

Foto: Diva Correia



Tipo de Corte em Caule Juvenil de Coroa-de-Frade para Formação de Brotos in Vitro

Diva Correia¹
Evaldo Heber Silva do Nascimento²
Geórgia Carvalho Anselmo³
José Maria Tupinambá da Silva Júnior⁴
João Paulo Saraiva Morais⁵

Na região semiárida do Nordeste brasileiro, encontram-se várias cactáceas de importância para o ecossistema regional. Algumas apresentam potencial para uso como planta ornamental e como forrageira para a alimentação do gado no período das secas (CAVALCANTE; RESENDE, 2006). A maioria das espécies pertence aos gêneros *Cereus*, *Pilosocereus* e *Melocactus* (MENEZES et al., 2011).

As plantas do gênero *Melocactus*, conhecidas como coroa-de-frade, são cactos que atraem a atenção, por possuírem uma forma globosa e uma estrutura formada na região apical do caule denominada cefálio, onde se formam as flores e frutos, que são bagas contendo as sementes. As espécies de *Melocactus* ocorrem no México e

em outros países da América Central e América do Sul (TAYLOR; ZAPPI, 2004). Das 36 espécies conhecidas (ANDERSON, 2001), 19 delas ocorrem no leste do Brasil, das quais 17 são endêmicas (LISTA..., 2012). No Estado da Bahia, encontra-se a maior concentração de representantes desse gênero (TAYLOR; ZAPPI, 2004). O *Melocactus zehntneri* é uma das três espécies ocorrentes no Estado do Ceará (TAYLOR; ZAPPI, 2004) e é a de maior frequência na Caatinga cearense (COELHO et al., 2010).

Entre as cactáceas, as coroas-de-frade são muito utilizadas como espécies ornamentais e, por esse motivo, sofrem os efeitos do extrativismo (SILVA et al., 2011). São espécies tropicais que se reproduzem basicamente por via sexuada, e poucas informações

¹Bióloga, D.Sc. em Ciências Florestais, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, diva.correia@embrapa.br

²Engenheiro-agrônomo, pós-graduando em Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, e.heber.sn@gmail.com

³Bióloga, pós-graduanda em Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, georgiabiologa@hotmail.com

⁴Engenheiro-agrônomo, pós-graduando em Solos e Nutrição de Plantas, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, junior_tupinamba@yahoo.com.br

⁵Farmacêutico, M.Sc. em Bioquímica, pesquisador da Embrapa Algodão, Campina Grande, PB, joao.morais@embrapa.br

estão disponíveis na literatura tanto sobre os mecanismos de germinação das sementes (LONE et al., 2007; CORREIA et al., 2011a) quanto aos métodos de propagação vegetativa (GIUSTI et al., 2002). Adicionalmente, na natureza, raramente observa-se a formação de brotos em coroas-de-frade; o desenvolvimento de brotos nessas espécies é observado no campo em função de ocorrência de um dano físico no caule (TAYLOR, 1991). Dessa forma, a micropropagação pode ser uma alternativa viável para a multiplicação in vitro de coroa-de-frade (RUBLUO et al., 1996), como indicam alguns estudos (CORREIA et al., 2009; RESENDE et al., 2009; ANSELMO, 2011; CORREIA et al., 2011b).

Pesquisas relacionadas à micropropagação de cactáceas têm sido conduzidas no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, CE, com o objetivo de definir tecnologias e/ou processos de propagação e de conservação.

Estudos conduzidos in vitro com *Melocactus zehntneri* permitiram a obtenção da multiplicação de brotos a partir de diferentes tipos de cortes em caules de plantas juvenis. Para isso, foram conduzidos três experimentos, um para cada tipo de corte (transversal, longitudinal com uma “costela” e longitudinal com duas “costelas”) (Figura 2). No primeiro experimento com corte transversal, testou-se também o efeito da concentração da citocinina BAP (0,0 mg L⁻¹; 1,0 mg L⁻¹; 2,0 mg L⁻¹; 4,0 mg L⁻¹ e 8,0 mg L⁻¹) (ANSELMO, 2011; CORREIA et al., 2011b).

Em todos os experimentos, foram utilizadas plantas juvenis obtidas a partir da germinação de sementes in vitro de acordo com a metodologia citada por Correia et al. (2011a). As sementes foram coletadas de plantas mantidas no viveiro de mudas da Embrapa Agroindústria Tropical. Após a germinação, o crescimento e desenvolvimento das plântulas ocorre em meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995) (Tabela 1) suplementado com 2 g L⁻¹ de Gelrite® (Sigma-Aldrich) como agente solidificante. O pH do meio de cultura é ajustado para 5,8 antes do acréscimo do Gelrite; após, é distribuído em frascos com capacidade de 250 mL e vedados com tampas plásticas transparentes (Figura 1). Dessa forma, os frascos com meio de cultura são esterilizados em autoclave à temperatura de 121 °C sob pressão de 1,5 atm durante 15 minutos.

As plântulas devem ser transferidas para meio novo a cada 4 meses até que alcancem altura da parte aérea entre 3 cm e 4 cm e oito costelas bem desenvolvidas (Figura 1), o que ocorre após 16 meses de cultivo após a germinação. Durante o crescimento e desenvolvimento das plântulas, dependendo do seu tamanho, pode-se cultivar mais de uma plântula por recipiente contendo 30 mL de meio de cultura em cada frasco. O cultivo in vitro ocorre à temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 horas e radiação ativa fotossintética de 30 μmol m⁻² s⁻¹ obtida com lâmpada fluorescente (40 Watts).

A escolha do meio de cultura JADS deu-se em razão de ele apresentar aproximadamente o dobro da concentração de cálcio (5,0 mmol L⁻¹) e de magnésio (3,0 mmol L⁻¹) quando comparado às concentrações desses nutrientes existentes no meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), o mais utilizado em cultivo in vitro de plantas. A importância de cálcio e de magnésio na nutrição mineral de cactáceas é citada por Rubluo (1996). Entre outras diferenças na composição desses meios de cultura, citam-se: a) concentração íons totais (JADS - 52 mmol L⁻¹; MS - 94 mmol L⁻¹); b) relação NO₃⁻ : NH₄⁺ (JADS 5,5:1; MS 1,9:1); c) fonte de cálcio (JADS - Ca(NO₃)₂; MS - CaCl₂); d) concentrações reduzidas de nitrogênio, potássio, boro, zinco e cloro, e maiores de fósforo, enxofre, cobre, ferro, sódio e cobalto em meio JADS do que em meio MS; e) ausência de iodo em meio JADS.



Foto: Diva Correia

Figura 1. Plântula de coroa-de-frade (*Melocactus zehntneri*) com altura de aproximadamente 3 cm, cultivada in vitro durante 19 meses após a sementeira.

Tabela 1. Composição do meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995).

Componente	Concentração	
	(mg L ⁻¹)	(mmol L ⁻¹)
Macronutriente		
Nitrato de amônio (NH ₄ NO ₃)	324,0	4,0
Nitrato de potássio (KNO ₃)	809,0	8,0
Nitrato de cálcio tetra-hidratado (CaNO ₃ .4H ₂ O)	1.181,0	5,0
Fosfato monobásico de potássio (KH ₂ PO ₄)	408,0	3,0
Sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	739,5	3,0
Micronutriente		
Ferro-EDTA (FeSO ₄ .7H ₂ O)	55,60	0,2
(Na ₂ EDTA.2H ₂ O)	74,50	0,2
Sulfato de manganês mono-hidratado (MnSO ₄ .H ₂ O)	12,80	0,076
Sulfato de zinco hepta-hidratado (Zn SO ₄ .7H ₂ O)	4,30	0,015
Sulfato de cobre penta-hidratado (Cu SO ₄ .5H ₂ O)	1,25	0,005
Molibdato de sódio di-hidratado (Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O)	0,15	0,0006
Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	3,10	0,05
Composto orgânico		
Tiamina.HCl (vitamina B ₁)	5,0	0,015
Piridoxina.HCl (vitamina B ₆)	0,5	0,0024
Ácido nicotínico (vitamina PP)	0,5	0,004
Pantotenato de cálcio (vitamina B ₅)	2,4	0,005
Cisteína	2,5	0,02
Arginina	7,0	0,04
Glutamina	146,0	1,0
Inositol	100,0	0,555
Sacarose	30.000,0	11.400,0

Fazendo uso de plântulas (Figura 1 e 2A) em câmara de fluxo laminar, preparam-se os explantes realizando os seguintes cortes nos caules das plântulas:

- Corte transversal – os caules são seccionados transversalmente originando três tipos de explantes: apical, mediano e basal (Figura 2B).
- Corte longitudinal – cada costela do caule é seccionada longitudinalmente (Figura 2C) seguido de corte transversal na região mediana do caule, originando dois tipos de explantes: apical e basal (Figura 2D).

- Corte longitudinal – o mesmo que o item b, fazendo uso de duas costelas do caule, como pode ser observado na Figura 2E.

Os segmentos caulinares cortados (explantes) (Figuras 2B, 2D e 2E) devem ser inoculados em frascos com capacidade de 250 mL (Figuras 1 e 3) contendo meio de cultura JADS suplementado com 4,0 mg L⁻¹ de BAP (Benzilaminopurina) (ANSELMO, 2011; CORREIA et al., 2011b). As condições de cultivo in vitro das culturas são as mesmas daquelas citadas para o crescimento e desenvolvimento das plântulas.

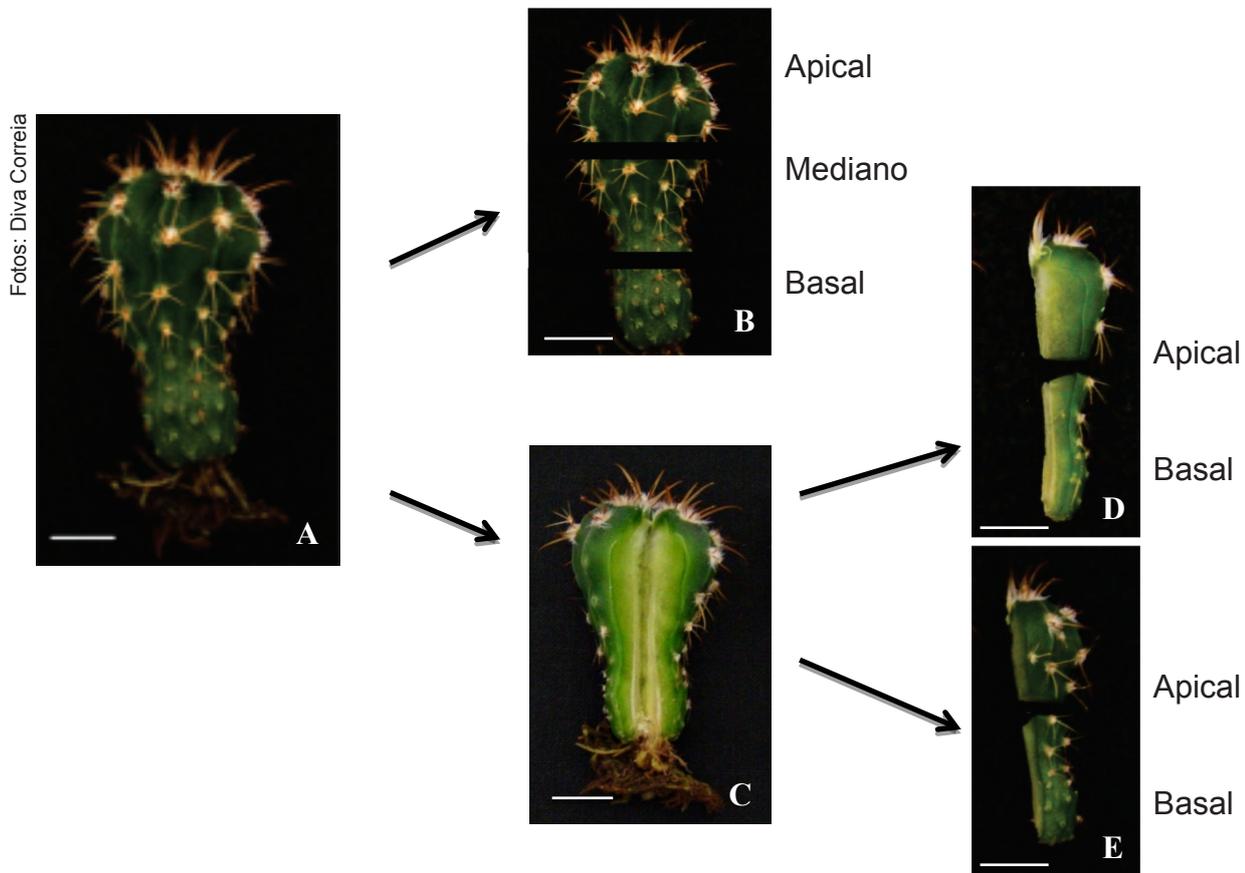


Figura 2. Tipos de cortes em caule juvenil de coroa-de-frade (*Melocactus zehntneri*). Plântula de coroa-de-frade cultivada in vitro durante 19 meses após a semeadura e com aproximadamente 3 cm de altura (A); cortes transversais (B); corte longitudinal (C); explantes basal e apical com uma costela (D); explantes basal e apical com duas costelas (E). Barra = 1 cm.

Os diferentes tipos de cortes realizados proporcionam a quebra da dominância apical na plântula (rompimento do fluxo auxina-citocinina no sentido ápice-base na planta inteira). Consequentemente, com a redução da auxina, há acúmulo de citocinina, favorecendo o desenvolvimento de gemas laterais e proliferação de brotos (TAIZ; ZEIGER, 2004). Essa morfogênese é acelerada devido à sinergia entre os hormônios endógenos e a citocinina BAP adicionada ao meio de cultura onde os explantes são cultivados (ANSELMO, 2011; CORREIA et al., 2011b). Na maioria das cactáceas, a exemplo das coroas-de-frade, o desenvolvimento de gemas ocorre nas aréolas presentes no seu caule.

Os resultados alcançados indicaram que, para cada tipo de corte, a indução dos brotos ocorre durante os primeiros 30 dias após a inoculação dos explantes. Aos 120 dias de cultivo, a formação de brotos varia

em função do tipo de corte. A formação de brotos é superior em cortes longitudinais em relação aos cortes transversais, sendo mais intensa da região mediana à base.

As validações dessas respostas foram conduzidas com 200 explantes cada uma, as quais confirmaram o resultado alcançado em cada experimento (Tabela 2).

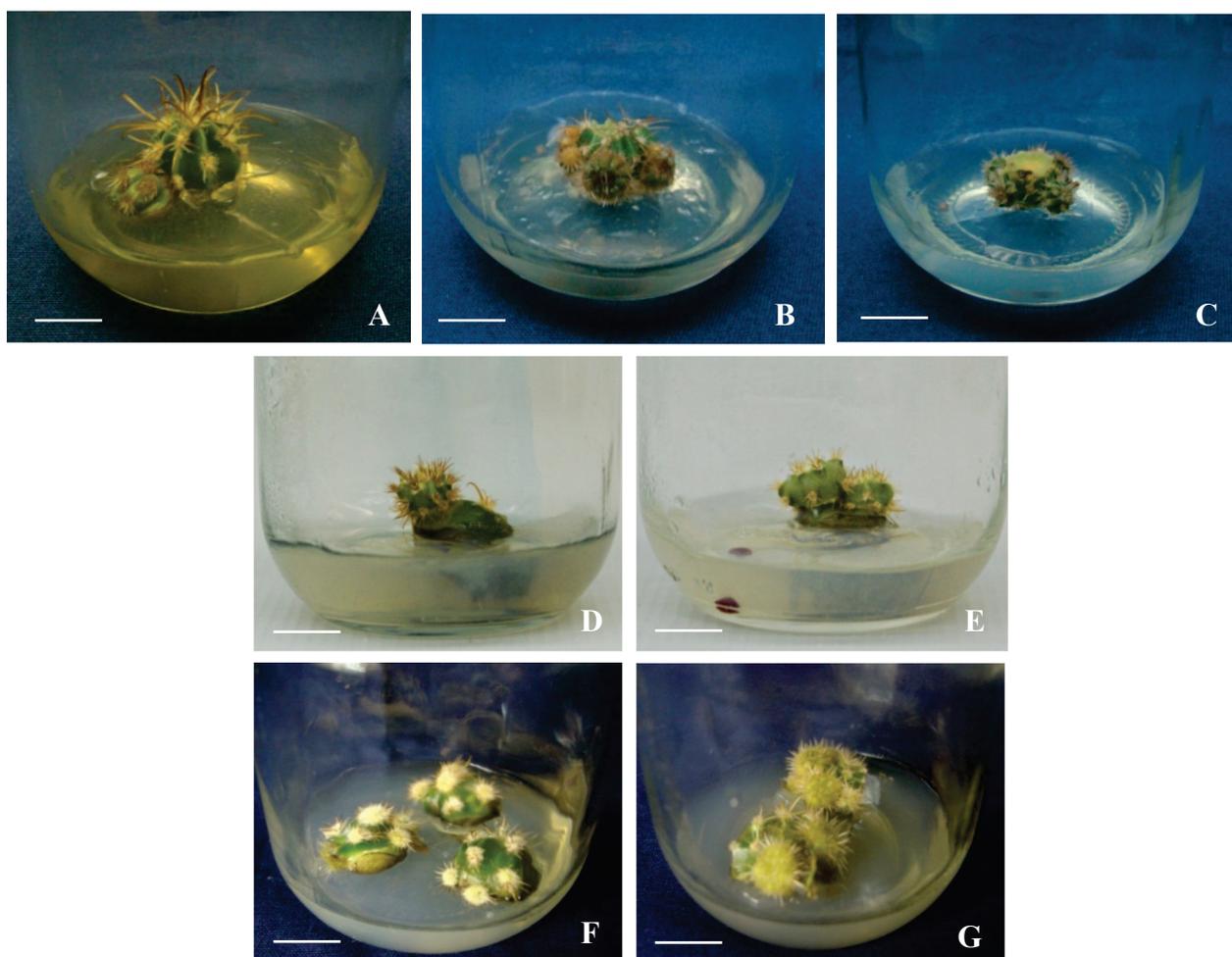
Adicionalmente, em todos os tipos de cortes, podem-se obter brotos com circunferência entre 0,5 cm e 1,0 cm de diâmetro (Figura 3), os quais podem ser retirados dos explantes e transferidos para novo cultivo in vitro.

O corte transversal é mais fácil e rápido de ser preparado do que o corte longitudinal. Entretanto, justifica-se o uso de cortes longitudinais com uma ou duas costelas devido ao elevado rendimento de brotos por plântula, em torno de três vezes, quando comparado àquele obtido em cortes transversais.

Tabela 2. Número médio de brotos e rendimento total de brotos por plântula desenvolvidos em diferentes tipos de corte em caules juvenis de coroa-de-frade (*Melocactus zehntneri*) cultivados in vitro em meio de cultura JADS suplementado com 4,0 mg L⁻¹ de BAP (Benzilaminopurina), durante 120 dias (Fortaleza, CE, 2012).

Tipo de corte	Explante	Número de explante possível por plântula	Número ⁽¹⁾ médio de brotos obtido por explante	Rendimento total de brotos por plântula
Transversal	Apical	1	1,65	5,87
	Mediano	1	2,21	
	Basal	1	2,01	
Longitudinal com uma costela seguido de corte transversal na região mediana	Apical	8	0,71	20,24
	Basal	8	1,82	
Longitudinal com duas costelas seguido de corte transversal na região mediana	Apical	4	2,18	18,28
	Basal	4	2,39	

⁽¹⁾n = 200 explantes.



Fotos: Diva Correia

Figura 3. Formação de brotos em diferentes explantes de coroa-de-frade (*Melocactus zehntneri*) cultivados in vitro em meio de cultura JADS suplementado com 4,0 mg L⁻¹ de BAP (Benzilaminopurina), durante 120 dias e oriundos de plântulas cultivadas in vitro durante 19 meses após a sementeira. Explantes apical (A), mediano (B) e basal (C) obtidos de corte transversal; explantes apical (D) e basal (E) com uma costela obtidos de corte longitudinal; explantes apical (F) e basal (G) com duas costelas cada um obtidos de corte longitudinal. Barra = 1 cm.

Agradecimentos

Ao Banco do Nordeste (Fundece), Ministério de Ciência e Tecnologia (MCT), Sebrae e Embrapa pelo financiamento; ao CNPq e à Funcap pela concessão de bolsas de fomento tecnológico.

Referências

ANDERSON, E. F. **The cactus family**. Timber Press, Portland: 2001. 776 p.

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

CAVALCANTE, N. B.; RESENDE, G. M. Consumo de mandacaru (*Cereus jamacaru* P. DC.) por caprino na época da seca no semi-árido de Pernambuco. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 19, n. 4, p. 402-408, 2006.

COELHO, P. J. de A.; CORREIA, D.; NASCIMENTO, E. H. S. do; SANTOS, R. J. C.; SILVA JÚNIOR, J. M. T. Coleção de cactáceas da Embrapa Agroindústria Tropical. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 1., 2010, Salvador. **Anais...** Salvador: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 2010. 1 CD-ROM.

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

CORREIA, D.; MORAIS, J. P. S.; COELHO, P. J. A.; ANSELMO, G. C.; NASCIMENTO, E. H. S. do Efeito da citocinina e do tipo de explante na formação de brotos in vitro em coroa-de-frade. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 17.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 4., 2009, Aracaju.. **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Floricultura e Plantas Ornamentais; Lavras: Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas, 2009.

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

CORREIA, D.; ANSELMO, G. C.; SILVA JUNIOR, J. M. T.; NASCIMENTO, E. H. S.; MORAIS, J. P. S.; COELHO, P. J. A.

Effect of cytokinin and kind of explant upon friar crown in vitro shoot formation. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 923, p. 183-188, 2011b.

LISTA DAS ESPÉCIES DA FLORA do BRASIL 2012. **Cactáceas**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012>>. Acesso em: 25 nov 2012

LONE, A.B.; TAKAHASHI, L.S.A.; FARIA, R.T.; UNEMOTO, L. K. Germinação de *Melocactus bahiensis* (Cactaceae) em diferentes substratos e temperaturas. **Scientia Agrária**, Curitiba, v. 8, n.4, p. 365-369, 2007.

GIUSTI, P.; VITTI, D.; FIOCCHETTI, F.; COLLA, G.; SACCARDO, F.; TUCCI, M. *In vitro* propagation of three endangered cactus species. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 95, n. 4, p. 319-332, 2002.

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-49, 1962.

RESENDE, S. V.; MARCHI, M. N. G.; BRITO, A. L. B.; SANTANA, J. R. F. Indução de brotações in vitro em *Melocactus glaucescens* Buining e Brederoo (Cactaceae) da Chapada Diamantina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 17.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 4., 2009, Aracaju. **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Floricultura e Plantas Ornamentais; Lavras: Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas, 2009.

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

SILVA, R. S.; ZAPPI, D. C.; TAYLOR, N. P.; MACHADO, M. C. (Org.). **Plano de ação nacional para a conservação das cactáceas**. Brasília, DF: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2011. 112 p. (Série Espécies Ameaçadas, 24).

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Arimed, 2004. 719 p.

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

TAYLOR, N. P. **The genus *Melocactus***: in Central e South America. Kew: Royal Botanic Gardens, 1991. 80 p.

Comunicado Técnico, 188

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroindústria Tropical
Endereço: Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici,
CEP 60511-110 Fortaleza, CE
Fone: (0xx85) 3391-7100
Fax: (0xx85) 3391-7109 / 3391-7141
E-mail: vendas@cnpat.embrapa.br

1ª edição (2012): on-line

Comitê de Publicações

Presidente: Marlon Vagner Valentim Martins
Secretário-Executivo: Marcos Antonio Nakayama
Membros: José de Arimatéia Duarte de Freitas, Celli Rodrigues Muniz, Renato Manzini Bonfim, Rita de Cassia Costa Cid, Rubens Sonsol Gondim, Fábio Rodrigues de Miranda.

Expediente

Revisão de texto: Marcos Antonio Nakayama
Editoração eletrônica: Arilo Nobre de Oliveira
Normalização bibliográfica: Edineide Maria M. Maia.