

# CULTIVO *IN VITRO* DE *CEREUS HILDMANNIANUS* K. SHUM

Daniel Fernandes Langer\*  
Rafael Andre Mergener\*\*

## Resumo

O *Cereus hildmannianus* é uma espécie de cactos nativo da região Sul do Brasil, o qual produz um fruto carnoso, grande, vermelho, sem espinhos, com propriedades antioxidantes e sabor agradável, sendo consumido de diferentes formas (*in natura* sucos e bolos). Este trabalho teve como objetivo realizar o estabelecimento e a proliferação *in vitro* de *Cereus hildmannianus*. Sementes extraídas de frutos maduros foram submetidas a 15 tratamentos antissépticos que variaram quanto às concentrações e tempos de imersão das sementes em hipoclorito de sódio e álcool 70%. Estas sementes foram inoculadas em meio MS avaliando-se os percentuais de contaminação e germinação de sementes. Após esta germinação, as sementes foram submetidas a tratamentos proliferativos em meio MS suplementado com 11 variações de BAP e AIB durante um período de 80 dias. Os agentes assépticos utilizados se mostraram eficientes no processo de eliminação de agentes contaminantes permitindo condições ideais à germinação das sementes de *Cereus hildmannianus* que alcançaram percentuais germinativos de 81% aos 60 dias de cultivo *in vitro*. O meio MS contendo 0,5 mg/L de AIB e 2 mg/L de BAP apresentou os melhores resultados proliferativos com média de 3 brotos/explante aos 80 dias de cultivo *in vitro*.

Palavras-chaves: Cactácea. Cultivo *in vitro*. *Cereus hildmannianus*.

## 1 INTRODUÇÃO

O *Cereus hildmannianus* é uma espécie da família das cactáceas encontrada em ambientes naturais de Santa Catarina, incluindo a região do Meio-Oeste (SCHEINVAR; REITZ, 1985). Esta espécie possui um fruto conhecido como tuna, o qual apresenta uma bela aparência e sabor, possuindo excelente potencial ornamental e comercial, seguindo o exemplo de seu parente, a *Opuntia ficus indica*, a qual é bastante difundida e comercializada. A vantagem do *Cereus hildmannianus* em relação às demais espécies de cactáceas, se deve à ocorrência natural na região Sul, possuindo características de interação com a fauna e a flora (BRUXEL e JASPER, 2005). Além da importância ecológica, o *Cereus hildmannianus* se destaca por sua aptidão agrícola, podendo ser cultivado onde as atividades agrícolas são dificultadas pelo solo raso, pedregoso e com escassez de água (PILETTI, 2011). Frente à sua importância e à falta de informações sobre a multiplicação da espécie, tornam-se relevantes estudos voltados à propagação desta espécie visando à produção de plantas de alta qualidade em um curto espaço de tempo, conforme Abreu e Pedrotti (2003).

\* Acadêmico do Curso de Ciências Biológicas da Universidade do Oeste de Santa Catarina de Joaçaba; danielxw3@gmail.com

\*\* Mestre em Recursos Genéticos Vegetais; Professor orientador do Curso de Ciências Biológicas e Agronomia da Universidade do Oeste de Santa Catarina de Joaçaba e Campos Novos; rafael.mergener@unoec.edu.br

Os trabalhos já realizados referentes à germinação *in vitro* de cactáceas demonstram que esta é uma forma rápida e segura para a produção de explantes, visando, principalmente, ao maior aproveitamento do material, podendo ser uma técnica muito eficiente na recuperação de espécies ameaçadas de extinção, situação vivida por 28 táxons das cactáceas (SILVA et al., 2010). Bons resultados de sementes cultivadas *in vitro* (desinfestação e germinação) foram relatados por Santos et al. (2012) que trabalhou com *Cereus albicaulis* da mesma forma como Correia et al. (2011); Reis et al. (2012); Coelho (2009) e Silva (2006). Posteriormente à germinação das sementes *in vitro* e à formação de microplantas *in vitro*, é possível promover o estímulo deste material de forma a produzir uma quantidade expressiva de plantas clonadas a partir das plantas originais. Segundo Silva et al. (2010) essa proliferação de mudas *in vitro* é importante para a produção em larga escala destas mudas a partir de apenas um espécime, permitindo um desenvolvimento mais rápido das plantas. Para a proliferação de novas plantas se faz necessário o uso de reguladores de crescimento, estando a proliferação das plantas diretamente ligadas aos sinais químicos fornecidos pelos reguladores de crescimento. No cultivo *in vitro* estes reguladores são substâncias sintéticas com características similares aos hormônios vegetais que, em diferentes concentrações, direcionam o processo morfogênético, estimulando a produção de brotos (FARIAS et al., 2012). Este trabalho teve como objetivo encontrar a melhor assepsia para o estabelecimento *in vitro* de sementes de *Cereus hildmannianus* e identificar a dose ideal de reguladores de crescimento à proliferação *in vitro* da espécie, garantindo eficiência na produção de mudas.

## 2 MATERIAL E MÉTODO

O trabalho foi realizado no Laboratório de Micropropagação Vegetal da Universidade do Oeste de Santa Catarina (Unoesc) de Joaçaba. Plantas situadas no município de Anita Garibaldi, SC serviram como matrizes para coleta de frutos de *Cereus hildmannianus* durante o mês de abril de 2012. Estes frutos coletados foram embalados e encaminhados ao Laboratório de Micropropagação Vegetal da Unoesc Joaçaba e armazenados em geladeira por um período de 30 dias. Após, as sementes foram retiradas e lavadas em água corrente para a eliminação da polpa e limpeza destas. Posteriormente, foram secas em temperatura ambiente por um período de 48 horas e preparadas para a inoculação. As sementes do *Cereus hildmannianus* foram submetidas a tratamentos assépticos constituídos por T1=MS, NaCLO 25% 5 minutos; T2=MS, NaCLO 25% 10 minutos; T3=MS, NaCLO 25% 15 minutos, T4=MS, NaCLO 25% 20 minutos; T5=MS, NaCLO 50% 5 minutos; T6=MS, NaCLO 50% 10 minutos; T7=MS, NaCLO 50% 15 minutos; T8=MS, NaCLO 50% 20 minutos; T9=MS, NaCLO 75% 5 minutos; T10=MS, NaCLO 75% 10 minutos; T11=MS, NaCLO 75% 15 minutos; T12=MS, NaCLO 75% 20 minutos; T13=MS, NaCLO 100% 5 minutos; T13=MS, NaCLO 100% 10 minutos; T13=MS, NaCLO 100% 15 minutos.

Cada tratamento foi constituído de 15 repetições (frascos) com 10 sub-repetições (sementes). Após assepsia, as sementes foram transportadas à câmara de fluxo laminar (em álcool 70%) lavadas em água destilada autoclava e inoculadas em meio de cultura (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com pH ajustado em 5,8 e suplementados com 7 g/L de ágar e 30 g/L de sacarose. Foram avaliadas porcentagens de germinação e contaminação aos 15, 30, 45 e 60 dias de cultivo (DC).

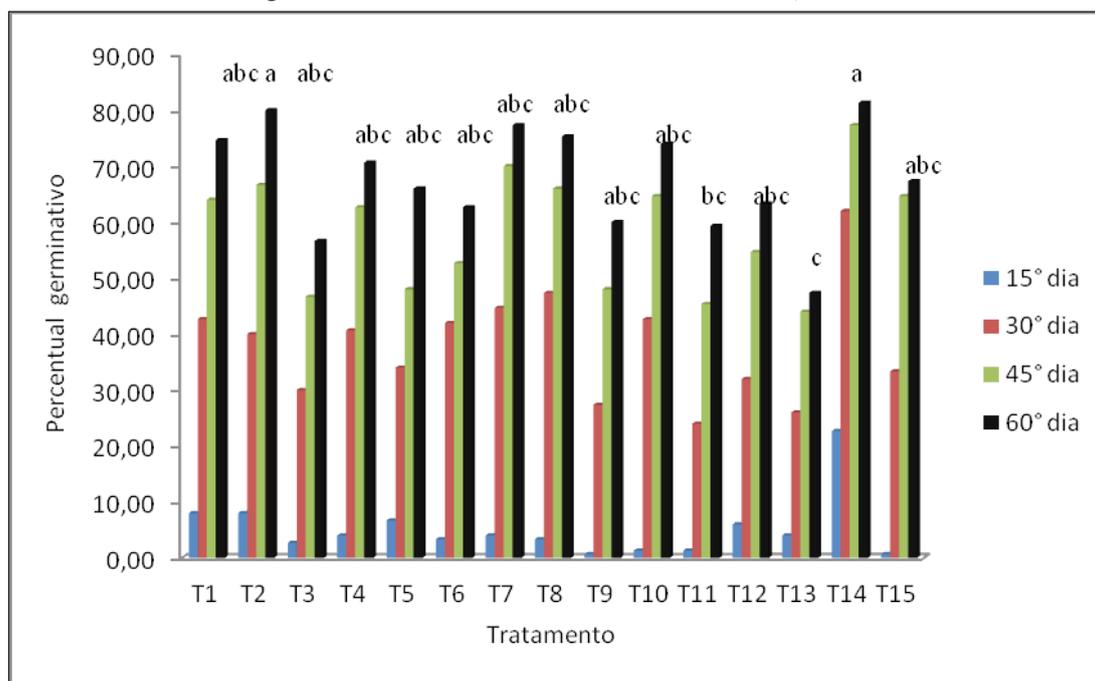
Após a conclusão da fase germinativa das sementes, os explantes foram transferidos para meio MS (1962) com pH 5,8, suplementados com sacarose 30 g/L, ágar 7g/L, os quais permaneceram por mais 30 dias até atingirem tamanho médio de 1,5 cm. Os explantes foram submetidos a tratamentos proliferativos por meio de combinações entre auxinas (ANA) e citocininas (BAP), constituindo 11 tratamentos, sendo o T1=MS, (BAP 0,5 mg/L); T2= MS, (BAP 1 mg/L); T3=MS, (BAP 1,5 mg/L); T4=MS, (BAP 2 mg/L); T5=MS, (BAP 2,5 mg/L); T6=MS, (BAP 0,5 mg/L + AIB 0,5 mg/L); T7=MS, (BAP 1 mg/L + AIB 0,5 mg/L); T8=MS, (BAP 1,5 mg/L + AIB 0,5 mg/L); T9=MS, (BAP 2 mg/L + AIB 0,5 mg/L); T10=MS, (BAP 2,5 mg/L + AIB 0,5 mg/L) e T11=MS. Cada tratamento foi composto por 10 repetições. As avaliações foram realizadas ao 50° e 80° DC, sendo observadas variáveis quantitativas como o número de brotos e o tamanho dos explantes.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os dados obtidos, submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de separação de médias (Tukey 5%).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para a contaminação de sementes não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos assépticos estudados. O percentual médio de sementes contaminadas por fungos e bactérias foi de 9,65%, sendo este percentual similar (8,14%) ao encontrado por Correia et al. (2011) e inferior ao encontrado por Santos (2011), que foi de 31,9%. O baixo índice de contaminação possivelmente está associado à metodologia aplicada na coleta, extração e manipulação das sementes, bem como pelos agentes assépticos (hipoclorito e álcool) utilizados e suas concentrações para a assepsia do material. O hipoclorito de sódio penetra na parede celular do agente infestante (fungo, bactéria), causando alterações no metabolismo celular (ESTRELA et al., 2002) e morte do agente infestante. Este agente vem sendo utilizado de forma eficiente em sementes de cactáceas por Arnuti (2008), Tombosi e Renner (2008) e Borges (2003), afirmando a eficiência deste na assepsia. Nos tratamentos utilizados para a germinação de sementes foram identificadas diferenças significativas (ANOVA 5%). A germinação teve início ao 7° DC em que foram identificados percentuais germinativos de 22,7% para o tratamento T14 após o 15 DC. O tratamento T14 apresentou incremento no percentual germinativo totalizando 81% aos 60° DC, conforme o Gráfico 1.

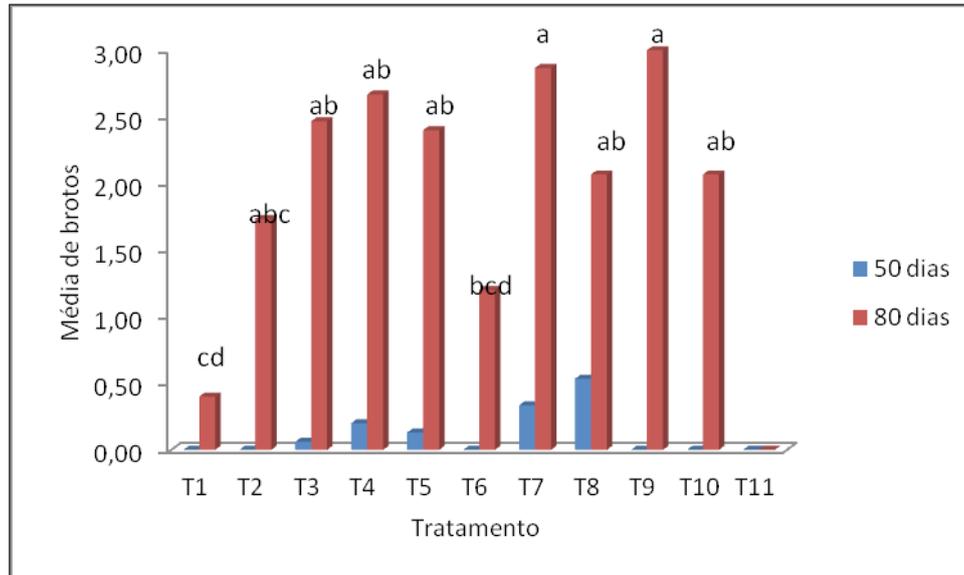
Gráfico 1 – Percentual germinativo de sementes do *C. hildmannianus*, durante 60 DC *in vitro*



Fonte: os autores.

O alto percentual germinativo é característico das cactáceas, pois percentuais similares podem ser encontrados na germinação *in vitro* de diversas espécies. Reis (2012) armazenou sementes por um período de 19 meses e as sementes de *P. aurisetus* apresentaram 90% de germinação, o que pode ser considerada alta percentagem, dado o longo período de armazenamento. O alto índice de germinação obtido no presente trabalho se mostra superior aos trabalhos de Arnuti (2008) e Rubio et al. (2005), que tiveram percentuais germinativos inferiores aos 81% do presente estudo. A germinação *in vitro* tem mostrado grande eficiência à germinação, o que não ocorre com tanta eficiência para a germinação *ex vitro*, a qual obtém taxas germinativas inferiores que variam de 4 a 20% (SILVA, 2006; SANTOS et al., 2012), pois muitas vezes as condições de umidade e nutrientes não são adequadas, totalizando grande perda de sementes.

Os resultados referentes à proliferação de brotos indicaram diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA 5%) estudados, sendo o tratamento T9=MS, (BAP 2,0 mg/L + AIB 0,5 mg/L) o mais produtivo, com média de três brotos por planta ao final do 80º dia, conforme o Gráfico 2.

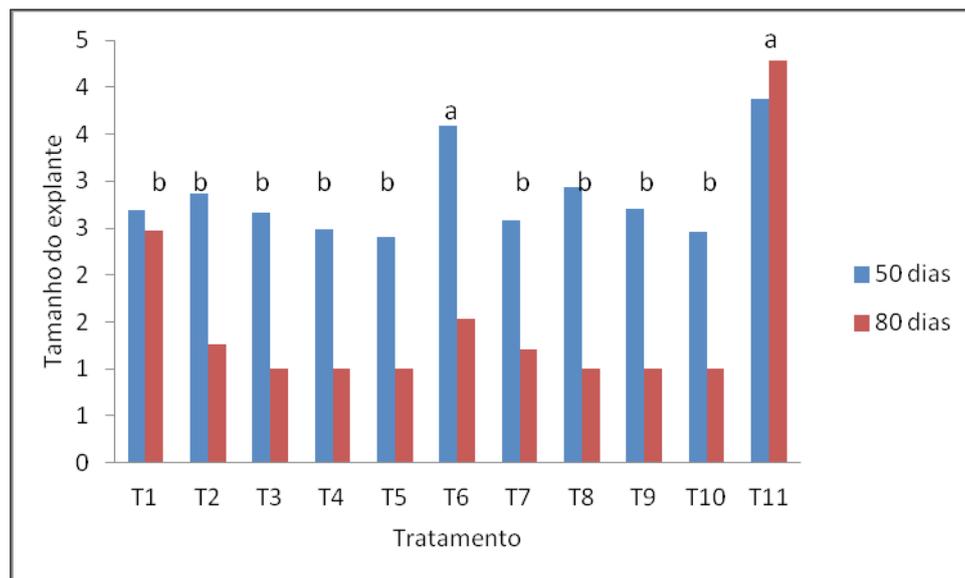
Gráfico 2 – Média de brotos de *C. hildmannianus*, em 11 tratamentos proliferativos aos 50 e aos 80 DC

Fonte: os autores.

As concentrações mais promissoras presentes nos tratamentos T4 e T9 são semelhantes às usadas por Frota et al. (2004) (2 e 0,25 mg/L de BAP e AIA) na proliferação de brotos de *Opuntia ficus-indica*. No entanto, Dabekausen et al. (1990) obtiveram os melhores índices de proliferação para *Sulcorebutia Alba-Rausch* quando utilizaram as concentrações de 1 mg/L de BAP; Vasconcelos et al. (2007) utilizaram essa dosagem de BAP e também obtiveram as melhores taxas proliferativas para *Nopalea cochenilifera*. Salm et al., (2008), entretanto, utilizaram a mesma concentração para a micropropagação de *Opuntia ficus-indica* e não obtiveram resultados satisfatórios. Essas variações de produtividade podem ser corrigidas por meio de diversos fatores como potencial osmótico, irradiação e temperatura e níveis de sacarose que são diferentes para cada espécie (DABEKAUSSEN et al., 1998). As grandes diferenças nas concentrações de fito-hormônios em que os explantes foram expostos mostraram grande diferença em relação ao tamanho, número de brotos e número de raízes, deixando claro que deve haver um equilíbrio hormonal para maior sucesso proliferativo ou de crescimento.

Em relação ao tamanho dos explantes foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos estudados. O tratamento T11 composto por meio MS sem adição de fitorreguladores foi o mais promissor para o crescimento do explante, apresentando altura média de 4,28 cm conforme o Gráfico 3. Este é um fator muito importante, pois uma maior parte aérea propicia um maior número de gemas meristemáticas. Outra alternativa que visa a uma maior produção de brotos está relacionada à forma em que o explante é inoculado; quando feito longitudinal ajuda a quebrar a dormência apical, assim, as gemas auxiliares são mais estimuladas, podendo gerar uma maior quantidade de brotos (MOHAMED-YASSEEN, 2002).

Gráfico 3 – Tamanho médio de *C. hildmannianus*, em onze tratamentos proliferativos aos 50 e 80 DC



Fonte: os autores.

#### 4 CONCLUSÃO

Os agentes assépticos utilizados em diferentes concentrações e tempos de imersão das sementes se mostraram eficientes no processo de eliminação de agentes contaminantes, permitindo percentuais germinativos de *Cereus hildmannianus* de 81% aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

O tratamento 9 contendo 0,5 mg/L de AIB e 2 mg/L de BAP apresentou as melhores taxas proliferativas de brotos (3 brotos/explante) aos 80 dias de cultivo *in vitro*.

#### Abstract

*The Cereus hildmannianus is a specie's cactus native from Southern Brazil, which produces a fleshy fruit, large, red, thornless, with good flavor and antioxidant properties being consumed in different forms (fresh juices and cakes). This work aimed to make the establishment and proliferation in vitro Cereus hildmannianus. Seeds collected from mature fruits underwent 15 treatments ranging as antiseptics concentrations and dipping times of seeds in sodium hypochlorite and 70% alcohol. The seeds were inoculated in MS evaluating the rates of contamination and seed germination. After germination, the seeds germinated were subjected to treatments for proliferative MS medium supplemented with BAP and 11 AIB variations over a period of 80 days. The aseptic agents used were effective in the process of removing contaminants allowing ideal conditions for the germination of Cereus hildmannianus that germination percentage reached 81% to 60 days in vitro culture. The MS medium containing 0.5 mg/L IBA and 2.0 mg/L BAP showed the best results with proliferative average of 3 shoots/explant at 80 days in vitro culture.*

*Keywords: Cactus. In vitro culture. Cereus hildmannianus.*

## REFERÊNCIAS

- ARNUTI, Renê. **Estabelecimento *in vitro* de *Cereus hildmannianus* K. Schum. (CACTACEAE)**. 2008. 41 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade do Oeste de Santa Catarina, Joaçaba, 2008.
- BORGES, Clarissa de Souza et al. **Avaliação citotóxica de formol e hipoclorito de sódio utilizados na desinfestação de sementes em cultura de tecidos de plantas**. 2003. Disponível em: <[www.ufpel.edu.br/cic/2005/arquivos/CB\\_00717.rtf](http://www.ufpel.edu.br/cic/2005/arquivos/CB_00717.rtf)>. Acesso em: 15 fev. 2013.
- BRUXEL, J.; JASPER, A. A família Cactaceae na Bacia Hidrográfica do Rio Taquari, RS, Brasil. **Acta bot. bras.** v. 19 n. 1 p. 71-79, 2005.
- COELHO, Paulo Jorge de Araújo et al. Obtenção de plantas de espécies de cactos da Caatinga com potencial ornamental, obtida por germinação *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 17., 2009, Aracajú. **Anais...** Aracajú, 2009.
- CORREIA, Diva et al. Germinação de Sementes de Cactáceas In Vitro. Comunicado Técnico. Fortaleza, v. 1, n. 1, dez. 2011.
- DABEKAUSSEN, M. A. A; PIERIK, R. L. M; VAN DER LAKEN, J. D. Factors affecting areole activation in vitro in the cactus *Sulcorebutia alba* Rausch. **Scientia Horti**, v. 46, n. 4, p. 283-294, maio 1998.
- ESTRELA, Carlos; ESTRELA, Cyntia R. A.; BARBIN, Eduardo Luis. Mechanism of action of Sodium Hypochlorite. **Braz. Dent. J.**, São Paulo, v. 13, n. 13, p. 113-117, 2002. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010364402002000200007&script=sci\\_abstract&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010364402002000200007&script=sci_abstract&tlng=pt)>. Acesso em: 21 fev. 2013.
- FROTA, Hamilton Melo et al. Efeitos do BAP e do AIA na inoculação e no crescimento *in vitro* de brotos de dez clones de palma forrageira. **Revista Ciência Agronômica**, v. 35, p. 279 - 283, out. 2004. Edição Especial.
- MOHAMED-YASSEEN, Yasseen. Micropropagation of pitaya (*Hylocereus undatus* Britton et Rose). **In Vitro Cell**, n. 38, p. 427-429, set. 2002.
- PAZ, Greiciele Vitor Santos; SILVEIRA, Daniela Garcia. Estabelecimento de protocolos para a multiplicação *in vitro* de palma forrageira [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill]. 15., 2008, Feira de Santana. **Anais...** Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, 2008.
- PILETTI, Raquel. **Extração da mucilagem da tuna (*Cereus hildmannianus* K. Shum) para aproveitamento industrial**: 2011. 98 p. Monografia (Especialização em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.
- REIS, Michele Valquíria dos et al. Germinação *in vitro* e desenvolvimento pós-seminal de plântulas de *Pilosocereus aurisetus* (Werderm.) Byles & G. D. Rowley (Cactaceae). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 6, p. 739-744, nov./dez. 2012.

RUBIO et al. Cultivo “*in vivo*” e “*in vitro*” de *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton y Rose. **Boletín Sociedade Latinoamericana e Caribenha de Cactaceas e Suculentas**, v. 2, n. 2, 2005.

SANTOS, Amanda Pricilla Batista et al. Influência da Concentração de BAP (6-benzilaminopurina) na Micropropagação de *Cereus albicaulis* (Cactaceae). IN: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMIÁRIDO, 7., JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA FACEPE/UNIVASF, 1., 2012, Petrolina. **Anais...** Petrolina, 2012.

SANTOS, Amanda Pricilla Batista. Germinação *in vitro* de Sementes de Mandacaruinho. **Embrapa**, Pernambuco, p. 303-308, fev. 2011.

SCHEINVAR, Laéia; REITZ, Raulino. **Cactáceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1985. 384 p. (Flora Ilustrada Catarinense; Parte I As plantas).

SILVA, S. R. et al. **Plano de ação nacional para conservação das cactáceas: Série Espécies Ameaçadas nº 24**. Brasília, DF: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2011. 113 p.

TOMBOSI, Gabriela; RENNER, Gladys Daniela Rogge. **Avaliação de métodos de esterilização e nutrição de meio de cultivo para micropropagação de *pimpinella anisum* (linn) – apiaceae**. 2008. Disponível em: <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/60ra/resumos/resumos/R2585-1.html>>. Acesso em: 12 fev. 2013.

VASCONCELOS, Andréa et al. Micropropagação de palma forrageira cv. Miúda (*Nopalea cochenillifera* – Salm Dyck). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 2, n. 1, p. 28-31, jan./mar. 2007.