



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

MAGALI HAIDEÉ PEREIRA MARTÍNEZ

**CRESCIMENTO *IN VITRO* E *EX VITRO* DE *Melocactus zehntneri* SOB INFLUÊNCIA
DA FONTE DE LUZ E ESTERILIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA**

SUMÉ – PB
2017

MAGALI HAIDEÉ PEREIRA MARTÍNEZ

CRESCIMENTO *IN VITRO* E *EX VITRO* DE *Melocactus zehntneri* SOB INFLUÊNCIA DA FONTE DE LUZ E ESTERILIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA

Trabalho de conclusão de curso apresentado 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: Prof. Dr. Jean César Farias de Queiroz
Coorientadora: Dra. Marina Medeiros de Araújo Silva**

**SUMÉ – PB
2017**

M386c Martínez, Magali Haideé Pereira.

Crescimento *in vitro* e *ex vitro* de *Melocactus zehntneri* sob influência da fonte de luz e esterilização do meio de cultura. / Magali Haideé Pereira Martínez. Sumé - PB: [s.n], 2017.

40 f.

Orientador: Professor Dr. Jean César Faria de Queiroz. Coorientadora: Dra. Marina Medeiros de Araújo Silva.

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

1. Cactacea – cultivo *in vitro*. 2. Luz de LED e plantas. 3. *Melocactus zehntneri* – cultivo *in vitro* e *ex vitro*. I. Título.

CDU: 582.736(043.1)

MAGALI HAIDEÉ PEREIRA MARTÍNEZ

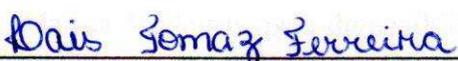
CRESCIMENTO *IN VITRO* E *EX VITRO* DE *Melocactus zehntneri* SOB INFLUÊNCIA DO FONTE DE LUZ E ESTERILIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA

Trabalho de conclusão de curso apresentado 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


Professor Dr. Jean César Farias de Queiroz
Orientador – UAEB/CDSA/UFCG


Professora Dra. Ana Verônica Silva do Nascimento
Examinadora I - UAEB/CDSA/UFCG


M. Sc. Lais Tomaz Ferreira
Examinadora II - UFPB

Trabalho aprovado em: 06 de setembro de 2017
SUMÉ – PB

AGRADECIMENTOS

Às forças que regem o universo.

Aos meus pais e alicerces, Walter e Claudia, pelo exemplo de generosidade e caráter. Por jamais pouparem esforços e carinho. Por vezes se anularem para deixar brilhar seus filhos. Os valores ensinados são eternos. Aos meus amados irmãos, Iván, Pedro e Lucas. Compartilhar tanto ao lado de vocês é conforto para a alma. Á vocês, todo meu amor.

Ao meu avô (in memoriam), José Martínez Espinoza. Sua honra, leveza e amor pela leitura é fonte inesgotável de inspiração. As minhas avós, Petrona Centurión, meu exemplo de fé, doação e alegria, e Taciana Melgarejo, pela total dedicação à família. Aos meus tios, tias e primos. Ainda que na distância física, a lembrança diária os faz presentes em meu coração.

Ao meu namorado e melhor amigo, Muribi Lima, pelos abraços que foram e continuam sendo aconchego. Por cada risada, daquelas de doer a barriga. Pelo respeito, cuidado e admiração.

A Claudinha, família que a universidade me deu. Dividimos casa, sonhos, tristezas, alegrias e um carinho que não cabe no peito. Que assim permaneça.

A Lorrany, Bartira e Joanny, amigas irmãs. Por tantas vezes, abrigo e paz. Espero que sempre possamos cultivar nosso laço. Aos meus queridos amigos, que sempre compreenderam minhas faltas.

À Universidade Federal de Campina Grande, ao Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido e ao Instituto Nacional do Semiárido, pelo aporte em minha formação, e por tornar realidade o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores, que tanto acrescentaram minha vida acadêmica e pessoal. Aos colegas de curso, pelas madrugadas de estudo. Aos técnicos, funcionários e terceirizados.

A Darlyson, amigo da graduação, e por sorte, companheiro do LaCIP. Abrandava qualquer cansaço com suas gargalhadas. Sem você, minha caminhada não teria sido a mesma. Obrigada pelo incentivo de sempre. Na sua torcida a todo instante.

A Lais, pelas incontáveis contribuições para a realização deste trabalho. Foi de extrema importância para dar início ao trabalho. Pela doçura e disposição que sempre me dedicou. Sua amizade é afago. É inestimável. Dividir momentos ao seu lado, no LaCIP e fora dele, foi e são alegrias imensas.

A minha coorientadora Dra. Marina Medeiros, pela disponibilidade, pela paciência sem fim, pelos conselhos e pela partilha de conhecimentos. Me sinto lisonjeada por ter tido tamanha profissional como mentora, e por poder chamá-la de amiga. Seus ensinamentos e contribuições para minha formação profissional e pessoal me acompanharão sempre.

Ao meu orientador, Professor Dr. Jean Queiroz, pela disponibilidade e confiança em mim depositada. Por ter aguçado minha curiosidade como estudante e ter ministrado aulas que reafirmaram minha escolha pelo curso. Por ter sempre se mostrado solícito aos meus questionamentos e necessidades na jornada acadêmica. Uma honra ter tido a oportunidade de ser sua aluna. Aprendi muito com o senhor.

RESUMO

Espécie endêmica do Nordeste brasileiro, o *Melocactus zehntneri* tem importante valor medicinal, sendo também explorada para uso ornamental. O cultivo *in vitro* de plantas apresenta inúmeras vantagens frente às técnicas comumente utilizadas, apesar do elevado custo de manutenção. Buscando alternativas de minimizar tais custos, o presente trabalho objetivou avaliar o crescimento *in vitro* e *ex vitro* de *M. zehntneri* com o uso de diferentes fontes de luz e de esterilização do meio de cultura. Para a germinação *in vitro* e crescimento inicial das plântulas, foi utilizado meio de cultura simplificado, o qual foi esterilizado fisicamente por autoclavagem (EF), ou quimicamente (EQ) pela adição de hipoclorito de cálcio (0,01%). Os cultivos foram mantidos sob fontes de luz fluorescente - FL e Diodo Emissor de Luz – LED, durante 200 dias. Posteriormente, as plantas foram aclimatizadas em casa de vegetação, onde permaneceram por 130 dias. Ao final da fase *in vitro* foi avaliado o percentual de germinação, ocorrência de contaminação, os parâmetros de crescimento e os teores de pigmentos fotossintéticos. Estas duas últimas variáveis também foram examinadas após a etapa *ex vitro*, além da taxa de sobrevivência das plantas. O uso de LEDs apenas antecipou o início da germinação, não diferindo de FL quanto ao percentual. Na fase *in vitro*, o tratamento LED + EF apresentou maior crescimento. Os grupos tratados com LED influenciaram positivamente a biossíntese dos pigmentos. O tratamento LED + EQ produziu menores teores de carotenoides do que LED + EF. No ambiente *ex vitro*, a taxa de sobrevivência das plantas foi de 100% e aquelas provenientes dos tratamentos expostos aos LEDs apresentaram melhor desenvolvimento. Para o teor de pigmentos, o tratamento com LED aumentou o conteúdo de carotenoides. Os resultados evidenciam que a qualidade da luz interfere de modo positivo no crescimento de *M. zehntneri* de forma mais evidente que o tipo de esterilização do meio de cultura. Desse modo, recomenda-se o uso da combinação de fatores LED + EQ, os quais propiciaram a obtenção de plantas de melhor qualidade, além de permitirem a redução de custos.

Palavras-chave: Cactaceae. Cultivo *in vitro*. Luz de LED. Hipoclorito de cálcio. Aclimatização.

ABSTRACT

Endemic species of the Brazilian Northeast, *Melocactus zehntneri* has important medicinal value and it is also exploited for ornamental use. The *in vitro* cultivation of plants presents numerous advantages over the commonly used techniques, despite the high maintenance cost. The present paper aims to evaluate the *in vitro* and *ex vitro* growth of *M. zehntneri* with the use of different sources of the culture medium's light and sterilization. For the *in vitro* germination and initial growth of the seedlings, simplified culture medium was used, which was physically sterilized by autoclaving (EF), or chemically (EQ) by the addition of calcium hypochlorite (0.01%). Cultures were maintained under fluorescent light sources - FL and LED Light Emitting Diode for 200 days. Subsequently, the plants were acclimatized in a greenhouse, where they remained for 130 days. At the end of the *in vitro* phase the percentage of germination, occurrence of contamination, growth parameters and photosynthetic pigment contents were evaluated. These last two variables were also examined after the *ex vitro* step, in addition to the plant survival rate. The use of LEDs only anticipated the beginning of germination, not differing from FL as the percentage. In the *in vitro* phase, the LED + EF treatment presented higher growth. The groups treated with LED positively influenced pigment biosynthesis. The LED + EQ treatment produced lower levels of carotenoids than LED + EF. In the *ex vitro* environment, the survival rate of the plants was 100% and those from the treatments exposed to the LEDs presented better development. For the pigment content, LED treatment increased the carotenoid content. The results show that the quality of light positively interferes with the growth of *M. zehntneri* more clearly than the sterilization type of the culture medium. In this way, it is recommended to use the combination of LED + EQ factors, which allowed to obtain better quality plants, besides besides allowing the reduction of costs.

Keywords: Cactaceae. *in vitro* culture. LED light. Calcium hypochlorite. Acclimatization.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Introdução de *Melocactus zehntneri* ao cultivo *in vitro*: (a) planta contendo frutos; (b) sementes após assepsia em câmara de fluxo laminar.20
- Figura 2. Aspecto das plântulas de *Melocactus zehntneri* aos 200 dias de cultivo *in vitro* sob o efeito da fonte de luz (FL e LED) e do tipo de esterilização do meio de cultura (EF e EQ). Barra = 1 cm.24
- Figura 3. Aspecto das raízes de *Melocactus zehntneri* aos 200 dias de cultivo *in vitro* sob o efeito da fonte de luz (FL e LED) e do tipo de esterilização do meio de cultura (EF e EQ).25
- Figura 4. Teor de pigmentos fotossintéticos em plântulas de *Melocactus zehntneri* aos 200 dias de cultivo *in vitro* sob duas fontes de luz (FL e LED) e dois tipos de esterilização do meio de cultura (EF e EQ). Médias seguidas de letras iguais, minúsculas para fontes de luz e maiúsculas para tipos de esterilização, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).26
- Figura 5. Aclimatização de *Melocactus zehntneri*: (a) plantas no início do processo; (b e c) plantas provenientes dos tratamentos FL + EF e LED + EF, respectivamente, aos 130 dias de aclimatização.27
- Figura 6. Aspecto das plântulas de *Melocactus zehntneri*, aos 130 dias de aclimatização, provenientes do cultivo *in vitro* sob o Efeito da fonte de luz (FL e LED) e do tipo de esterilização do meio de cultura (EF e EQ). Barra = 1 cm.29
- Figura 7. Teor de pigmentos fotossintéticos em plântulas de *Melocactus zehntneri*, aos 130 dias de aclimatização, oriundas do cultivo *in vitro* sob duas fontes de luz (FL e LED) e dois tipos de esterilização do meio de cultura (EF e EQ). Médias seguidas de letras iguais, minúsculas para fontes de luz e maiúsculas para tipos de esterilização, não diferem estatisticamente pelo teste de tukey ($p \leq 0,05$).30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Crescimento da parte aérea e das raízes de plântulas de <i>Melocactus zehntneri</i> aos 200 dias de cultivo <i>in vitro</i> sob o efeito da fonte de luz (FL e LED) e do tipo de esterilização do meio de cultura (EF e EQ).....	24
Tabela 2. Crescimento da parte aérea e das raízes de plântulas de <i>Melocactus zehntneri</i> , aos 130 dias de aclimatização, oriundas do cultivo <i>in vitro</i> sob o efeito da fonte de luz (FL e LED) e do tipo de esterilização do meio de cultura (EF e EQ).....	28

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ca(ClO) ₂	Hipoclorito de cálcio
chl <i>a</i>	Clorofila <i>a</i>
chl <i>b</i>	Clorofila <i>b</i>
CITES	Convenção sobre Comércio Internacional de Espécies de Fauna e Flora Ameaçadas de Extinção
EF	Esterilização física
EQ	Esterilização química
FL	Fluorescente
INSA	Instituto Nacional do Semiárido
LaCIP	Laboratório de Cultivo <i>in vitro</i> de Plantas
LED	Light-emitting diode – Diodo emissor de luz
MFPA	Massa fresca da parte aérea
MFR	Massa fresca das raízes
MS	Meio de cultura Murashige & Skoog (1962)
MSPA	Massa seca da parte aérea
MSR	Massa seca das raízes
NaClO	Hipoclorito de sódio
UV	Radiação ultra-violeta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo Geral	12
2.2. Objetivos Específicos.....	12
3. REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1. <i>Melocactus zehntneri</i>	13
3.2. Cultivo <i>in vitro</i> de plantas	14
3.3. Fatores que influenciam no cultivo <i>in vitro</i>	15
3.3.1. Luz	15
3.3.2. Meio de cultura	16
3.4. Cultivo <i>in vitro</i> de cactáceas.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Material vegetal e Condições de cultivo <i>in vitro</i>	20
4.2. Aclimatização	21
4.3. Avaliações biométricas	21
4.4. Determinação do teor de pigmentos fotossintéticos	21
4.5. Análise estatística.....	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1. Efeito da luz e tipo de esterilização sobre a germinação e o crescimento <i>in vitro</i>	23
5.2. Efeito da luz e tipo de esterilização sobre a aclimatização e o crescimento <i>ex vitro</i> ..	27
6. CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	31

1. INTRODUÇÃO

As cactáceas são plantas adaptadas às condições da Região Semiárida, cultivadas no mundo inteiro e amplamente utilizadas por suas propriedades medicinais (ANDRADE et al., 2006). Também são muito requisitadas pelos agropecuaristas, na época da seca, como uma alternativa para alimentação dos animais e consumo próprio (DAMASCENO et al., 2010; SILVA et al., 2005; LIMA, 2002), além de servirem como ornamento em vasos ou jardins decorativos. *Melocactus zehntneri* (Britton & Rose) Luetzelburg, popularmente conhecido como coroa-de-frade, é uma espécie endêmica do Brasil, sendo encontrado do sul da Bahia ao norte do Ceará (TAYLOR et al., 2015) e bastante aplicado segundo tais potencialidades (NUNES et al., 2015; PAULINO et al., 2011; ARAÚJO et al., 2010; LIMA-SILVA et al., 2009).

A produção de mudas *in vitro* destaca-se, em comparação com outras técnicas comumente utilizadas, por apresentar vantagens como a uniformidade genética das plantas e pela possibilidade de gerar mudas livres de pragas e doenças (SANTOS-SEREJO et al., 2006). Apesar de tais vantagens, o cultivo *in vitro* apresenta elevado custo de manutenção, o que pode inviabilizar a sua utilização em larga escala. Neste sentido, diversas alternativas voltadas à redução do custo de produção das mudas têm sido testadas e vêm apresentando resultados positivos, como por exemplo, a substituição de alguns componentes do meio de cultura, a aplicação da esterilização química, o emprego de biorreatores, e o uso de diodo emissor de luz (light emitting diode-LED) na sala de crescimento (RIBEIRO et al., 2013; GUPTA; JATHOTU, 2013; FERREIRA et al., 2016; GUIMARÃES et al., 2016).

A utilização de esterilização química dos meios nutritivos, fazendo-se uso do hipoclorito de sódio ou de cálcio, é uma alternativa à esterilização física por autoclavagem que apresenta grande potencial, uma vez que diminui o tempo da esterilização e reduz os custos de manutenção e consumo de energia, possibilitando também o uso de frascos de plástico, além de não promover a degradação de determinados componentes do meio (TEIXEIRA et al., 2006; RIBEIRO et al., 2008). Esta é uma técnica que não apresenta, até o momento, qualquer restrição para o seu uso como esterilizante de meios nutritivos para plantas (RIBEIRO et al., 2013), sendo comumente empregada no cultivo *in vitro* de banana (TEIXEIRA et al., 2006), cana-de-açúcar (TIWARI et al., 2012), eucalipto (BRONDANI et al., 2013), abacaxi (OLIVEIRA et al., 2015), entre outras espécies.

Outro processo que demanda alto consumo de energia elétrica é a manutenção das plantas nas salas de crescimento. Ainda que mais difundida e utilizada em laboratórios de

cultura de tecidos vegetais, o uso de lâmpadas fluorescentes vem dando espaço para os LEDs (NHUT et al., 2003). A qualidade do espectro de luz emitido pelos LEDs vem influenciando nas diferentes respostas de crescimento e desenvolvimento observadas em plantas cultivadas *in vitro* (GUPTA; JATHOTU, 2013; BELLO-BELLO et al., 2017), além de contribuir no desempenho das plantas quando de sua transferência ao ambiente *ex vitro* (FERREIRA et al., 2017). Ademais, os LEDs apresentam maior resistência e durabilidade, baixa produção de calor e elevada eficiência na conversão de energia elétrica em luminosa.

Diante da importância da aplicação das técnicas de cultivo *in vitro* para estudos de germinação, propagação e conservação de cactáceas (SILVA et al., 2011), especialmente aquelas espécies que sofrem com o impacto do extrativismo e que não apresentam a emissão de brotamentos quando em condições naturais, como é o caso do gênero *Melocactus*, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos dos agentes externos (esterilização do meio de cultura e fonte de luz) na germinação e crescimento *in vitro* de *M. zehntneri*, bem como a sua influência na aclimatização das plântulas obtidas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a influência do tipo de esterilização do meio de cultura e da fonte de luz no crescimento *in vitro* e *ex vitro* do *Melocactus zehntneri*.

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar a influência do espectro de luz e do tipo de esterilização no meio de cultura na germinação *in vitro* de *M. zehntneri*;
- Quantificar os parâmetros de crescimento e os teores de pigmentos fotossintéticos das plântulas cultivadas sob diferentes fontes de luz e tipo de esterilização, nas fases *in vitro* e *ex vitro*;
- Avaliar a influência dos fatores (tipo de esterilização do meio e fonte de luz) aos quais as plântulas foram expostas durante o cultivo *in vitro* na aclimatização das mesmas.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. *Melocactus zehntneri*

A Região Semiárida do Brasil apresenta grande diversidade em seus aspectos geomorfológicos e fitofisionômicos, com predominância da vegetação hiperxerofítica da Caatinga (ALVES, 2009; MORO et al., 2016). As cactáceas têm importantes caracteres adaptativos aos ambientes com pouca disponibilidade de água, sendo geralmente caracterizadas pela redução dos ramos laterais em aréolas (onde se encontram regiões meristemáticas), suculência, caule fotossintetizante, ausência de folhas, presença de espinhos e flores com estames e tépalas numerosos (NOBEL, 2002; TAYLOR; ZAPPI, 2004). Estudos da vegetação semiárida do Brasil demonstram que as cactáceas constituem uma família com mais de 1300 espécies, e que estas desempenham papel importante na sustentabilidade da Caatinga em épocas de secas prolongadas, principalmente como fonte de alimentação para a fauna local e para a sobrevivência do sertanejo (COELHO et al., 2015).

No Bioma Caatinga, podem ser encontradas várias espécies de *Melocactus*, conhecidas popularmente como cabeça-de-frade ou coroa-de-frade, que são amplamente utilizadas pela população local para diversas finalidades, desde a culinária e medicina popular, pelo seu potencial farmacológico (ANDRADE et al., 2006; NUNES et al., 2016), até a exploração do potencial forrageiro e, principalmente, paisagístico (ROCHA et al., 2002; LUCENA et al., 2012b). O gênero *Melocactus* compreende 36 espécies (ANDERSON, 2001) de pequenos cactos globosos, comuns em regiões áridas e semiáridas de zonas tropicais e subtropicais das Américas. Embora de ampla distribuição pela América Central e do Sul, a maior concentração de táxons e o centro de diversidade se localiza no leste do Brasil, particularmente no estado da Bahia (TAYLOR; ZAPPI, 2004). As plantas do gênero são caracterizadas por possuírem uma pequena haste globosa ligeiramente alongada, não ramificada, parte fértil do caule diferenciada em uma estrutura de cor vermelha, o cefálio terminal, que contém a gema apical, responsável pelo crescimento (NANO, 2011; GORELICK, 2014). Os frutos são bagas pequenas e as sementes são dispersas localmente por lagartos e formigas (FONSECA, 2004).

Espécie endêmica do nordeste do Brasil, o *Melocactus zehntneri* (TAYLOR; ZAPPI, 2004) ocorre em todos os estados da região, com exceção do Maranhão e é uma das muitas espécies vegetais que se encontram ameaçadas pela exploração e pela pressão antrópica sobre os seus habitats (HUNT, 2006). Possui grande variabilidade fenotípica, apresentando cladódio globoso, eventualmente alongado, não ramificado, com 10 a 14 costelas inteiras. Tem espinhos cilíndricos, conspicuamente curvados e pungentes; cefálio apical com tricomas

brancos e cerdas rosadas a vermelhas. Flores com coloração magenta e frutos com pericarpo rosado e polpa funicular translúcida, contendo pequenas sementes (MENEZES et al., 2013). Habita formações savânicas ou campestres, sem qualquer especificidade de substrato (TAYLOR; ZAPPI, 2004; MENEZES et al., 2011).

Estudos envolvendo *M. zehntneri* vêm sendo desenvolvidos especialmente quanto aos seus aspectos etnobotânicos (CHAVES; BARROS, 2015; LUCENA et al., 2015) ou com enfoque farmacológico, com o objetivo de identificar e quantificar compostos bioativos (NUNES et al., 2016; BRANDÃO et al., 2016). Devido ao considerável grau de ameaça sofrido por esta espécie, ocasionado pela degradação de seus habitats e pela coleta e comércio ilegal, bem como pelo seu valor ornamental e pelo fato de não apresentar emissão de brotamentos quando em condições naturais, há um crescente interesse em ações de conservação e em estudos de propagação da mesma.

3.2. Cultivo *in vitro* de plantas

O cultivo *in vitro* de plantas envolve um conjunto de técnicas que tem na totipotencialidade das células vegetais a sua base, ou seja, na capacidade de regeneração de um indivíduo completo a partir das células individualizadas, uma vez que estas possuem todas as informações genéticas necessárias para tal (FRÁGUAS et al., 2004). Através do isolamento de tecidos ou órgãos vegetais e seu cultivo em meio nutritivo, em condições assépticas e em ambiente controlado, o cultivo *in vitro* tem auxiliado programas de melhoramento, e é parte integrante de vários sistemas de produção de plantas. Ademais, como ciência, é de suma importância para a compreensão de aspectos morfológicos, fisiológicos, genéticos e fitossanitários das plantas (CARDOSO, 2014).

Entre as suas principais técnicas estão a micropropagação, que apresenta maior aplicabilidade; a limpeza clonal, utilizada para produção de plantas livres de patógenos; o cultivo de protoplastos, anteras e embriões zigóticos; e a conservação de germoplasma (SILVA; FERREIRA, 2016). Desse modo, o cultivo *in vitro* possibilita uma versatilidade de aplicações na biotecnologia vegetal e tem sido utilizado em diversos trabalhos, abrangendo diferentes metodologias e propiciando o desenvolvimento de novos protocolos, com o objetivo principal de prover um ambiente favorável ao crescimento e desenvolvimento da espécie estudada, já que muitas delas têm nesse método seu principal meio de propagação.

A germinação *in vitro* também vem sendo aplicada para diferentes espécies, procurando solucionar problemas como à ocorrência de germinação irregular, sementes recalcitrantes e obtenção de plantas matrizes saudáveis para servirem como fonte de explantes

para a multiplicação, além de atuar como ferramenta de seleção para a tolerância a condições de estresse (FERREIRA et al., 2016; MURUGAN et al., 2016; SILVA; FERREIRA, 2016; SINGH et al., 2017). Quando comparada à germinação em condições naturais, a germinação *in vitro* apresenta como vantagens a redução do tempo necessário à ocorrência do processo, o aumento da taxa de germinação, além da sua sincronização, e evita problemas como o aborto embrionário (ALTAFIN et al., 2003).

Diferentes fatores podem exercer influência sobre o crescimento e desenvolvimento de das plantas cultivadas *in vitro*, tais como o genótipo, a origem de explantes, os componentes nutricionais do meio, a presença e concentração de reguladores de crescimento e o ambiente de cultivo (CHEN et al., 2012; ZHAO et al. 2013; CARLONI et al., 2014). Portanto, a análise quantitativa dos parâmetros de crescimento das plantas, além de outras análises morfofisiológicas e bioquímicas é uma ferramenta acessível e precisa para se avaliar o desenvolvimento vegetal, assim como a influência das diferentes condições as quais as plantas são submetidas durante o cultivo *in vitro* (PEIXOTO et al., 2004).

Após o desenvolvimento das plântulas, estas poderão ser aclimatizadas. Esta fase refere-se ao processo de adaptação gradual das plantas quando estas são transferidas do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*, devendo ser realizado com bastante cuidado, uma vez que pode tornar-se um obstáculo ao êxito no cultivo *in vitro* (SILVA; FERREIRA, 2016). Salieta-se também que a aclimatização poderá ser facilitada a depender das condições de cultivo *in vitro* e que plantas melhor desenvolvidas apresentam maiores chances de sobrevivência quando transferidas para o ambiente *ex vitro*.

3.3. Fatores que influenciam no cultivo *in vitro*

3.3.1. Luz

A luz é um fator ambiental fundamental para as plantas, pela ação direta ou indireta na regulação de algumas características morfológicas, anatômicas, de desenvolvimento e de constituição química, as quais podem ser influenciadas pela qualidade da luz, e não apenas pela presença ou ausência dela (HUCHÉ-THÉLIER et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2013). Consequentemente, a qualidade da luz surge como uma ferramenta na manipulação da indução de balanços fisiológicos favoráveis a respostas específicas no crescimento e morfogênese das plantas (MORINI; MULEO, 2003).

No cultivo *in vitro* de plantas, a fonte de luz comumente utilizada nas salas de crescimento é a lâmpada fluorescente branca (KIM et al., 2004). Entretanto, pelo seu potencial para aplicação comercial, os diodos emissores de luz (LED) representam um avanço

nas condições de cultivo dos explantes, pois possuem potencial para melhorar a eficiência de irradiação e a qualidade das plantas produzidas (ROCHA et al., 2010; AMOOZGAR et al., 2017). Dentre as vantagens proporcionadas pelos LEDs, destacam-se: comprimento de onda específico, pequena massa e volume, maior eficiência na conversão de energia elétrica em luminosa, longo período de vida e baixo aquecimento, fato que contribui para a aquisição de sistemas de resfriamento menos potentes e que, conseqüentemente, consumirão menos energia elétrica (ROCHA et al., 2010; GUPTA; JATOTHU, 2013).

A irradiância fornecida na sala de crescimento causa alterações fotomorfogênicas nas plantas, principalmente, na formação dos tecidos do mesófilo e no mecanismo de abertura e fechamento dos estômatos, afetando seu desenvolvimento e funcionalidade (REZENDE et al., 2008). Alguns estudos revelam ainda 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 (BRAGA et al., 2009). De fato, o uso de LEDs vem demonstrando benefícios para diferentes espécies cultivadas *in vitro*, seja na formação de brotações, indução da embriogênese somática, rizogênese (GUPTA; JATOTHU, 2013), promoção do crescimento e da biossíntese de clorofila (BELLO-BELLO et al., 2017), bem como no aumento da taxa de sobrevivência das plantas durante a aclimatização (FERREIRA et al., 2017).

Guimarães et al. (2016), constataram que as lâmpadas de LEDs propiciaram melhor desenvolvimento das plântulas de mandacaru e menor taxa de perda de água no cladódio quando comparadas com as fluorescentes. O uso de LED também contribuiu para o desenvolvimento das brotações de bananeira (OLIVEIRA et al., 2012), de cana-de-açúcar (FERREIRA et al., 2017) e de antúrio (BUDIARTO, 2010). A menor eficiência no crescimento e desenvolvimento 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 (ROCHA et al., 2010).

3.3.2. Meio de cultura

Um dos fatores que exerce influência no cultivo *in vitro* é o meio nutritivo onde os explantes são mantidos. Os seus constituintes são baseados nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, podendo-se realizar algumas modificações, a fim de atender necessidades específicas. Tem como componentes essenciais: água, macronutrientes,

micronutrientes, vitaminas, aminoácidos ou suplementos de nitrogênio, fontes de carbono e reguladores de crescimento (SILVA; FERREIRA, 2016).

Embora a propagação vegetativa *in vitro* apresente inúmeras vantagens em relação à convencional, as mudas obtidas possuem um custo mais elevado, devido a diversos fatores, como a infraestrutura dos laboratórios de produção, a necessidade de mão de obra capacitada e os gastos com reagentes químicos e energia elétrica (SOUZA; JUNGHANS, 2006). Outro problema que eleva os custos de produção se refere à contaminação, já que o meio de cultura é rico em nutrientes e propício para o crescimento microbiano (OYEBANJI et al., 2009). Na tentativa de reduzir tais gastos uma etapa importante e passível de ser modificada é a esterilização.

A autoclavagem (esterilização a vapor) é o procedimento mais comumente utilizado e utiliza altas temperaturas (121°C) e pressão (1 atm) por períodos de 15 a 30 minutos, para a eliminação de microrganismos do meio de cultura e do recipiente de cultivo das plantas (TORRES et al., 1998). No entanto, além de apresentar alto consumo energético, a esterilização do meio de cultura envolvendo calor pode resultar em reações indesejáveis. Por exemplo, muitas proteínas, vitaminas e hidratos de carbono são termolábeis e podem se decompor durante a autoclavagem, alterando sua qualidade e prejudicando o desempenho morfogênico dos tecidos cultivados (TEIXEIRA et al., 2005; VETTEN et al., 2014; SHI et al., 2010).

Na busca por novas alternativas que minimizem os custos, a autoclavagem tem sido substituída por procedimentos físicos, como o micro-ondas (TEIXEIRA et al., 2005a, 2005b), e químicos, pelo uso do hipoclorito de sódio ou de cálcio (TEIXEIRA et al., 2006, 2008; HERMAYANI et al., 2016) e do peróxido de hidrogênio (YANAGAWA et al., 1995). Os compostos clorados possuem um amplo espectro de atividade biocida e são adicionados ao meio de cultura em baixas concentrações, sendo os mais utilizados o hipoclorito de sódio (NaClO) e o hipoclorito de cálcio (Ca(ClO)₂), que é menos tóxico para os tecidos vegetais (RIBEIRO et al., 2008). A esterilização química não apresenta, até o momento, qualquer restrição para o seu uso em meios de cultura para plantas (RIBEIRO et al., 2013), existindo, inclusive, relatos de que pode atuar como fator para a redução da hiperhidricidade dos tecidos (NEPOMUCENO et al., 2014).

Teixeira et al. (2006) estabeleceram um protocolo de preparo de meios de cultura que utiliza o hipoclorito de sódio como esterilizante, o que permitiu a eliminação da contaminação e o aumento do número de ramos e da massa fresca do abacaxizeiro. Nepomuceno et al. (2014), observaram que a esterilização do meio com hipoclorito de sódio pode ser utilizada

para o estabelecimento *in vitro* de *Hyptis leucocephala* e *H. platanifolia*, não interferindo na sua germinação. Estes resultados estão de acordo com os encontrados no cultivo de *Cypripedium macranthos* (MIYOSHI et al., 1998) e de *Phalaenopsis amabilis* (MWEETWA et al., 2008), em que a adição do hipoclorito de cálcio não apresentou efeito negativo sobre a semente.

3.4. Cultivo *in vitro* de cactáceas

Muitas espécies de cactos estão ameaçadas devido à coleta excessiva para fins comerciais, e grande parte da família está incluída na Convenção sobre Comércio Internacional de Espécies de Fauna e Flora Ameaçadas de Extinção (CITES) (SAJEVA et al., 2012). Geralmente, as espécies mais ameaçadas são de crescimento lento e não são facilmente propagadas por métodos convencionais. Desse modo, o cultivo *in vitro* pode desempenhar um papel fundamental para reduzir a exploração das populações selvagens e contribuir para a conservação *ex situ*, uma vez que suas técnicas permitem a propagação maciça a partir de uma pequena quantidade de material vegetal (LEMA-RUMIŃSKA e KULUS, 2014).

O cultivo *in vitro* vem sendo aplicado para a germinação, multiplicação e conservação de diferentes espécies de cactáceas (LEMA-RUMIŃSKA; KULUS, 2014; PÉREZ-MOLPHE-BALCH et al., 2015; SILVA; FERREIRA, 2016). 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, condições de incubação, entre outros fatores (SILVA; FERREIRA, 2016).

A germinação *in vitro* é importante do ponto de vista biológico, uma vez que permite a manutenção da variabilidade genética das populações, além de aumentar a disponibilidade de mudas para fins de comercialização ou uso em programas conservacionistas (ANSELMO et al., 2010). Geralmente são obtidas taxas de germinação de 70 a 100%, dependendo da espécie (BALCH et al., 2015) e, apesar de apresentar um custo mais elevado, a germinação *in vitro* permite um desenvolvimento mais rápido das plantas quando comparado com aquelas obtidas por germinação em viveiros ou sistemas naturais (CORREIA et al., 2011). Em geral, as sementes representam um material excelente porque podem ser submetidas a concentrações elevadas de soluções desinfestantes para a eliminação de contaminações microbianas e, deste modo, podem ser obtidas plantas assépticas (LEMA-RUMIŃSKA e KULUS, 2014).

Diferentes fatores podem ser estudados durante a germinação *in vitro*. Reis et al. (2012) testaram o efeito de diferentes tratamentos pré-germinativos em sementes de *Pilosocereus aurisetus* armazenadas por 19 meses, obtendo maiores percentuais de

germinação no tratamento controle ou quando utilizada a embebição em água por 24 horas. Já Dias et al. (2013), investigando o efeito de diferentes reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura, verificaram que o maior número de sementes emergidas de *Melocactus bahiensis* foi obtido quando utilizada a concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido naftaleno acético; enquanto Resende et al. (2009) obtiveram maior percentual de germinação *in vitro* de *Melocactus glaucescens* utilizando o meio com 25% da concentração dos sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e redução da sacarose.

Após o desenvolvimento das plântulas obtidas *in vitro*, estas poderão ser aclimatizadas, mantidas em meio de crescimento lento com finalidade de conservação ou utilizadas como material inicial para a micropropagação. Cladódios mais desenvolvidos possibilitam a extração de um maior número de explantes, caso a plântula seja utilizada como matriz para a micropropagação (SILVA; FERREIRA, 2016). Civatti et al. (2017) obtiveram plântulas de duas espécies de *Micranthocereus* por germinação *in vitro* e as utilizaram para a multiplicação, conseguindo até seis brotações por explante. Do mesmo modo, Guimarães (2016), alcançou taxas de multiplicação de 4,6 brotos por explante, a partir de segmentos de cladódios retirados de plantas de *Cereus jamacaru* germinadas *in vitro*.

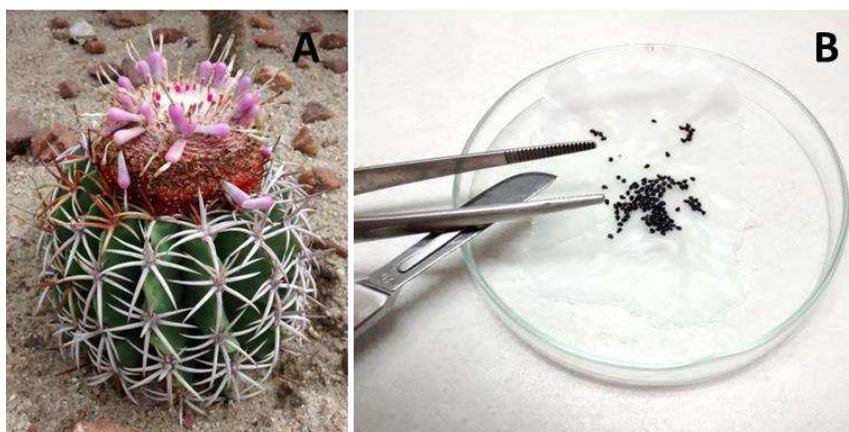
4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal e Condições de cultivo *in vitro*

O presente experimento foi conduzido no Laboratório de Cultivo *in vitro* de Plantas (LaCIP), do Instituto Nacional do Semiárido (INSA), localizado em Campina Grande, Paraíba, a partir de frutos de *Melocactus zehntneri* (Figura 1A), coletados no Cactário Guimarães Duque (INSA).

Após a retirada da polpa, feita com o auxílio de peneira metálica e água corrente, as sementes foram submetidas à desinfestação, por meio de lavagem em água e detergente neutro, imersão em álcool 70%, durante um minuto, e posteriormente em hipoclorito de sódio (NaOCl 2,5%) adicionado de 1 mL de Tween 20, onde permaneceram sob agitação durante 15 minutos.

Figura 1 - Introdução de *Melocactus zehntneri* ao cultivo *in vitro*: (A) planta contendo frutos; (B) sementes após assepsia em câmara de fluxo laminar.



FONTE: Próprio autor, 2017

Em câmara de fluxo laminar foi realizado o triplice enxágue em água destilada estéril e a inoculação das sementes (Figura 1B) em meio de cultura simplificado, composto pelos fertilizantes Calcinit ($0,84 \text{ g L}^{-1}$) e Kristalon ($0,74 \text{ g L}^{-1}$), usados em substituição aos macros e micronutrientes comumente utilizados, e suplementado com 1 mL de vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e 3% de sacarose. O pH foi ajustado para 5,8 e o meio solidificado com 6 g L^{-1} de ágar. Foram testadas ainda duas formas de esterilização do meio de cultura: a esterilização física (EF), fazendo-se uso da autoclave ($120 \text{ }^\circ\text{C}$ e 1 atm, por 20 minutos), e a esterilização química (EQ), pela adição de hipoclorito de cálcio ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$ 0,01%) ao meio.

Os materiais destinados ao uso nos tratamentos com esterilização química (vidrarias, frascos de cultura e tampas) primeiramente foram lavados com detergente em água corrente e enxaguados com água destilada. Posteriormente, foram mergulhados em uma solução de água destilada adicionada de 0,003% de NaClO e deixados para secar na câmara de fluxo laminar com a luz UV ligada.

Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 h de luz, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e expostos a 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, ambos da marca Philips. Foram realizados dois subcultivos, em intervalos de 70 dias, em que as plântulas foram transferidas para as mesmas condições as quais foram expostas inicialmente. Ao final de 200 dias de cultivo *in vitro*, quando as plantas apresentavam tamanho adequado para serem aclimatizadas, foram realizadas avaliações biométricas e quantificados os teores de pigmentos fotossintéticos.

4.2. Aclimatização

As plantas enraizadas foram lavadas em água corrente, para a remoção dos resíduos do meio de cultura, e transplantadas para bandejas de polipropileno com 98 células contendo substrato Basaplant[®]. As plantas permaneceram em casa de vegetação durante 130 dias, sendo os 40 primeiros dias em ambiente protegido com malha para 50% de redução da luz (tela sombrite 50%), com rega semanal. Posteriormente, foi observada a taxa de sobrevivência e novas avaliações realizadas.

4.3. Avaliações biométricas

A medida da altura e diâmetro do cladódio, bem como do comprimento da raiz principal foi realizada com o auxílio de régua milimetrada. A massa da matéria fresca da parte aérea e radicular foi obtida em balança analítica, enquanto a matéria seca foi obtida após a secagem em estufa (65°C por 48h) e posterior pesagem.

4.4. Determinação do teor de pigmentos fotossintéticos

Para a determinação do conteúdo de clorofila (chl a e b) e carotenoides, amostras do cladódio (0,1 g) foram maceradas em acetona 80%. Após filtragem, o extrato obtido foi utilizado para a quantificação dos pigmentos em espectrofotômetro UV-visível, nos

comprimentos de onda de 663 e 647 nm para clorofilas e 470 nm para carotenoides, de acordo com Lichtenthaler (1987).

4.5. Análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2 (tipo de esterilização x fonte de luz). Na etapa *in vitro* foram utilizadas 10 repetições por tratamento, sendo a repetição composta por um frasco contendo 10 sementes, enquanto na etapa de aclimatização foram utilizadas 17 repetições (plantas) por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de cometer erro tipo 1, utilizando o programa estatístico Sisvar, versão 5.6.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Efeito da luz e tipo de esterilização sobre a germinação e o crescimento *in vitro*

O início da germinação variou nas diferentes fontes de luz. Nos tratamentos expostos aos LEDs a germinação iniciou aos cinco dias, enquanto nos tratamentos expostos à luz fluorescente iniciou aos nove dias. Após 15 dias de cultivo *in vitro*, o percentual de germinação foi de 100% para o tratamento LED + EF e 98% para os demais. Aos 30 dias, todos os tratamentos apresentavam 100% de germinação. A luz é um fator abiótico que afeta amplamente a germinação das sementes de cactáceas, uma vez a maioria apresenta fotoblastismo positivo, como é o caso do gênero *Melocactus* (MEIADO, 2012). Contudo, neste estudo, o espectro luminoso emitido pelos LEDs apenas antecipou o início da germinação, não havendo diferença significativa quanto ao seu percentual.

O meio de cultura simplificado também foi eficiente e propiciou percentuais de germinação maiores do que os observados com o uso de meio MS para esta mesma espécie (GUIMARÃES et al., 2016). Não foi observada a presença de contaminação microbiana, o que garante a efetividade do uso de hipoclorito de cálcio (0,01%) como agente esterilizante do meio de cultura. Destaca-se também que a esterilização química não interferiu na germinação das sementes e, portanto, não apresentou efeito fitotóxico. Tais resultados corroboram aqueles reportados por Resende (2010), sobre a viabilidade do uso de hipoclorito em baixas concentrações como agente esterilizante do meio de cultura para a germinação de *Melocactus glaucescens*. De acordo com Mweetwa (2008), o uso de hipoclorito de cálcio promoveu a germinação de sementes em *Phalaenopsis* porque a sarcotesta foi corroída, tornando-se mais permeável à água e nutrientes.

Em relação aos parâmetros de crescimento, de modo geral, a iluminação proveniente dos LEDs apresentou melhor desempenho quando comparada com das fluorescentes brancas, bem como o uso da EF em relação à EQ, (Tabela 1, Figura 2). Quanto à parte aérea, o uso de LED + EF garantiu melhores resultados em comparação a FL + EF, exceto para a altura e a massa fresca, em que não houve diferença entre os tratamentos. Já a aplicação da esterilização química propiciou a redução no acúmulo de massa fresca e seca da parte aérea. A presença de compostos clorados no meio de cultura também influenciou negativamente o crescimento e desenvolvimento das orquídeas *Laelia tenebrosa* e *Cattleya kerri* (FONTES, 2011). Segundo Nepomuceno et al. (2014), o meio esterilizado quimicamente apresenta consistência mais firme do que o meio autoclavado, diminuindo assim a disponibilidade de água e nutrientes para as plantas, o que pode afetar o seu crescimento.

Tabela 1 - Crescimento da parte aérea e das raízes de plântulas de *Melocactus zehntneri* aos 200 dias de cultivo *in vitro* sob o efeito da fonte de luz (FL e LED) e do tipo de esterilização do meio de cultura (EF e EQ).

Variáveis	FL		LED	
	EF	EQ	EF	EQ
Altura (cm)	1,77 aA	1,65 aA	1,77 aA	1,45 bB
Diâmetro (cm)	1,13 bA	0,95 bA	1,35 aA	1,28 aA
MFPA (g)	0,477 aA	0,384 bB	0,452 aA	0,421 aB
MSPA (g)	0,0112 bA	0,0083 bB	0,0215 aA	0,0171 aB
CRP (cm)	3,12 aA	2,77 aB	3,30 aA	2,80 aB
MFR (g)	0,034 bA	0,026 bA	0,070 aA	0,059 aB
MSR (g)	0,0035 bA	0,0024 bB	0,0051 aA	0,0046 aB

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas para fonte de luz e maiúsculas para tipo de esterilização, 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).

FONTE: Próprio autor, 2017

Figura 2 - Aspecto das plântulas de *Melocactus zehntneri* aos 200 dias de cultivo *in vitro* sob o efeito da fonte de luz (FL e LED) e do tipo de esterilização do meio de cultura (EF e EQ). Barra = 1 cm.

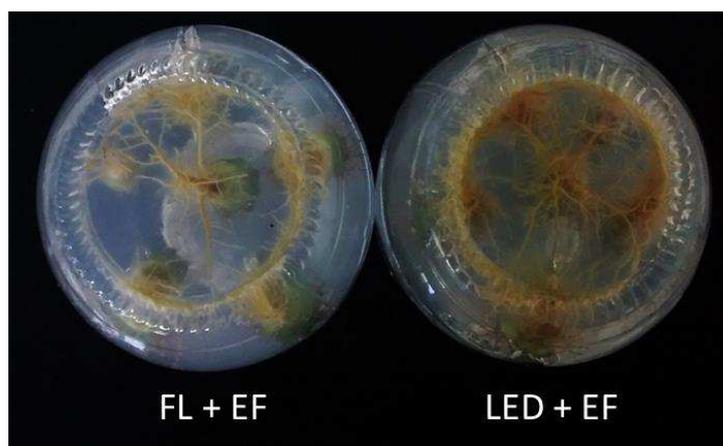


FONTE: Próprio autor, 2017

No crescimento radicular, observou-se a interferência da luz para a massa fresca e seca, demonstrando o efeito positivo do espectro emitido pelo LED (Tabela 1, Figura 3). Este resultado está de acordo com o obtido por Guimarães (2016), que observou maior influência da fonte de luz (LED) no crescimento das raízes de *Cereus jamacaru* cultivado *in vitro* em meios de cultura simplificados. Quanto ao tipo de esterilização, os tratamentos com EF apresentaram médias superiores, exceto para a massa fresca com o uso de FL, em que não houve diferença estatística. A adição de doses crescentes de água sanitária comercial ao meio

de cultura resultou na diminuição do número de raízes de *Cattleya kerry* cultivada *in vitro* (FONTES, 2011); enquanto que para massa seca das raízes do abacaxizeiro ‘Vitória’, os tratamentos com esterilização química apresentaram médias superiores àquelas encontradas no meio autoclavado (OLIVEIRA et al., 2015).

Figura 3 - Aspecto das raízes de *Melocactus zehntneri* aos 200 dias de cultivo *in vitro* sob o efeito da fonte de luz (FL e LED) e do tipo de esterilização do meio de cultura (EF e EQ).



FONTE: Próprio autor, 2017

Os resultados encontrados neste trabalho apontam a combinação de fatores (luz e esterilização) como determinante para o crescimento das plantas, sendo o uso de LED + EF o mais indicado. Ressalta-se, sobretudo, o efeito da qualidade da luz emitida pelo LED, em ambos os tipos de esterilização, que resultou em um melhor desenvolvimento das plantas na fase *in vitro*, as quais se apresentam morfológicamente mais semelhantes àquelas encontradas na natureza, inclusive com costelas e espinhos maiores e mais desenvolvidos quando comparados com as plantas mantidas sob luz fluorescente (Figura 2).

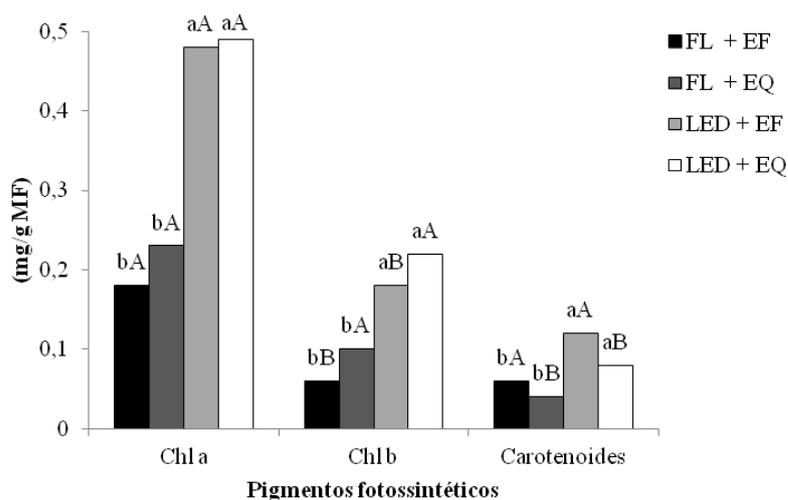
De fato, a luz é um fator que influencia consideravelmente na multiplicação celular e no crescimento dos tecidos vegetais cultivados *in vitro* (ARAÚJO, 2009). Segundo Rocha et al. (2010), a menor eficiência no crescimento das plantas na presença de lâmpadas fluorescentes decorre do fato destas emitirem diferentes comprimentos de onda, muitos dos quais não são considerados importantes para a fotomorfogênese. Este é um fator relevante, uma vez que um cladódio melhor desenvolvido pode favorecer a sobrevivência da planta durante a aclimatização.

O teor de pigmentos fotossintéticos variou em resposta as diferentes fontes de luz, representado no gráfico da Figura 4. Verificou-se que as plântulas expostas ao LED obtiveram médias superiores de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides quando comparadas com as

expostas a FL. Por estar envolvido na biossíntese de clorofila, na abertura estomática e no desenvolvimento dos cloroplastos (VIEIRA, 2015), o espectro azul, presente no LED branco, possivelmente contribuiu para os maiores teores de clorofila encontrados.

Quanto aos carotenoides, sua presença pode conferir vantagens durante a aclimatização, pois atua na fotoproteção das moléculas de clorofila, dissipando o excesso de energia luminosa (RAMEL, et al., 2013; BARBOSA et al., 2014). Victorio et al. (2007) encontraram médias inferiores de pigmentos fotossintéticos no cultivo *in vitro* de *Phyllanthus tenellus*, quando expostos à luz fluorescente branca. Tal resposta também foi relatada para *Stevia rebaudiana* cultivada sob FL em relação ao cultivo em diferentes espectros de LEDs (RAMÍREZ-MOSQUEDA et al., 2016).

Figura 4 - Teor de pigmentos fotossintéticos em plântulas de *Melocactus zehntneri* aos 200 dias de cultivo *in vitro* sob duas fontes de luz (FL e LED) e dois tipos de esterilização do meio de cultura (EF e EQ). Médias seguidas de letras iguais, minúsculas para fontes de luz e maiúsculas para tipos de esterilização, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



FONTE: Próprio autor, 2017

O tipo de esterilização também exerceu influência sobre a biossíntese dos pigmentos, verificando-se maiores teores de clorofila *b* e menores de carotenoides nos tratamentos com EQ em relação aos tratamentos com EF. Não foram encontrados relatos na literatura científica acerca da ação que o tipo de esterilização pode exercer sobre a biossíntese de pigmentos. Contudo, é importante ressaltar que o comportamento foi semelhante para os tratamentos, independentemente da fonte de luz utilizada, sugerindo que o uso de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ no meio de cultura pode alterar o conteúdo de clorofila *b* e carotenoides nas plantas mantidas *in vitro*.

5.2. Efeito da luz e tipo de esterilização sobre a aclimatização e o crescimento *ex vitro*

A taxa de sobrevivência das plantas levadas ao ambiente *ex vitro* para a etapa de aclimatização foi de 100% e, aos 130 dias, as plantas apresentavam desenvolvimento normal (Figura 5). Apesar de ser considerada uma etapa crítica do cultivo *in vitro*, a aclimatização das diferentes espécies de cactáceas tem sido realizada com êxito, uma vez que a suculência do caule minimiza o estresse ocasionado na planta pela perda de água (LEMA-RUMIŃSKA; KULUS, 2014).

Figura 5 - Aclimatização de *Melocactus zehntneri*: (A) plantas no início do processo; (B e C) plantas provenientes dos tratamentos FL + EF e LED + EF, respectivamente, aos 130 dias de aclimatização.



FONTE: Próprio autor, 2017

Quanto aos parâmetros de crescimento, observou-se que o tratamento FL + EQ obteve médias inferiores em relação aos demais tratamentos para a maioria das variáveis analisadas na Tabela 2. Em contrapartida, médias superiores foram verificadas no tratamento LED + EQ, exibindo valores de diâmetro e massa seca da parte aérea superiores ao LED + EF, que havia se apresentado como o melhor tratamento *in vitro*. Este comportamento se deve, provavelmente, ao fato das plantas provenientes da esterilização química não estarem mais sob influência dos compostos clorados, constituintes do meio de cultura utilizado, e demonstra, sobretudo, os efeitos benéficos da iluminação por LEDs, usada durante o cultivo *in vitro*, no processo de aclimatização. Tal efeito já foi descrito para *Saccharum officinarum*, garantindo, inclusive, maior taxa de sobrevivência das plantas (FERREIRA et al., 2017).

Tabela 2 - Crescimento da parte aérea e das raízes de plântulas de *Melocactus zehntneri*, aos 130 dias de aclimatização, oriundas do cultivo *in vitro* sob o efeito da fonte de luz (FL e LED) e do tipo de esterilização do meio de cultura (EF e EQ).

Variáveis	FL		LED	
	EF	EQ	EF	EQ
Altura (cm)	1,30 bB	1,42 Ba	1,54 aA	1,60 aA
Diâmetro (cm)	1,60 aA	1,47 Bb	1,64 aB	1,73 aA
MFPA (g)	1,64 aA	1,56 Ba	1,68 aA	1,82 aA
MSPA (g)	0,119 bA	0,107 Ba	0,133 aB	0,164 aA
CRP (cm)	4,57 aA	3,93 Ab	4,17 aA	4,30 aA
MFR (g)	0,068 bA	0,041 Bb	0,098 aA	0,090 aA
MSR (g)	0,012 bA	0,007 Bb	0,015 aA	0,014 aA

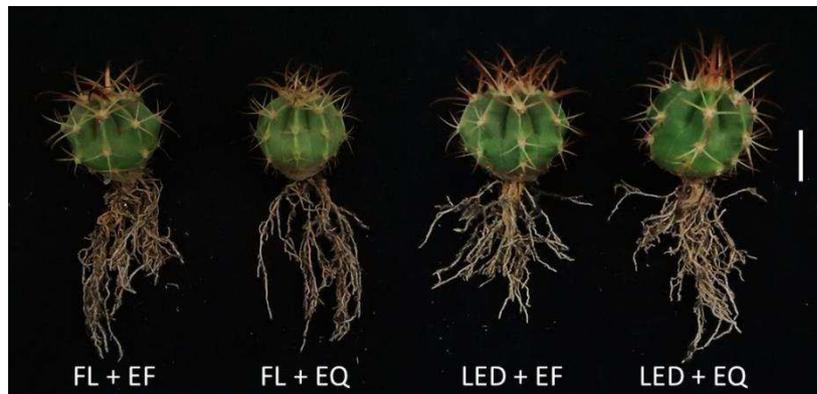
Médias seguidas por letras distintas, minúsculas para fonte de luz e maiúsculas para tipo de esterilização, diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Comprimento da raiz principal (CRP), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca das raízes (MFR), massa seca da parte aérea (MSPA) e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

FONTE: Próprio autor, 2017

As plantas aclimatizadas (Figura 6) exibiram menor altura em relação às plantas *in vitro* (Tabela 1), com exceção do tratamento LED + EQ, uma vez que as condições do cultivo *in vitro* favorecem o alongamento das plantas, enquanto na fase *ex vitro* estas tomam a sua forma natural (globular), apresentando maior aumento no seu diâmetro (Tabela 2). Tais alterações morfométricas podem ser encontradas quando se compara plantas nas fases *in vitro* e *ex vitro* (ZAYOVA et al., 2016). Com relação aos demais parâmetros de crescimento, houve aumento na média das plantas aclimatizadas.

De modo geral, as plantas provenientes dos tratamentos expostos aos LEDs apresentaram melhor desenvolvimento, exibindo médias de crescimento superiores para a maioria dos parâmetros analisados, seja na parte aérea ou radicular, quando comparadas com aquelas provenientes do cultivo *in vitro* sob lâmpadas fluorescentes. Tais resultados deixam evidentes que a qualidade da luz interfere de modo positivo no crescimento e desenvolvimento de *M. zehntneri*, tanto na fase *in vitro* quanto na *ex vitro*, e até de forma mais evidente do que o tipo de esterilização do meio de cultura.

Figura 6 - Aspecto das plântulas de *Melocactus zehntneri*, aos 130 dias de aclimatização, provenientes do cultivo *in vitro* sob o efeito da fonte de luz (FL e LED) e do tipo de esterilização do meio de cultura (EF e EQ). Barra = 1 cm.

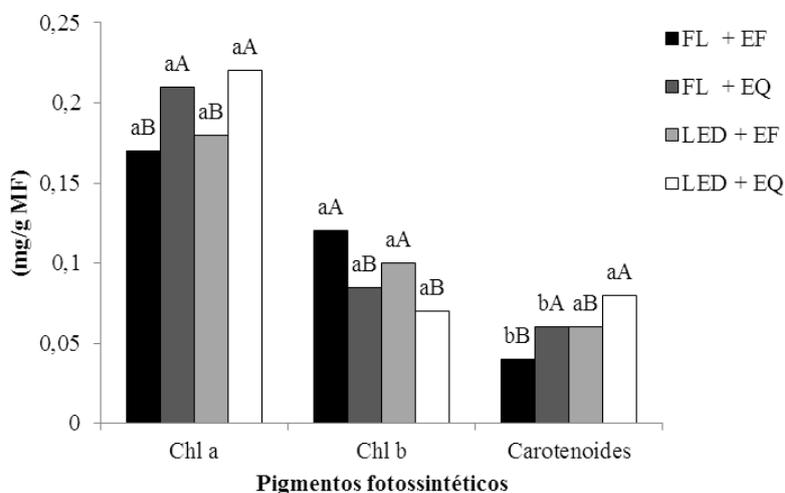


FONTE: Próprio autor, 2017

Oliveira et al. (2015) também não observaram interferência pelo uso de NaClO na avaliação biométrica do abacaxizeiro ‘Vitória’ durante a aclimatização. Segundo estes autores, as plantas oriundas dos meios de cultivo esterilizados quimicamente apresentaram desempenho semelhante àquelas cultivadas nos meios autoclavados.

Em relação aos teores de pigmentos fotossintéticos observou-se, no ambiente *ex vitro*, respostas contrárias daquelas obtidas *in vitro*, uma vez que o tipo de esterilização proporcionou maiores diferenças entre os tratamentos do que a fonte de luz, a qual interferiu apenas no conteúdo de carotenoides (Figura 7). Este foi maior nas plantas provenientes do cultivo em LEDs, apesar destas estarem há 130 dias sob as mesmas condições de iluminação em casa de vegetação. Quanto ao tipo de esterilização, a EQ resultou em maiores teores de clorofila *a* e de carotenoides. Contrariamente, Oliveira et al. (2015) não relataram influência do tipo de esterilização utilizado no cultivo *in vitro* no desempenho fotossintético das plantas após 90 dias de aclimatização.

Figura 7 - Teor de pigmentos fotossintéticos em plântulas de *Melocactus zehntneri*, aos 130 dias de aclimatização, oriundas do cultivo *in vitro* sob duas fontes de luz (FL e LED) e dois tipos de esterilização do meio de cultura (EF e EQ). Médias seguidas de letras iguais, minúsculas para fontes de luz e maiúsculas para tipos de esterilização, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



FONTE: Próprio autor, 2017

Alterar as condições ambientais, em particular mudanças na intensidade e qualidade de luz, pode induzir respostas de curto e longo prazo no conteúdo de pigmentos e no processo fotossintético (SOUZA et al., 2011; FOYER, 2012). Diferentemente do observado neste trabalho, o teor de clorofilas e carotenoides geralmente aumenta na fase de aclimatização (EL-MAHROUK et al., 2016; FERREIRA et al., 2017). Contudo, o fato das plantas terem acumulado mais pigmentos em menores irradiâncias (*in vitro*) pode ser atribuído a uma característica das plantas de sol, como é o caso do *M. zehntneri*. Estas geralmente apresentam menor quantidade de moléculas de clorofila por cloroplasto, pois não necessitam investir na produção de pigmentos para captar energia luminosa em um ambiente saturado por luz (OLIVEIRA et al., 2010). Ademais, Oliveira et al. (2010) afirmam que mesmo as plantas apresentando uma baixa taxa fotossintética em condições *in vitro*, o suprimento de carbono exógeno, provido pela sacarose adicionada ao meio de cultura, também pode elevar a biossíntese de clorofila.

A luz emitida pelos LEDs é um fator que influencia positivamente no crescimento e desenvolvimento *in vitro* de *M. zehntneri*, favorecendo também a sua aclimatização. Do mesmo modo, pode-se utilizar a esterilização química do meio de cultura com $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ como forma de reduzir os custos de produção. Contudo, destaca-se que este tipo de esterilização reduz o crescimento das plantas, o que pode ser minimizado quando estas são mantidas sob LEDs.

6. CONCLUSÃO

Quanto à germinação, não houve diferença para as fontes de luz e o tipo de esterilização utilizado, observando-se ainda a ausência de contaminação e de fitotoxicidade pela adição de hipoclorito de cálcio (0,01%) ao meio de cultura.

Na fase *in vitro*, a combinação dos fatores LED + EF permitiu maior crescimento das plântulas e maiores teores de clorofila *a* e carotenoides.

Já na fase *ex vitro*, maior crescimento e biossíntese dos pigmentos citados foram obtidos no tratamento LED + EQ.

REFERÊNCIAS

- ALTAFÍN, V.L. et al. **Semeadura *in vitro* de orquídeas para propagação massal**. Boletim Técnico nº 7. Fundação pinhalense de ensino - Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal – SP. 2003.
- ALVES, J.J.A. Caatinga do Cariri Paraibano. **Geonomos**, v.17, n.1, p.19-25, 2009.
- AMOOZGAR, A.; MOHAMMADI, A.; SABZALIAN, M.R. Impact of light-emitting diode irradiation on photosynthesis, phytochemical composition and mineral element content of lettuce cv. Grizzly. **Photosynthetica**, v.87, n.1, p.85-95, 2017.
- ANDERSON, E.F. **The Cactus Family**. Portland: Timber Press, 776 p, 2001.
- ANDRADE, C. T. S.; MARQUES, J. G. W.; ZAPPI, D.C. Utilização medicinal de cactáceas por sertanejos baianos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.3, p.36-42, 2006.
- ANSELMO, G.C; et al. Estudo de fitoinvasores cearenses. **62ª reunião anual da SBPC, Ciências do Mar: herança para o futuro**, 2010.
- ARAÚJO, A. G. D. et al. Qualidade de luz na biometria e anatomia foliar de plântulas de *Cattleya loddigessi* L. (Orchidaceae) micropropagadas. **Ciência Rural**, v.39, n,9, p.2506-2511, 2009.
- ARAÚJO, K.D. Uso de espécies da caatinga na alimentação de rebanhos no município de São João do Cariri, PB. **RA'EGA**, v.20, n.1, p.157-171, 2010.
- BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.
- BELLO-BELLO, J.J. et al. Light-Emitting Diodes: Progress in Plant Micropropagation. In: **Chlorophyll**. JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q.; QUEIROZ, M. I. (Org.). Rijeka: INTECH, 2017. p.93-103.
- 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.
- BRANDÃO, G.H.A. et al. Extraction of bioactive alkaloids from *Melocactus zehntneri* using supercritical fluid, **Journal Supercritical Fluids**. No prelo. 2016.

- BRONDANI, G. E. et al. Chemical sterilization of culture medium: a low cost alternative to *in vitro* establishment of plants. **Scientia Forestalis**, v.41, n.98, p.257- 264, 2013.
- BUDIARTO, K. Spectral quality affects morphogenesis on *Anthurium* plantlet during *in vitro* culture. **Agrivita**, v.32, n.3, p.234–240, 2010.
- CARDOSO, J.C. Publicação em cultivo *in vitro* de plantas: qualidade para o avanço científico e tecnológico. **Horticultura Brasileira**, v.32, n.4, p.383-384, 2014.
- CARLONI, E. et al. Somatic embryogenesis from *in vitro* anther culture of apomictic buffel grass genotypes and analysis of regenerated plants using flow cytometry. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 117, n.3, p.311–322, 2014.
- CHAVES, E.M.F.; BARROS, R.F.M. Cactáceas: Recurso Alimentar Emergencial No Semiárido, Nordeste Do Brasil; **Gaia Scientia**, v. 9, n. 2, p.129-135, 2015.
- CHEN, S. et al. *In vitro* selection of glyphosate-tolerant variants from long-term callus cultures of *Zoysia matrella* [L.] Merr. P. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.111, n.2, p.199–207, 2012.
- CIVATTI, L.M.; MARCHI, M.N.G.; BELLINTANI, M.C. Micropropagation of two species of *Micranthocereus* (Cactaceae) with ornamental potential native to Bahia, Brazil. **African Journal of Biotechnology**, v.16, n.14, p.749-762, 2017.
- COELHO, P.J.A.; JÚNIOR, S.C.F.; NASCIMENTO, E. Coleta e conservação *ex situ* de cactáceas nativas do estado do Ceará; **Gaia Scientia**, v.9, n.2. p.183-192, 2015.
- CORREIA, A. A. S. et al. Caracterização química e físico-química da polpa do noni (*Morinda citrifolia*) cultivado no estado do Ceará. **Alimentos e Nutrição**, v.22, n.4, p.609-615, 2011.
- DAMASCENO, M.M.; SOUTO, J.S.; SOUTO, P.C. Etnoconhecimento de espécies forrageiras no semi-árido da Paraíba, Brasil. **Engenharia Ambiental**, v.7, n.3, p.219-228, 2010.
- DIAS, M.M. et al. Reguladores de crescimento na emergência e desenvolvimento *in vitro* de *Melocactus bahiensis*. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v.7, n.1, p.7-11, 2013.

EL-MAHROUK, M.E. et al. Effect of photosynthetic photon flux density on growth, photosynthetic competence and antioxidant enzymes activity during *ex vitro* acclimatization of *Dieffenbachia* cultivars. **Plant growth regulation**, v.79, n.1, p 29-37, 2016.

FERREIRA, L.T. et al. Germinação *in vitro* de gongora (Orchidaceae) em meios nutritivos simplificados. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, v.12, n.1, p.20-26, 2016.

FERREIRA, L.T. et al. Using LED lighting in somatic embryogenesis and micropropagation of an elite sugarcane variety and its effect on redox metabolism during acclimatization. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.128, n.1, p.211–221, 2017.

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

FONTES, A.A. **Desinfestação química para semeio e recultivo *in vitro* de orquídeas e sua influência sobre a nutrição das plântulas.** Dissertação de mestrado – Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas - UFV. p.35, 2011.

FOYER, C.H. et al. Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. **Journal of Experimental Botany**, v.63, n.4, p.1637-61, 2012.

FRÁGUAS, C.B. et al. Micropropagation of fig (*Ficus carica*) 'Roxo de Valinhos' plants. ***In vitro Cellular and Developmental Biology- Plant***, v.40, n.5, p.471-474, 2004.

GORELICK, R. Morphology and development of sunken terminal cephalium in *Discocactus* (Cactaceae). **Madroño**, v.61, n.2, p.194-200, 2014.

GUIMARÃES, D.T. et al. **Germinação *in vitro* e desenvolvimento inicial de coroa-de-frade (*Melocactus zehntneri*).** In: Congresso Nacional de pesquisa e ensino em ciências, Campina Grande, 2016.

GUIMARÃES, D.T. et al. Uso de LED branco no cultivo *in vitro* de mandacaru. **CONIDIS**, v.1, p.1-11, 2016.

GUPTA, S.D.; JATOTHU, B. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. **Plant Biotechnology Reports**, v.7, n.3, p.211-220, 2013.

HERMAYANI, N.; RETNONINGSIH, A.; RAHAYU, E.S. Optimizing sterilization techniques and callus induction of nodes *Durio zibethinus* Murr *in vitro* method with various media; **The 3rd International Conference on Mathematics, Science and Education**, 2016.

HUCHÉ-THÉLIER, L. et al. Light signaling and plant responses to blue and UV radiations— Perspectives for applications in horticulture. **Environmental and Experimental Botany**, v.121, n.1, p.22–38, 2016.

HUNT, D. **The new cactus lexicon. The text**. Milborne Port: DH Books, 373p, 2006.

KIM, S. J. et al. Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chysanthemum plantlets *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.101, n.1-2, p.143-151, 2004.

LEMA-RUMIŃSKA, J.; KULUS, D. Micropropagation of cacti: a review. **Haseltonia**, v.19, n.1, p. 46-63. 2014.

LIMA, R.M.B. **Efeitos da substituição do milho por palma forrageira (Gigante e Miúda) sobre o comportamento ingestivo e respostas fisiológicas de vacas mestiças sob confinamento**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2002. 66 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2002.

LIMA-SILVA, J.K. **Comercialização de cactáceas e bromeliáceas nativas no sertão de Pernambuco: dados preliminares**. IXJEPEX – UFRPE. 2009.

LUCENA, C.M. et al. Conhecimento Botânico Tradicional Sobre Cactáceas No Semiárido Do Brasil; **Gaia Scientia**, v.9, n.2, p.77-90, 2015.

LUCENA, C.M. et al. Uso e conhecimento de cactáceas no município de São Mamede (Paraíba, Nordeste do Brasil). **Revista de Biologia e Farmácia (Biofar)**, v. Especial, p. 121-134. 2012.

MEIADO, M.V. Germinação de sementes de cactos do Brasil: fotoblastismo e temperaturas cardeais. **Informativo ABRATES**, v.22, n.3, p.20-23, 2012

MENEZES, M.O.T. et al. Diversity and distribution of Cactaceae in Ceará state, North-eastern Brazil. **Bradleya**, v. 29, n.1, p.13-42, 2011.

MENEZES, M.O.T.; TAYLOR, N.P.; LOIOLA, M.I.B. Flora do Ceará, Brasil: Cactaceae; **Rodriguésia**, v. 64, n.4, p.757-774, 2013.

MIYOSHI, K.; MASAHIRO, M. Stimulatory effects of sodium and calcium hypochlorite, pre-chilling and cytokinins on the germination of *Cypripedium macranthos* seed *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v.102, n.4, p.481-486, 1998.

MORINI, S.; MULEO, R. Effects of light quality on micropropagation of woody species. In: JAIN, S.M.; ISHII, K. **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p.3-35.

MORO, M.F. et al. A phytogeographical metaanalysis of the semiarid Caatinga domain in Brazil. **Botanical Review**, v.82, n.1, p.91-148, 2016.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-479, 1962.

MURUGAN, K.; ASWATHY, J.M.; DINESH BABU, K.V. *In vitro* seeds germination and seedling growth of *Begonia malabarica* Lam. (Begoniaceae) a source for anthocyanin. **Advances in Biochemistry and Biotechnology**. v.2016, n.1, p.1-7, 2016.

MWEETWA, A.M.; WELBAUM, G.E.; TAY, D. Effects of development, temperature, and calcium hypochlorite treatment on *in vitro* germinability of Phalaenopsis seeds. **Scientia Horticulturae**, v.117, n.3, p.257–262, 2008.

NANO, C.A.O. **101 Cactus del Perú**. Lima: Ministerio del Ambiente, 2011, 256 p.

NASCIMENTO, L. B. S. et al. Increased antioxidant activity and changes in phenolic profile of *Kalanchoe pinnata* (Lamarck) Persoon (Crassulaceae) specimens grown under supplemental blue light. **Photochemistry Photobiology**, v.89, n.2, p.391–399, 2013.

NEPOMUCENO, C.F et al. Germinação *in vitro* de *Hyptis leucocephala* Mart. ex Benth. e *Hyptis platanifolia* Mart. ex Benth. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v.16, n.4, p. 886-895, 2014.

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, n.1, p.43-52, 2003.

NOBEL, P.S. **Cacti: Biology and uses**. Berkeley and Los Angeles, University of California Press. 2002.

- NUNES, A.T. et al. Local knowledge about fodder plants in the semi-arid region of Northeastern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.11, n.12, p.1-12, 2015.
- NUNES, E.N. et al. Cuantificación fisicoquímica en gorro turco [*Melocactus zehntneri* (Britton & Rose) Luetzelburg - Cactaceae]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.18, n.1, p.81-88, 2016.
- OLIVEIRA, A.M.G. et al. Adubação N-K no abacaxizeiro ‘BRS Imperial’ – I – Efeito no desenvolvimento e floração da planta. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.37, n.3, p.755-763, 2015.
- OLIVEIRA, I.R.S. et al. Crescimento inicial do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) em função da salinidade de água de irrigação. **Caatinga**, v.23, n.4, p.40-45, 2010.
- OLIVEIRA, R.P.; ROCHA, P.S.G.; SCIVITTARO, W.B. Multiplicação *In vitro* De Bananeira Utilizando Leds; **XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura**; Bento Gonçalves-RS, 2012.
- OYEBANJI, O.B. et al. Simple, effective and economical explants- surface sterilization protocol for cowpea, rice and sorghum seeds. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n. 20, p.5395-5399, 2009.
- PAULINO, R.C. et al. Conhecimento sobre plantas medicinais entre alunos da Universidade Federal do Semiárido, Mossoró, RN. **Revista Verde**, v.6, n.4, p.78-90, 2011.
- PEIXOTO, L.; FERNANDEZ, V.; MUSTO, H. The effect of expression levels on codon usage in *Plasmodium falciparum*. **Parasitology**, v.128, n.3, p.245–251, 2004.
- PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E. et al. Tissue culture of ornamental cacti. **Scientia Agricola**. v.72, n.6, p.540-561, 2015.
- RAMEL, F.; MIALOUNDAMA, A.S.; HAVAUX, M. Nonenzymic carotenoid oxidation and photooxidative stress signalling in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.64, n.3, p.799–805, 2013.
- RAMÍREZ-MOSQUEDA, M.A.; IGLESIAS-ANDREU, L.G.; BAUTISTA-AGUILAR, J.R. The effect of light quality on growth and development of *in vitro* plantlet of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Sugar Tech**, v.19, n.3, p.1-6, 2016.

REIS, M.V. et al. Germinação *in vitro* e desenvolvimento pós-seminal de plântulas de *Pilosocereus aurisetus* (Werderm.) Byles & G.D. Rowley (Cactaceae). **Revista Ceres**, v. 59, n. 6, p.739-744, 2012.

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

RESENDE, S.V.; LIMA-BRITO, A.; SANTANA, J.R.F. **Obtenção de explantes de *Melocactus glaucescens* Buining & Brederoo (Cactaceae) por meio da germinação *in vitro*;** 60º Congresso Nacional de Botânica; Feira de Santana-BA-Brasil; 2009

REZENDE, R. K. S. et al. Organogênese em capítulos florais e avaliação de características anatômicas da folha de *Gerbera jamesonni* Adlam. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.3, p. 821-827, 2008.

RIBEIRO, J. M.; CANUTO, K.M.; VESCHI, J.L. **Compostos clorados: Aspectos gerais e sua utilização como agente sanitizante na agricultura, micropropagação e pecuária.** Embrapa Semi-Árido. Petrolina: Embrapa – CPATSA – Documentos 207, 2008.

RIBEIRO, J.M.; PINTO, M.S.T.; TEIXEIRA, S.L. **Alternativas para a Redução de Custos na Produção de Mudas *In vitro*;** Embrapa Semi-Árido. Petrolina: Embrapa – CPATSA – Documentos 256, 2013.

ROCHA, P.S.G. et al. Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. **Ciência Rural**, v.40, n.9, p.1922-1928, 2010.

SAJEVA, M. et al. **CITES and Cacti a user's guide.** Kew Publishing, Royal Botanic Gardens, Kew, 2012.

SANTOS-SEREJO, J.A. **Meios nutritivos para micropropagação de plantas. Introdução à micropropagação de plantas.** 1.ed. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p.80-98.

SHI, Y. et al. Effects of sterilization treatments on the analysis of TOC in water samples. **Journal of Environmental Science**, v.22, n.5, p. 789–795, 2010.

SILVA, A. S. et al. Avaliação da composição físico-química da coroa-de-frade. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.5, n.2, p.1-8, 2005.

SILVA, M.M.A.; FERREIRA, L.T. **Cultivo *in vitro* de plantas e suas aplicações em cactáceas.** Campina Grande: INSA, 2016. 32p.

SILVA, S.R. et al. **Plano de ação nacional para conservação das cactáceas.** Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBIO – Brasília. Série espécies ameaçadas nº 24, 112p., 2011.

SINGH, B. et al. Developing a screening tool for osmotic stress tolerance classification of rice cultivars based on *in vitro* seed germination. **Crop Science**, v.57, n.1, p.387-394, 2017.

SOUZA, A.S.; JUNGHANS, T.G. **Introdução à micropropagação de plantas.** Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006, 152p.

SOUZA, G.S. et al. Teores de pigmentos fotossintéticos, taxa de fotossíntese e estrutura de cloroplastos de plantas jovens de *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker cultivadas sob malhas coloridas. **Semina** 32: 1843-1854. 2011.

TAYLOR, N. et al. **Cactaceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015.

TAYLOR, N.E.; ZAPPI, D. **Cacti of Eastern Brazil.** Royal Botanic Gardens: Kew, UK, 2004. 499p.

TEIXEIRA, S.L. et al. Esterilização de meios nutritivos para cultura de tecidos vegetais, pela combinação de esterilizantes químicos e forno de microondas. **Revista Ceres**, v.52, n.301, p.343-349, 2005.

TEIXEIRA, S.L.; SOUSA, R.T.S.; TEIXEIRA, M.T. Esterilização de meios nutritivos para cultura de tecidos vegetais em forno de microondas. **Revista Ceres**, v. 52, n.302, p.499-507, 2005b.

TEIXEIRA, S.L.; RIBEIRO, J.M.; TEIXEIRA, M.T. Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv Smooth cayenne) behavior. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, n. 3, p. 375-378, 2006.

TEIXEIRA, S.L.; RIBEIRO, J.M.; TEIXEIRA, M.T. Utilização de hipoclorito de sódio na esterilização de meio de cultura para multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus pellita* L. **Ciência Florestal**, v.18, n.2, p.185-191, 2008.

TIWARI, A. K. et al. Screening of Some Chemical Disinfectants for Media Sterilization during *In vitro* Micropropagation of Sugarcane. **Sugar Tech**, v.14, n.4, p.364–369, 2012.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, 1998. v.1, 509p.

VETTEN, M.A. et al. Challenges facing sterilization and depyrogenation of nanoparticles: Effects on structural stability and biomedical applications. **Nanomedicine**, v. 10, n.7, p.1391–1399, 2014.

VICTORIO, C.P. et.al. Qualidade de Luz e Produção de Pigmentos Fotossintéticos em Plantas *In vitro* de *Phyllanthus tenellus* Roxb. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 213-215, 2007.

VIEIRA, L. **Transpiração vegetal**. Estudo Fácil. 2015.

YANAGAWA, T. et al. Application of disinfectants to orchid seeds, plantlets and media as a means to prevent *in vitro* contamination. **Lyndleyana**, v.10, n.1, p.33-36, 1995.

ZAYOVA, E. et al. Comparative study of *in vitro*, ex vitro and in vivo propagated *Salvia hispanica* (Chia) plants: morphometric analysis and antioxidant activity. **AgroLife Scientific Journal**, v.5, n.2, p.166-174, 2016.

ZHAO, L. et al. Plant regeneration from the embryogenic calli of five major *Miscanthus* species, the non-food biomass crops. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.49, n.4, p383–387, 2013.