*. A aclimatização é a etapa mais crítica do cultivo *in vitro* e pode comprometer a produção das mudas de algumas espécies, uma vez que as plantas são expostas a mudanças drásticas no que se refere às condições ambientais, sendo a perda de água um dos principais problemas (ROCHA et al., 2008). No entanto, a aclimatização de diferentes espécies de cactáceas tem sido realizada com êxito, obtendo-se taxa de sobrevivência, geralmente, entre 80 e 100% (LEMA-RUMIŃSKA; KULUS, 2014; SOUZA et al., 2015). De acordo com Malda et al. (1999), a suculência do caule dos cactos representa um atributo positivo que minimiza o estresse ocasionado na planta durante esta etapa.

5.2 EXPERIMENTO II - MICROPROPAGAÇÃO DE *CEREUS JAMACARU*

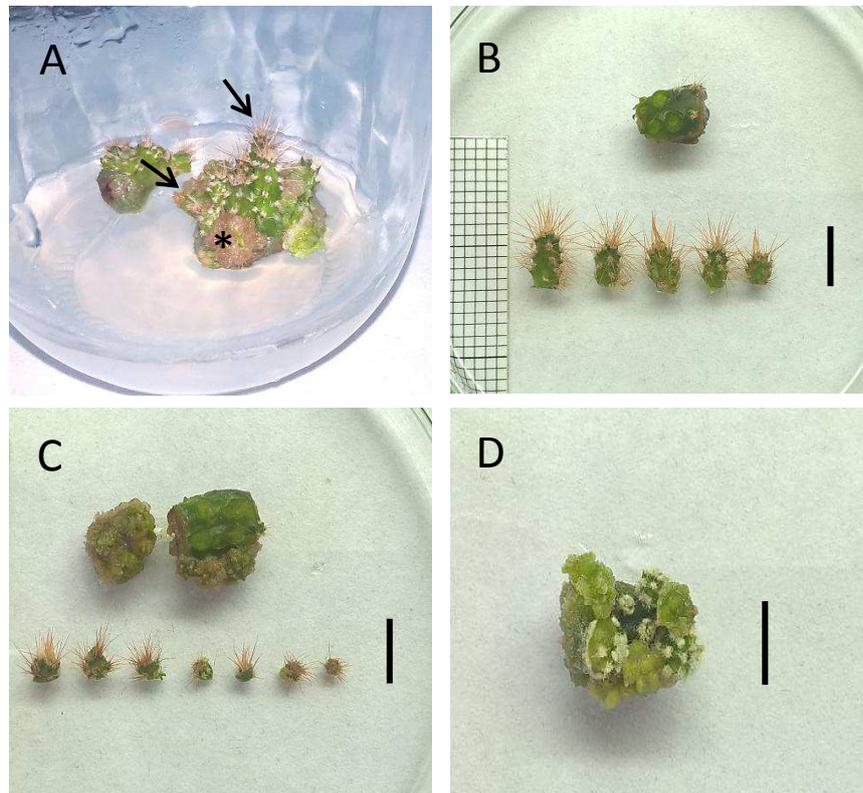
A adição de BAP, TOP e KIN propiciou resposta morfogênica em 100% dos explantes inoculados, enquanto para o TDZ tal percentual foi de apenas 35,71% (Tabela 4). O tipo de resposta morfogênica também variou conforme a citocinina utilizada (Tabela 4, Figura 3), sendo observados explantes que formaram apenas brotações (KIN), explantes que formaram apenas brotações ou brotações e calos (BAP) e outros que formaram apenas calos, apenas brotações ou ambos num mesmo explante (TOP e TDZ). As respostas morfogênicas induzidas em células e tecidos cultivados *in vitro* podem variar consideravelmente de acordo com diferentes fatores, incluindo o genótipo, o tipo de explante utilizado, o meio de cultura, e especialmente o tipo e a concentração dos reguladores de crescimento (SOUZA; PEREIRA, 2007).

Tabela 4 - Percentual de explantes responsivos e de resposta morfogênica encontrada após 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de multiplicação com diferentes citocininas.

Tratamentos	Explantes responsivos (%)	Resposta Morfogênica		
		Explantes que formaram calos (%)	Explantes que formaram brotos (%)	Explantes que formaram calos e brotos (%)
BAP	100,00	0	42,85	57,14
TOP	100,00	21,42	64,28	14,28
KIN	100,00	0	100	0
TDZ	35,71	14,28	14,28	7,14

Fonte: Construída com os dados da pesquisa.

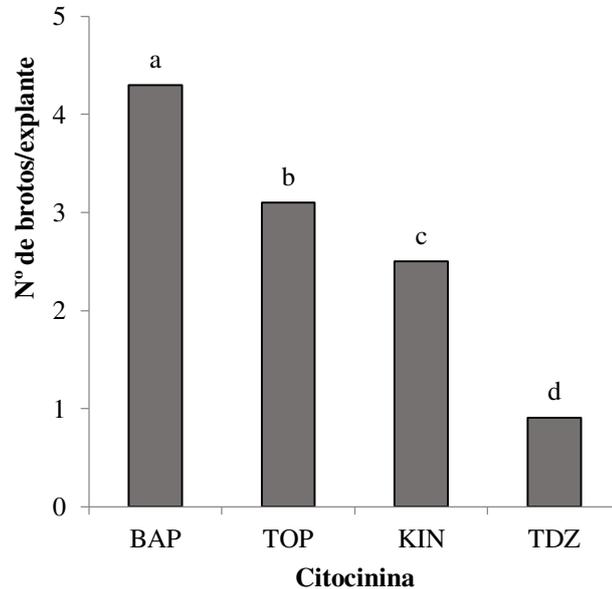
Figura 3 - Micropropagação de *Cereus jamacaru*: A) Explantes apresentando brotações (→) e calos (*) em meio suplementado com TOP; B) Brotações obtidas em meio suplementado com KIN; C) Brotações obtidas em meio suplementado com BAP; D) Formação de calos em meio suplementado com TDZ. Barra = 1 cm.



Fonte: Imagens captadas pelo pesquisador.

Neste trabalho, a formação das brotações em todos os tratamentos utilizados foi obtida diretamente pela ativação de gemas axilares, também chamada de ativação de aréolas, que é a técnica mais aplicada para a multiplicação de cactáceas (SILVA; FERREIRA, 2016), uma vez que reduz a ocorrência de variação somaclonal, quando comparada ao cultivo de calos (morfogênese indireta) (PÉREZ-MOLPHE-BALCH *et al.*, 2015). Os resultados referentes ao número de brotos formados por explante inoculado indicaram diferença significativa entre os tratamentos estudados, sendo BAP o melhor, seguido de TOP, com médias de 4,3 e 3,1, respectivamente (Gráfico 1). Resultados inferiores ao desse estudo foram obtidos por Correia *et al.* (2009), que estudaram os efeitos da concentração de BAP adicionado ao meio JADS na formação de brotos de mandacaru, após 60 dias de cultivo *in vitro*, e observaram que para a concentração de 1 mg L⁻¹ ocorreu a formação de apenas 1,23 brotos/explante.

Gráfico 1 - Número médio de brotações formadas por explante inoculado na micropropagação de mandacaru (*Cereus jamacaru*), aos 40 dias de cultivo. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).



Fonte: Construído com os dados da pesquisa.

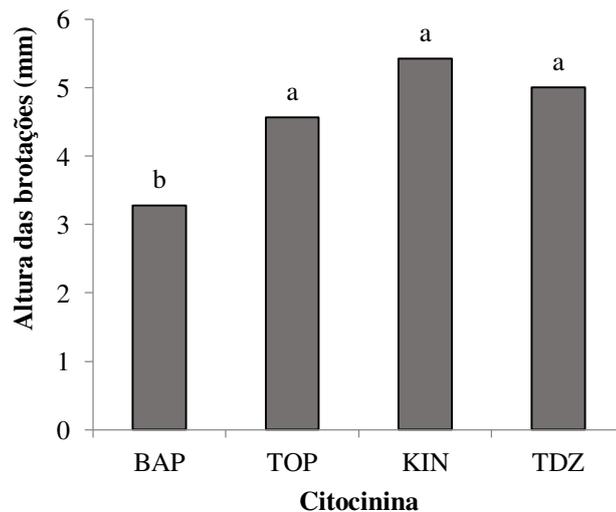
O uso da citocinina, combinada ou não com baixos níveis de auxinas, é indispensável na fase de multiplicação das cactáceas, uma vez que este regulador é responsável pela quebra da dominância apical e pela indução da proliferação das gemas axilares (SILVA; FERREIRA, 2016). Monostori et al. (2012) conseguiram a formação de 3,8 brotos/explante de mandacaru em meio MS suplementado com 2 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético), valores inferiores ao do presente estudo. Tal resultado demonstra que o uso da auxina para esta espécie pode ser dispensável e que o meio simplificado CAC pode ser utilizado em substituição ao MS.

Outros autores também conseguiram induzir a formação de brotações em diferentes espécies de cactáceas, utilizando a combinação de citocinina e auxina. Langer e Mergener (2013) obtiveram em média 2,5 brotações de *Cereus hildmannianus* após 80 dias de cultivo em meio MS adicionado de BAP e AIA. Já Ojeda-Zacarías et al. (2012) utilizaram apenas KIN em meio MS para a multiplicação de *Hylocereus undatus*.

Em relação à altura dos explantes, melhores resultados foram obtidos nos tratamentos adicionados de KIN, TDZ e TOP (Gráfico 2). As citocininas são uma classe de fitorreguladores que incrementam o crescimento e o desenvolvimento vegetal, estimulando a divisão das células (DARIO et al., 2005); contudo, também podem vir a ocasionar o

encurtamento das brotações, sendo tal comportamento, geralmente, associado ao uso do BAP. A inibição do alongamento das brotações *C. jamacaru* pelo uso de BAP foi demonstrada por Oliveira *et al.* (2008), confirmando os resultados encontrados no presente trabalho.

Gráfico 2 - Altura média das brotações obtidas na micropropagação de mandacaru (*Cereus jamacaru*), aos 40 dias de cultivo. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).



Fonte: Construído com os dados da pesquisa

Santos *et al.* (2012), estudando a micropropagação de *Cereus albicaulis*, relataram a existência de uma correlação negativa entre a concentração de BAP e o comprimento dos brotos formados, demonstrando que menores concentrações desta citocinina foram favoráveis ao alongamento da parte aérea; resultados que também estão de acordo com os obtidos por Fontes (2014) para a palma forrageira, variedade Orelha de Elefante Mexicana. Diante o exposto, é possível inferir que existe uma relação antagônica entre o número e o comprimento médio dos brotos, sendo que brotações maiores não requerem a fase de alongamento, reduzindo assim os custos de produção e o tempo para as mudas serem levadas à fase final de aclimatização.

6 CONCLUSÃO

Todos os tratamentos utilizados apresentaram taxas de germinação acima de 70%, sendo o LED + ½ CK o mais adequado para germinação *in vitro* de mandacaru, devido ao maior percentual de sementes germinadas e menor percentual de contaminação.

As lâmpadas de LED propiciaram melhores resultados para o desenvolvimento inicial de plântulas de mandacaru após 80 dias de cultivo *in vitro*, contudo, o percentual de sobrevivência das plantas após 30 dias de aclimatização não foi influenciado por este fator (fonte de luz).

O meio simplificado CAC pode ser utilizado em substituição ao MS na micropropagação *in vitro* de mandacaru. Todos os reguladores de crescimento utilizados induziram respostas morfogênicas, sendo BAP o que proporcionou a formação de um maior número de brotações, porém, com menor altura.

REFERÊNCIAS

- ABREU, D.D.S. **Germinação e morfo-anatomia do desenvolvimento em *Melocactus ernestii* Vaupel e *M. paucispinus* Heimen & R.J. Paul (Cactaceae)**. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. 126p.
- ALENCAR, N.L.M.; GOMES-FIHO, E.; INNECCO, R. *Cereus jamacaru* seed germination and initial seedling establishment as a function of light and temperature conditions. **Scientia Agricola**. v.69, n.1, p.70-74. 2012.
- ANDRADE, L.D. **Plantas da Caatinga**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1989. p.110-115.
- ASSIS, T.R. **Uso de lâmpadas de diodo emissor de luz 'LED' no controle do florescimento em plantas de Tango (*Solidago canadensis* L.) e Hipérico (*Hypericum inodorum*)**. Viçosa, 2015. 62p.
- BARBOSA, A.S. et al. **Avaliação da composição química do mandacaru advindo da caatinga semi-árida paraibana**. In: Resumos do Congresso Norte-Nordeste de Química. Natal, 2007. 2p.
- BARRUETO CID, L.P. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? **Biociência, Ciência & Desenvolvimento**, v.3, n.19, p.16-21, 2001.
- BERKA, M.G.; VENTURIERI, G.A.; TEIXEIRA, T.N. Development of *Cattleya amethystoglossa x nobilior* - orchidaceae in simplified culture media. **Acta Scientiarum**, v.36, n.4, p.425-428, 2014.
- BILCE, T.; KARSBURG, I.V. Germinação *in vitro* de sementes de *Cattleya nobile* em meio de cultura alternativo. **II Jornada Científica**. Barra do Bugres: 2009. 4p.
- BRAGA, F.T. et al. Qualidade de luz no cultivo *in vitro* de *Dendranthema grandiflorum* cv. rage: características morfofisiológicas. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, n.2, p.502-508, 2009.
- BRITO, A.E.R.M. et al. **Vegetação Costeira do Nordeste Semiárido - Guia Ilustrado**. Fortaleza: UFC Edições, 2007, 274p.
- CALVETE, E.O. **Efeito do substrato na aclimatização *ex vitro* de morangueiro cv. Campinas, *Fragaria x ananassa* Duch.** In: KÄMPF, A.N.; FERMINO, M.H. (Ed.). Substrato para plantas - a base da produção vegetal em recipientes. Porto Alegre: Genesis, p.257-264, 2000.
- CAMPOS, D.M. **Orquídeas: manual prático de cultura**. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 2002. 143p.
- CARVALHO, M.J.S. et al. **Influência do meio de cultura e de um Fertilizante solúvel na micropropagação da Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. XV Congresso Brasileiro de Mandioca, Bahia, 2013. 5p.

CARVALHO, A.C.P.P. et al. Glossário de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.7, p.30-60, 2011.

CASTRO, P. G.; Efeitos do AIB sobre o desenvolvimento *in vitro* de mandacaru (*Cereus jamacaru*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTASORNAMENTAIS, 2005, Fortaleza. Anais..., **Horticultura brasileira**, v.23, p. 658, 2005.

CAVALCANTI, N.B.; RESENDE, G.M. Efeito de diferentes substratos no desenvolvimento de mandacaru (*Cereus jamacaru* P. DC.), facheiro (*Pilosocereus pachycladus* Ritter), xiquexique (*Pilosocereus gounellei* (A. Webw. ex K. Schum.) Bly. ex Rowl.) e coroa-de-frade (*Melocactus bahiensis* Britton & Rose). **Revista Caatinga**, v.20, n.1, p.28-35, 2007.

CAVALCANTI, N.B.; RESENDE, G.M. Consumo do mandacaru (*Cereus jamacaru* P. DC.) por caprinos na época da seca no semiárido de Pernambuco. **Revista Caatinga**, v.19, p.402-408, 2006.

COELHO, P.J.A. et al. Obtenção de plantas de espécies da Caatinga com potencial ornamental, obtida por germinação *in vitro*. In: IV Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos, 2009, Aracaju. **Anais...Aracaju, Sergipe**, 2009.

COLOMBO, R.C.; FAVETTA, V.; FARIA, R.T.de. Fertilizantes comerciais e polpa de banana no cultivo *in vitro* de um híbrido de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). **Revista Ceres**, v.59, n.6, Viçosa. 2012.

CORREIA, D. et al. **Germinação de sementes de cactáceas *in vitro*** (Comunicado Técnico 181). Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011. 6p.

CORREIA, D. et al.; **Introdução e multiplicação de Mandacaru sem espinho**. In: Anais do Congresso brasileiro de recursos genéticos, 2010, Salvador. Resumos... Salvador, p.164. 2010.

CORREIA, D. et al. Efeito do tipo de explante e de citocinina na formação de brotos de mandacaru *in vitro* a partir de material juvenil. In: **Congresso Brasileiro de Palma e outras Cactáceas**, Campina Grande, 2009. 3p.

CORREIA, D. et al. 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**, n.48/49, p.107-116, 1995.

COUTO, J.M.F. et al. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, v.28, n.5, p.633-642, 2004.

DARIO, G.J.A. et al. A influência do uso de fitorregulador no crescimento da soja. **Revista da FZVA**, v.12, n.1, p.63-70. 2005.

DEZAN, L.F. et al. Crescimento *in vitro* de *Schomburgkia gloriosa* Lindl. em meio de cultivo simplificado. **Idesia**, v.30, n.2, p.53-58, 2012.

- 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.
- DONATO, V.M.T.S. et al. Plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com antibióticos. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, p.134-141. 2005.
- DOUSSEAU, S. et al. Anatomia foliar de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. (Bignoniaceae) propagadas *in vitro*, *in vivo* e durante a aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.6, p.1694-1700, 2008.
- ESTRADA, E.M. et al. Light emitting diodes improve *in vitro* shoot multiplication and growth of *Anthurium andreanum* lind. **Propagation of Ornamental Plants**, v.16, n.1, p.3-8, 2016.
- ESTRELA, C.; ESTRELA, C.R.A.; BARBIN, E.L. Mechanism of action of Sodium Hypochlorite. **Braz. Dent. J.**, v.13, n.13, p.113-117, 2002.
- FERREIRA, D.F.S. A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.
- FERREIRA, L.T. et al. Germinação *in vitro* de *Gongora* (Orquidaceae) em meios nutritivos simplificados. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.12, n.1, p.20-26, 2016.
- FONTES, J.G. **Micropropagação e enraizamento de genótipos de palma forrageira resistentes à cochonilha-do-carmim**. Monografia. Sumé, 2014. 57 f.
- GUERRA, M.P; NODARI, R.O. **Introdução ao conceito da biotecnologia**. Florianópolis, 2006. 40p.
- GUO, B. et al. Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.45, p.8984-9000, 2011.
- GUPTA, S.D.; JATOTHU, B. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. **Plant Biotechnol Rep.**, v.7, p.211-220, 2013.
- HUAN, L.V.T.; TANAKA, M. Effects of red and blue light-emitting diodes on callus induction, callus proliferation, and protocorm-like body formation from callus in *Cymbidium* orchid. **Environment Control in Biology**, v.42, p.57-64, 2004.
- KIM, S.J. et al. Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.101, p.143-151, 2004.
- KULKAMI, M.G.; SPARG, S.G.; STADEN, J.V. Dark conditioning, cold stratification and a smoke-derived compound enhance the germination of *Eucomis autumnalis* sbsp. *autumnalis* seeds. **South African Journal of Botany**, v.72, n.1, p.157-162, 2006.
- LAKSHMANAN, P. et al. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In vitro cellular and Developmental Biology – Plant**, v.41, p.345-363, 2005.

- LANGER, D.F; MERGENER, R.A. Cultivo *in vitro* de *Cereus hildmannianus* k. shum. **Unoesc & Ciência - ACBS**, v.4, n.1, p.7-14, 2013.
- LEMA-RUMINSKA, J.; KULUS, D. Micropropagation of Cacti – A Review. **Haseltonia**, v.17, p.46-63, 2014.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A.M. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: São Paulo, 2002. 512p.
- LUCENA, C.M.D. et al. Conhecimento local sobre cactáceas em comunidades rurais na mesorregião do sertão da Paraíba (Nordeste, Brasil). **Biotemas**, v.25, n.3, p.281- 291, 2012.
- LIMA, C.S.M. et al. Substratos para Aclimatização de Plantas Micropropagadas de *Mentha viridis* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.2, p.672-674, 2007.
- LIMA, R.B.S. Primary metabolite mobilization during germination in rosewood (*Aniba rosaedora* Ducke) seeds. **Revista Árvore**, v.32, n.1, p.19-25, 2008.
- LIMA, J.D.; MORAES, W.S. Concentração de benzilaminopurina e avaliação de protocolo para multiplicação *in vitro* de genótipos de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.36, p.13-19, 2006.
- LIMA, J.V.L. et al. Endophytic bacteria in cacti native to a Brazilian semi-arid region. **Plant Soil**, v.389, p.25-33, 2015.
- MALDA, G.; SUZAN, H.; BACKHAUS, R. *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. **Scientia Horticulturae**, v.81, p.71-87, 1999.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.
- MARTÍNEZ, M.H.P. et al. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de Mandacaru sem espinho. In: CONAPESC, 2016, Campina Grande. **Anais I CONAPESC**, Editora Realize, v.1, Campina Grande, 2016. 5p.
- MESSCHMIDT, A.A. et al. Efeito de citocinina na micropropagação de *Mentha x gracilis* Sole. **IX salão de Iniciação Científica**. Porto Alegre, 2008. 3p.
- MEDEIROS, L.A. et al. *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.84. p.165-169, 2006.
- MEIADO, M.V. et al. Seed germination responses of *Cereus jamacaru* DC. ssp. *jamacaru* (Cactaceae) to environmental factors. **Plant Species Biology**. v.25, p.120-128, 2010.
- MONOSTORI, T.; TANÁCS, L.; MILA, L. Studies on *In Vitro* Propagation Methods in Cactus Species of the Genera *Melocactus*, *Cereus* and *Lobivia*. **Acta Horticulturae**, v.937, p.255-261, 2012.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

- NASCIMENTO, E.H.S. **Crescimento inicial de mudas de *Pilosocereus gounellei* subsp. *gounellei* em diferentes substratos**. 2011. Monografia (graduação). Fortaleza, 2011. 59p.
- NOBEL, P.S. **Cacti: biology and uses**. Berkeley: University of California Press, 2002. 290p.
- NHUT, D.T. et al. Responses of strawberry plantlets cultured *in vitro* under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.73, p.43-52, 2003.
- OJEDA-ZACARÍAS, M.D.C. et al. Micropropagación de Pitahaya, *Hylocereus undatus* (Haworth). **Revista Salud Pública y Nutrición**, n.4, p.119-128, 2012.
- OLIVEIRA, A.B.; DINIZ, J.D.N.; ALMEIDA, J.L. Multiplicação e enraizamento *in vitro* do mandacaru (*Cereus jamacaru* P. DC.). **Plant Cell Culture and Micropropagation**, v.4, p.48-54, 2008.
- PEREIRA, J.E.S. et al. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de Murmuru (*Astrocaryum Ulei*). **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, n.2, p.251-256, 2006.
- PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E. et al. Tissue culture of ornamental cacti. **Scientia Agrícola**, v.72, n.6, 2015.
- POLESI, N.P.E. Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. **Revista brasileira de Biociências**, v.9, n.4, p.533-541, 2011.
- POLESI, N.P.E. **Investigação da microbiota endofítica onipresente em microplantas “axênicas”**. 2010. Dissertação de mestrado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2010. 120 p.
- PRIMO, T.A.R.C. et al. **Cultivo de *Chlorella* sp. – Utilização de fertilizantes agrícolas Comerciais para elaboração de meios de cultura**. Santa Catarina: UDESC, 2015.
- QUISEN, R.C.; ANGELO, P.C.S. **Manual de Procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008. 44p.
- RÊGO, M.M. et al. *In vitro* seed germination of mandacaru (*Cereus jamacaru* DC.). **Revista Caatinga**, v.22, n.4, p.3438, 2009.
- RESENDE, S.V.; LIMA, B.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, p.803-809, 2010.
- RETES-PRUNEDA, J.L. et al. 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.
- REZENDE, R.K.S. et al. Organogênese em capítulos florais e avaliação de características anatômicas da folha de *Gerbera jamesonii* Adlam. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.3, p.821-827, 2008.

- ROCHA, P.S.G. et al. Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. **Ciência Rural**, v.40, p.1922-1928, 2010.
- ROCHA, M.A.C. et al. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, p.769-774, 2008.
- ROJAS-ARÉCHIGA, M.; VÁSQUEZ-YANES, C. Cactus seed germination: a review. **Journal of Arid Enviroments**, v.44, p.85-104, 2000.
- SANTOS, A.P.B. et al. Influência da concentração de BAP (6-benzilaminopurina) na Micropropagação de *Cereus albicaulis* (Cactaceae). IN: **JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMIÁRIDO**, 2012, Petrolina. Anais... Petrolina, 2012. 6p.
- SILVA, S.R. et al. **Plano de ação nacional para conservação das cactáceas**. Brasília: ICMBio, 2011. 113p.
- SILVA, J.G.M. et al. Xiquexique em substituição a silagem do sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) na alimentação de vacas leiteiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, p.1408-1417, 2005.
- SILVA, M.M.A.; FERREIRA, L.T. **Cultivo *in vitro* de plantas e suas aplicações em cactáceas**. Campina Grande: INSA, 2016. 32p.
- SCIVITTARO, W.B.; OLIVEIRA, R.P.; ROCHA, P.S.G.; **Estruturação de Sistema de LEDs em Laboratório de Cultura de Tecidos**. Circular Técnica. Pelotas: Embrapa, 2011.
- STANCATO, G.C.; BEMELMANS, P.F.; VEGRO, C.L.R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.17, n.1, p.25-33, 2001.
- SOCOLOWSKI, F. Influência da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Cereus pernambucensis* Lemaire (Cactaceae). **Biota Neotrop.**, v.10, n.2, 2010.
- SOUZA, L.M.; SILVA, M.M.A.; ARAÚJO, J.S. **Aclimatização de mudas de palma forrageira. Como fazer?** Campina Grande: Insa/MCTI, 2015. 18p.
- SOUZA, A.V.; PEREIRA, A.M.S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.9, n.4, p.103-116, 2007.
- SU, M.J.; SCHNITZER, J.A.; FARIA, R.T. Polpa de banana e fertilizantes comerciais no cultivo *in vitro* de orquídea. **Científica**, v.40, n.1, p.28-34, 2012.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 820 p.
- TAMBARUSSI, E.V. **Desenvolvimento de metodologias biotecnológicas para micropropagação, regeneração e transformação genética de teca (*Tectona grandis* L. f) visando resistência a *Hyblaea puera***. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2009. 122 p.

TORRES, A.C et al. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128 p.

UNEMOTO, L.K. Propagação *in vitro* de orquídeas brasileiras em meio de cultura simplificado. **Revista Brasileira Agrocência**, v.13, n.2, p.267-269, 2007.

VENTURA, G.M. Organogênese *in vitro* a partir de gemas apicais e axilares de plantas adultas de orquídeas do grupo *Cattleya*. **Revista Ceres**, v.47, p.613-628, 2002.

XAVIER, P.B. **Germinação e aclimatização de *Hamatocactus setispinus* (cactaceae)**. Dissertação (Mestrado). Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. 2010. 107p.

WERBROUCK, S.P.O. Merits and drawbacks of new aromatic cytokinins in plant tissue culture. **Acta Horticulturae**, v.865, p.103-108, 2010.