

Emergência e desenvolvimento da cactácea rabo-de-raposa (*Arrojadoa* spp) em diferentes meios de cultura e recipientes

Márcia Maria Dias¹
Silvia Nietsche¹
Marlon Cristian Toledo Pereira¹
Carlos Augusto Rodrigues Matrangolo¹

RESUMO

A espécie ornamental *Arrojadoa* spp, nativa do Brasil, pertencente à família cactaceae, é uma planta de fácil cultivo e propagada via sementes mas apresenta mucilagem que inibir a germinação. Neste contexto, a propagação de sementes *in vitro* visa obter maior produção de plantas, uma vez que o meio de cultura e as condições empregadas fornecem os nutrientes e as condições necessárias promovendo incrementos na porcentagem de germinação. Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a emergência e o desenvolvimento de plântulas de *Arrojadoa* spp. em diferentes meios de cultura e recipientes. Os frutos foram coletados na área da Barragem Bico da Pedra, em Janaúba, Minas Gerais. O delineamento utilizado foi em blocos casualizados, em um esquema fatorial 2x2x2, constituído de dois recipientes, frascos, tubos de ensaio e quatro tipos de meios de cultivo MS: 1 - 5 mg.L⁻¹ de 6-BAP e 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado, 2 - Ausência de 6-BAP e 2,5 g.L⁻¹ de carvão; 3 - 5 mg.L⁻¹ de 6-BAP e sem carvão; e 4 - Ausência de 6-BAP e carvão. Os resultados obtidos indicaram que não houve influência dos meios de cultivo sobre a porcentagem de germinação. A maior produção de calos foi obtida em meio contendo 5 mg.L⁻¹ de 6-BAP na ausência de carvão ativado. As características de comprimento da parte aérea, diâmetro da parte aérea e comprimento radicular apresentaram melhor desenvolvimento no tratamento sem o regulador de crescimento e na presença de carvão ativado. Em tubos de ensaio observou-se menor índice de velocidade de emergência quando comparados com o sistema de frascos.

Palavras-chave: Germinação, cultivo *in vitro*, regulador de crescimento, cactos.

ABSTRACT

Emergence and development of the bristly foxtail (*Arrojadoa* spp) in different culture medium and containers

The *Arrojadoa* spp. is a native species in Brazil that belongs to the cactaceae family it is an easily cropped plant and is propagated through seeds presenting mucilage that inhibit germination. In this context, the *in vitro* propagation of the seeds is aimed at obtaining higher production of plants, since the culture medium and the conditions supply the nutrients and necessary conditions promoting increases in the percentage of germination. So, this study was carried out to evaluate the emergency and development of the *Arrojadoa* sp. plantlets under different culture mediums and containers. The fruits were collected in the area of the Bico de Pedra dam, Janaúba, Minas Gerais State. The randomized experimental design was used, with a factorial scheme 2x2x2 consisting of two containers, test tubes and flasks as well as four types of the MS cropping mediums, such as: a) 5mg.L⁻¹ 6-BAP and 2.5g.L⁻¹ activated charcoal; b) absent 6-BAP and 2.5g.L⁻¹ charcoal; c) 5mg.L⁻¹ 6-BAP and without charcoal; and (d) absence of 6-BAP and charcoal. According to the results, the following conclusions were drawn: the cropping mediums showed no influence upon percent germination; the highest callus yield was obtained in the medium containing 5 mg.L⁻¹ 6-BAP at absence of the activated charcoal. The characteristics showing better development in either treatment without growth regulator and the presence of the activated charcoal were the aerial part length, aerial part diameter and root length. In test tubes, the lowest emergency speed index was observed, compared to the flask system.

Key words: germination, *in vitro* cropping, growth regulator, cactus.

¹ UNIMONTES. Departamento de Ciências Agrárias. Caixa Postal 91. 39440-000 Janaúba, MG. E-mail: silvia.nietsche@unimontes.br

INTRODUÇÃO

No que diz respeito à biodiversidade, o Brasil é líder em número de espécies de plantas, e Minas Gerais, com sua grande diversidade de ambientes, reúne cerca de 10 mil espécies vegetais em seu território, cerca de 3,5% do total de espécies presumivelmente existentes no mundo. No entanto, toda essa diversidade de paisagens encontra-se fortemente ameaçada. Nos próximos 30 a 40 anos, aproximadamente 25% das espécies vegetais do planeta podem estar em perigo de extinção ou de sofrer grave erosão genética (Mendonça & Lins, 2000).

Dentre as espécies ameaçadas em Minas Gerais está a maioria das cactáceas, de ocorrência extremamente localizada. A diversidade e os endemismos são maiores nas áreas de caatinga e de campos rupestres, localizadas nas regiões norte e nordeste de Minas e nas áreas montanhosas do Estado, respectivamente (Costa *et al.*, 1998). O acervo de plantas da caatinga vem, pois, declinando gradativamente desde a implantação dos planos de colonização na região, tendo se perdido já grande parte do germoplasma existente. Atualmente 3,5% da lista de espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais ocorre neste bioma (Mendonça & Lins, 2000). Isso se deve não só ao fato de a caatinga ocorrer numa área relativamente pequena do Estado, mas, sobretudo, à carência de estudos básicos para subsidiar análises mais profundas. Apesar da grande diversidade florística e fisionômica da caatinga, ela é relativamente pouco conhecida (Mendonça & Lins, 2000).

Dentre as cactáceas potencialmente ameaçadas, está a espécie ornamental *Arrojadoa* spp., vulgarmente conhecida como Rabo-de-raposa, que ainda é pouco difundida comercialmente. O gênero *Arrojadoa*, segundo Anderson (2001), é nativo do Brasil; as plantas podem atingir até 2 m de altura e diâmetro de 0,5 a 5 cm. O *Arrojadoa* spp. é encontrado no Bioma Caatinga de Minas Gerais, sendo base da cadeia alimentar principalmente de pássaros, os quais efetuam a polinização das flores dessa espécie.

Para o cultivo de cactos existem dois métodos de propagação: sexuada e assexuada (Faria, 2005). Algumas espécies são complexas e só se reproduzem por sementes; por exemplo, os gêneros *Melocactus*, *Discocactus*, *Echinocactus*, *Uebelmannia*, dentre outros. A germinação, segundo Krikorian *et al.* (1987), é uma seqüência ordenada de atividades metabólicas divididas em fases, que resulta na formação de uma plântula. Dentre os fatores ambientais que afetam o processo germinativo, a temperatura exerce influência significativa. Sabe-se que ela afeta a percentagem, velocidade e uniformidade de germinação e está relacionada com os processos bioquímicos. O período de germinação pode mudar completamente em resposta à temperatura, devido à complexidade do processo germinativo (Copeland & McDonald, 1995). O gênero *Arrojadoa* spp. é de fácil

cultivo, propagando-se via sementes, mas a presença da mucilagem, que envolve as sementes, interfere no processo de germinação em condições naturais (Paula & Ribeiro (2004). Vários cactos têm sido afetados pela ação humana por meio da destruição de seu habitat e da extração por colecionadores. O número de plantas tem sido drasticamente reduzido e em alguns casos, populações inteiras têm sido destruídas.

A micropropagação é uma ferramenta biotecnológica amplamente recomendada para estudar e conservar espécies ameaçadas. Esta ferramenta permite um rápido desenvolvimento de plantas em comparação com plântulas germinadas em viveiros ou nos sistemas naturais (Ault & Blackmon, 1987), além disso, outra grande vantagem é a produção de plântulas livres de patógenos, sendo também uma boa alternativa para propagar espécies que não produzem brotações laterais (Clayton *et al.*, 1990). Por outro lado, estudos realizados por Backhaus *et al.* (1999), demonstram que as cactáceas submetidas às condições de cultivo *in vitro* podem fixar CO₂ de maneira contínua, comportando-se como plantas C3 facultativas, portanto o crescimento dessas plantas pode ser acelerado por meio do cultivo *in vitro*. Assim cactus micropropagados são comparáveis em tamanho e maturidade com plantas produzidas a partir de sementes de vários anos de idade (Clayton *et al.*, 1990).

Diante da importância do *Arrojadoa* spp. no Bioma Caatinga, associado aos fatores de crescimento lento das plântulas e problemas de germinação das sementes em condições naturais, bem como em função da crescente procura por diversificação de espécies de plantas no mercado e da conseqüente valorização das cactáceas como ornamentais, estudos sobre a emergência e o desenvolvimento das plântulas são essenciais para diminuir os problemas de conservação dessa espécie.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a emergência e o desenvolvimento de plântulas de *Arrojadoa* sp. em diferentes meios de cultura e recipientes.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Células Vegetais da Universidade Estadual de Montes Claros - UNIMONTES, Campus de Janaúba, Janaúba, MG.

Material genético

Os frutos da cactácea rabo-de-raposa (*Arrojadoa* spp.) foram coletados na área da Barragem Bico da Pedra, Janaúba, MG. Foram selecionados frutos maduros sem presença de danos na casca ou problemas fitossanitários.

Delineamento Experimental e tratamentos

O delineamento utilizado foi em blocos casualizados, com quatro repetições, em um esquema fatorial 2x2x2,

constituído de dois tipos de recipiente, frascos e tubos de ensaio; meios de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) com e sem carvão ativado e meio de cultura MS com e sem regulador de crescimento, com quatro sementes por parcela em cada frasco ou tubo de ensaio. Foram empregados quatro tipos de meio: meio 1: MS adicionado de 5 mg.L⁻¹ de 6-BAP e 2,5 g.L⁻¹ de carvão ativado; meio 2: MS adicionado de 5 mg.L⁻¹ de 6-BAP e sem adição de carvão ativado; meio 3: MS sem adição do 6-BAP e 2,5 g.L⁻¹ de carvão; e meio 4: MS sem adição de 6-BAP e carvão ativado em dois tipos de recipientes, frascos e tubos de ensaio.

Limpeza dos Frutos

Logo após a coleta, os frutos foram submetidos à assepsia em solução fungicida de Derosal (0,3%) por 10 minutos, sendo em seguida lavados com água desionizada por três vezes. Após esse procedimento, os frutos foram imersos em álcool 92,8° Gl por 60 segundos em constante agitação, lavados novamente em água desionizada e posteriormente submetidos à agitação em solução de hipoclorito de sódio com concentração de 2,5% PV, adicionada de três gotas de Tween 20 USP para um litro de solução, durante 20 minutos. Após esse procedimento, os frutos foram conduzidos para câmara de fluxo laminar.

Meios de Cultura e Inoculação das Sementes

Para o cultivo *in vitro* da cactácea *Arrojadoa* spp., foram preparados meios de cultura do tipo MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementados com sacarose (30 g.L⁻¹), vitaminas do Witte (10mg.L⁻¹), meio inositol (0,1 g.L⁻¹), ágar (7 g.L⁻¹), em presença ou ausência de carvão ativado (2,5 g.L⁻¹), e 6-Benzilaminopurina (6-BAP) na concentração 5mg.L⁻¹. Os meios de cultura foram distribuídos em dois tipos de recipiente: frascos com dimensão de 10 cm de comprimento e 6,5 cm de diâmetro, contendo 25 mL de meio de cultivo e tubos de ensaio com 15 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro, contendo 8 mL de meio de cultura, ambos os tipos de recipiente foram posteriormente fechados, envolvidos em filme de PVC, autoclavados à 121 °C durante 20 minutos e posteriormente resfriados.

Na câmara de fluxo laminar, foram realizadas a tríplice lavagem com água desionizada e autoclavada, deixando os frutos em água estéril. Posteriormente, realizaram-se a abertura dos frutos e a retirada das sementes, as quais foram esfregadas sobre papel kraft esterilizado para a retirada da mucilagem e inoculadas em tubos de ensaio ou em frascos contendo 8 mL e 25 mL do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) respectivamente. A seguir, os recipientes contendo as sementes foram mantidos em sala de cultivo com lâmpadas fluorescentes do tipo superluz do dia, de 40 watts, e intensidade luminosa de 25 W.m⁻², temperatura de 25 ± 3 °C e fotoperíodo de 16 horas de luz e oito horas no escuro.

Avaliações

A emergência foi controlada diariamente, até o 100º dia após a semeadura, sendo avaliado o seu índice de velocidade, pela fórmula sugerida por Maguire (1962):

$$IVE = E_1/N_1 + E_2/N_2 + \dots + E_n/N_n$$

em que:

IVE = índice de velocidade de emergência; E₁, E₂, ... E_n = número de sementes emergidas na primeira, segunda, até a última contagem; N₁, N₂, ... N_n = número de dias da semeadura à primeira, segunda até a última contagem (Nakagawa, 1994).

A percentagem de germinação também foi avaliada, assim como estimado o tempo médio de emergência, segundo Edmond & Drapala (1958), pela equação:

$$T_m = \frac{G_1T_1 + G_2T_2 + \dots G_nT_n}{G_1 + G_2 + \dots G_n}$$

em que:

T_m é o tempo médio necessário para atingir a germinação máxima; e

G₁, G₂ e G_n são o número de sementes germinadas nos tempos T₁, T₂ e T_n, respectivamente.

Aos 125 dias após a semeadura *in vitro*, foram avaliadas as características comprimento da raiz, comprimento da parte aérea e diâmetro da parte aérea, que foram medidas com auxílio de um paquímetro. A percentagem de caelos foi controlada diariamente até o 125º dia após a semeadura *in vitro*.

A percentagem de contaminação foi avaliada visualmente, sendo essa característica observada diariamente.

Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância com desdobramentos das interações significativas, sendo os efeitos dos tratamentos comparados pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. A análise foi realizada com o auxílio do programa denominado SAEG (Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas da Universidade Federal de Viçosa).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ocorreram interações significativas entre os fatores em estudo para a maioria das características avaliadas.

A germinação de sementes de *Arrojadoa* spp iniciou-se oito dias após a implantação *in vitro*. Os resultados de percentagem de germinação, tempo médio de germinação e índice de velocidade de emergência demonstram a facilidade de propagação dessa espécie por meio da cultura de tecidos (Tabelas 1 e 2). Em trabalhos com sementes da cactácea *Schlumbergera truncata*, inoculadas em tubos de ensaio, o início da germinação aconteceu após três semanas da semeadura, e depois de 180 dias germinação foi de 20,6% (Nunes *et al.*, 2003).

Tabela 1. Índice de velocidade de emergência e tempo médio de germinação de sementes de *Arrojadoa* spp. sob cultivo *in vitro* em dois tipos de recipientes, sob diferentes doses de 6-benzilaminopurina, na ausência e presença de carvão ativado

	Índice de Velocidade de Emergência				Tempo Médio de Germinação (dias)			
	Frasco		Tubo de ensaio		Frasco		Tubo de ensaio	
	6-BAP (0 mg.L ⁻¹)	6-BAP (5 mg.L ⁻¹)	6-BAP (0 mg.L ⁻¹)	6-BAP (5 mg.L ⁻¹)	6-BAP (0 mg.L ⁻¹)	6-BAP (5 mg.L ⁻¹)	6-BAP (0mg.L ⁻¹)	6-BAP (5 mg.L ⁻¹)
Carvão (0,0 g.L⁻¹)	0,27AaA	0,20BbA	0,09BaB	0,13AaB	19,18AaB	27,53BbA	34,82BbB	28,80BaA
Carvão (2,5 g.L⁻¹)	0,27AaA	0,29AaA	0,18AaB	0,17AaB	15,05AaA	17,91AaA	17,14AaA	19,89AaA

As médias seguidas da mesma letra minúscula na linha, mesma letra maiúscula na coluna e mesma letra maiúscula sublinhada na linha (comparando recipientes), não diferem entre si dentro da mesma característica a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

Tabela 2. Porcentagem de germinação de sementes e comprimento da radicular (cm) de *Arrojadoa* spp. sob cultivo *in vitro* em dois tipos de recipientes, sob diferentes doses de 6-benzilaminopurina, na ausência e presença de carvão ativado

	Porcentagem de Germinação (%)				Comprimento da Raiz (cm)			
	Frasco		Tubo de ensaio		Frasco		Tubo de ensaio	
	6-BAP (0 mg.L ⁻¹)	6-BAP (5 mg.L ⁻¹)	6-BAP (0 mg.L ⁻¹)	6-BAP (5 mg.L ⁻¹)	6-BAP (0 mg.L ⁻¹)	6-BAP (5 mg.L ⁻¹)	6-BAP (0mg.L ⁻¹)	6-BAP (5 mg.L ⁻¹)
Carvão (0,0 g.L⁻¹)	90,00AaA	91,12AaA	58,33BbB	78,45AaA	1,91BaA	0,02BbA	1,47AaB	0,03BbA
Carvão (2,5 g.L⁻¹)	71,25BaB	68,75BaB	91,67AaA	91,67AaA	2,30AaA	1,83AbA	1,11BaB	1,11AaB

As médias seguidas da mesma letra minúscula na linha, mesma letra maiúscula na coluna e mesma letra maiúscula sublinhada na linha (comparando recipientes), não diferem entre si dentro da mesma característica a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

Para o índice de velocidade de emergência (IVE), o menor foi obtido em tubos de ensaio sem carvão ativado e sem 6-BAP, com média de 0,09 semente emergida por dia, enquanto o maior foi observado no sistema de frasco contendo 5 mg L⁻¹ de 6-BAP e 2,5 g L⁻¹ de carvão ativado, com média de 0,29 semente/dia (Tabela 1). Em geral, o *Arrojadoa* spp. apresentou menores índices de velocidade de emergência em relação a outras espécies em condições de campo, como a pinheira, com 1,67 semente emergida por dia (Pereira *et al.*, 2005); e a graviola, com IVE de 0,91 semente/dia (Ledo & Cabanelas, 1997). Esse resultado sugere que, mesmo em condições ótimas, as sementes de *Arrojadoa* spp. apresentam impedimentos físicos ou químicos que estão interferindo na a velocidade de emergência.

O menor tempo médio de germinação (TM) foi obtido nos meios com presença de carvão ativado e em frascos, com média de 15,05 dias para emergir, não diferindo significativamente dos demais tratamentos (Tabela 1). De acordo com Fridborg (1978), uma das aplicações do carvão ativado é na adsorção do excesso de substâncias tóxicas presentes no meio como reguladoras de crescimento ou inibidoras da germinação presentes na própria semente.

Segundo Paula & Ribeiro (2004), o tempo de germinação das sementes de cactáceas varia de acordo com a espécie, podendo ser imediata ou levar até meses, sendo a temperatura ideal para o cultivo da maioria dos cactos

entre 18 e 26 °C. O fruto da maioria das cactáceas tem as sementes envoltas em uma mucilagem, que pode inibir a germinação. Por isso, muitas sementes só germinam depois de submetidas ao trato digestivo de alguns animais como aves e répteis. Pereira *et al.* (2005), trabalhando com sementes de *Annona squamosa*, verificaram a média de 16 dias para sua emergência. Outras espécies, como a pitanga, apresentam tempo médio de 23 dias para emergir (Scalon *et al.*, 2001).

De maneira geral, para as características índice de velocidade de emergência (IVE) e tempo médio de germinação (TM) de sementes de *Arrojadoa* spp na presença de carvão foi positiva.

Para a característica porcentagem de germinação, as melhores médias foram obtidas de sementes germinadas em tubos de ensaio, com presença de carvão ativado, independentemente do 6-BAP, com média de 91,67%, diferindo significativamente dos resultados obtidos em frascos contendo carvão ativado. A menor média de porcentagem de germinação foi observada na ausência de carvão ativado e do regulador de crescimento em tubos de ensaio, 58,33%. No sistema de frascos, as melhores médias foram verificadas na ausência de carvão ativado, diferindo significativamente dos resultados obtidos em frascos contendo 2,5 g L⁻¹ de carvão (Tabela 2), que indicam que os fatores tipo de recipiente, presença ou ausência de 6-BAP e carvão ativado influenciaram na germinação das sementes de *Arrojadoa* spp.

Trabalhos conduzidos por Catarina *et al.* (2001), mostraram que não houve efeitos significativos sobre a percentagem de germinação *in vitro* de embriões zigóticos de *O. odorifera* com a adição de 6-BAP ao meio de cultura e embora alguns reguladores de crescimento possam ser utilizados com o objetivo de promover ou inibir a germinação e o crescimento das plântulas. Nogueira (2004) também não obteve a potencialização da germinação com o uso de citocinina em sementes de Murici Pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.); de acordo com o autor, resultados desfavoráveis também foram obtidos na cultura de embriões de coqueiro-anão (*Cocos nucifera*); com a utilização de diferentes concentrações de 6-BAP ou com a interação BAP x AIA.

Segundo Carvalho & Nakagawa (1980), seriam fatores essenciais para a germinação suprimento de água em quantidade suficiente, temperatura adequada, e presença de composição de gases (atmosfera) apropriada, bem como luz.

De acordo com Menezes *et al.* (2004) a baixa percentagem de germinação ou emergência de muitas espécies pode ser devida a problemas como dormência das sementes, baixo vigor ou a fatores ambientais como temperatura, presença ou ausência da luz, dificuldades de embebição, que, por não serem bem conhecidos, dificultam o manuseio e causam prejuízos. Outros fatores a serem considerados são as barreiras físicas e químicas das próprias sementes, como tegumentos e mucilagens, que atuam impedindo a entrada de água, inibindo assim a ativação de enzimas responsáveis pela germinação (Nogueira *et al.*, 2004). De acordo com Sampaio (1998), os inibidores químicos são substâncias que retardam os processos de crescimento e desenvolvimento das plantas. Todos eles são sintetizados em tecidos clorofilados e costumam se acumular-se nos órgãos em que atuam, não são degradados pelo tecido em repouso e deprimem a atividade em gemas, sementes e caules. Podem ter origem fenólica, como a cumarina, os flavonóides e o ácido clorogênico, agindo sobre o alongamento, a germinação e o crescimento de gemas, ou de origem não-fenólica, como o ácido abscísico (ABA).

Para a característica comprimento de raiz, a maior média, 2,30 cm, foi obtida no frasco com 2,5 g L⁻¹ de carvão e

na ausência de 6-BAP (Tabela 2). Segundo Aloufa (2003), com a adição de carvão ativado foram observados clorose e diminuição marcante da frequência de plantas enraizadas em ameixa e cereja. Em estudos realizados com estacas de maçã, observou-se 100% de enraizamento, e houve influência positiva no comprimento das raízes em meios contendo carvão ativado.

Em relação ao efeito do regulador de crescimento, Nunes *et al.* (2003), avaliando o enraizamento *in vitro* da cactácea *Melocactus violaceus* ssp. *Margaritaceus*, observaram maior eficiência no enraizamento com formação de 87% de plântulas enraizadas ao utilizar concentração de 0,1 mg L⁻¹ de 6-BAP. No presente trabalho, a alta dose de 5 mg L⁻¹ de 6-BAP, pode ter atuado negativamente na formação e no crescimento das raízes. Arello (1991), em trabalho realizado com *Kielmeyera coriacea* Mart., observou a indução de raiz apenas no tratamento sem citocininas, indicando o seu efeito inibitório nesse processo.

Para a característica de comprimento da parte aérea, os melhores resultados foram obtidos quando as plântulas cresceram em frascos na ausência de hormônio e presença de carvão ativado, com média de 1,82 cm aos 125 dias após a implantação (Tabela 3). Resultados semelhantes foram obtidos em trabalho realizado com *Gerbera* sp., no qual foi observado nos tratamentos com ausência de 6-BAP aumento do tamanho dos brotos. De acordo com o autor, isso se deve ao efeito inibitório do 6-BAP no crescimento e desenvolvimento da plântula (Sato *et al.*, 2001). Estudos publicados por Arello (1991) com *Kielmeyera coriacea* Mart. demonstraram maior crescimento das brotações na ausência de 6-BAP. O comprimento da parte aérea do *Arrojadoa* spp, avaliado aos 125 dias após o plantio, é compatível com trabalho desenvolvido com sementes da cactácea *Schlumbergera truncata* inoculadas em tubos de ensaio, as quais atingiram, após 180 dias, tamanho médio de 2,87 cm (Nunes *et al.*, 2003).

Em relação ao diâmetro da parte aérea, foi observada a interação tripla entre tipos de recipientes, presença ou ausência de carvão ativado e regulador de crescimento, apresentando média de 0,82 cm de diâmetro em frasco contendo 2,5 g L⁻¹ de carvão ativado e na ausência do regulador de crescimento (Tabela 3).

Tabela 3 . Comprimento e diâmetro da parte aérea (cm) em plântulas de *Arrojadoa* spp. sob cultivo *in vitro* em dois tipos de recipientes, sob diferentes doses de 6-benzilaminopurina, na ausência e presença de carvão ativado

	Comprimento da Parte Aérea (cm)				Diâmetro da Parte Aérea (cm)			
	Frasco		Tubo de ensaio		Frasco		Tubo de ensaio	
	6-BAP (0 mg.L ⁻¹)	6-BAP (5 mg.L ⁻¹)	6-BAP (0 mg.L ⁻¹)	6-BAP (5 mg.L ⁻¹)	6-BAP (0 mg.L ⁻¹)	6-BAP (5 mg.L ⁻¹)	6-BAP (0mg.L ⁻¹)	6-BAP (5 mg.L ⁻¹)
Carvão (0,0 g.L ⁻¹)	1,18BaA	0,30BbA	0,77BaB	0,27BbA	0,57BaA	0,20BbA	0,40BaB	0,17BbA
Carvão (2,5 g.L ⁻¹)	1,82AaA	1,31AbA	0,24AaB	1,12AaA	0,82AaA	0,62AbA	0,55AaB	0,53AaB

As médias seguidas da mesma letra minúscula na linha, mesma letra maiúscula na coluna e mesma letra maiúscula sublinhada na linha (comparando recipientes), não diferem entre si dentro da mesma característica a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

O sistema de frascos forneceu melhores resultados em relação ao tubo de ensaio para as características índice de velocidade de emergência, tempo médio de germinação, comprimento da raiz, comprimento da parte aérea e diâmetro da parte aérea, possivelmente devido à maior disponibilidade de nutrientes, e gases associados também ao fator da menor competição entre as plântulas nos frascos, quando comparado ao sistema de tubos de ensaio.

Na característica de percentagem de calos organogênicos, foi observado o efeito indutivo do 6-BAP, com média de 35,0%, em frascos contendo meios sem a presença de carvão ativado e com doses de 5 mg.L⁻¹ de 6-BAP (Tabela 4). Segundo Santos *et al.* (2005), em trabalho realizado com a espécie *Salix humboldtiana*, para se obter maior formação de calos friáveis, deve-se utilizar concentrações de 6-benzilaminopurina acima de 4,0 mg.L⁻¹. A ob-

tenção de calos é muito importante na cultura de tecidos, por sua capacidade de gerar grande quantidade de plântulas. Em *Arrojadoa* spp., após a repicagem dos calos para meios de cultura sem 6-BAP e contendo 2,5 g L⁻¹ de carvão ativado, novas plantas foram desenvolvidas.

A maior média, 18,75% para a característica de contaminação, foi obtida em tubos de ensaio e com presença de carvão ativado (Tabela 4). As contaminações foram observadas apenas 36 dias após a inoculação das sementes no meio de cultura, possivelmente essas possam ser originárias de alguma bactéria endofítica nas sementes. Em trabalhos de cultura de tecidos em *Heliconia rauliniana*, realizado por Rodrigues (2005), a presença de microrganismos endofíticos, como a *Pseudomonas* sp. e *Klebsiella* sp., foi observada, comprovando a obtenção de microrganismos endofíticos nos ápices caulinares.

Tabela 4. Percentagem de formação de calos e percentagem de contaminação de *Arrojadoa* spp. sob cultivo *in vitro* em dois tipos de recipientes, sob diferentes doses de 6-benzilaminopurina, na ausência e presença de carvão ativado

	Porcentagem de Calos				Porcentagem de Contaminação			
	Frasco		Tubo de ensaio		Frasco		Tubo de ensaio	
	6-BAP (0 mg/L)	6-BAP (5 mg/L)	6-BAP (0 mg/L)	6-BAP (5 mg/L)	6-BAP (0 mg/L)	6-BAP (5 mg/L)	6-BAP (0mg/L)	6-BAP (5 mg/L)
Carvão (0,0 g/L)	3,75AbA	35,00AaA	0,00AbA	20,52AaB	0,00AaA	0,00AaA	0,00AaA	0,00AaA
Carvão (2,5 g/L)	7,50AaA	6,04BaA	8,33AaA	16,67AaA	12,50AaA	0,00AaA	18,75AaA	12,50AaA

As médias seguidas da mesma letra minúscula na linha, mesma letra maiúscula na coluna e mesma letra maiúscula sublinhada na linha (comparando recipientes), não diferem entre si dentro da mesma característica a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

CONCLUSÕES

A percentagem de germinação *in vitro* de *Arrojadoa* spp foi em média 81,5%.

O uso de frasco de dimensões 10 x 6,5 cm contendo 25 mL de meio MS sem regulador de crescimento, acrescido de 2,5 g L⁻¹ de carvão ativado, promoveu melhor índice de velocidade de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de *Arrojadoa* spp.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais- FAPEMIG.

REFERÊNCIAS

- Anderson E F (2001) The cactus family. Portland, Oregon; Timber Press. 777p.
- Aloufa MAI (2003) Enraizamento *in vitro* de plantas lenhosas: dificuldades e soluções. In: 14º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, e 1º Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, Lavras, UFLA/FAEPE. p. 23-36.
- Arellano EF (1991) Aspectos gerais do comportamento *in vitro* de *Kielmeyera coriacea* Martins (Guttiferae): Produção e enraizamento de brotações. Dissertação de mestrado. Lavras, Escola Superior de Agricultura de Lavras. 148p.

- Ault J & Blackmon W (1987) *In vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae). HortScience, 22: 126-127.
- Backhaus R, Malda G & Martín C (1999) Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of *in vitro* cultured cactus. Plan Cell, Tissue and Organ Culture, 58: 1-9.
- Carvalho NM & Nakagawa J (1980) Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4ed. Jaboticabal, FUNEP, 588p.
- Catarina CS, Maciel SC & Pedrotti EL (2001). Germinação *in vitro* e embriogênese somática a partir de embriões imaturos de canela sassafrás (*Ocotea odorifera* Mez). Revista Brasileira de Botânica, 24:1-5.
- Clayton P, Hubstenberger J & Phillips G (1990) Micropropagation of members of the Cactaceae subtribe Cactinae. Journal of American Society for Horticultural Science, 115: 337-343.
- Copeland LO & McDonald M (1995) Principles of seeds science and technology. New York, Chapman Hall, 409p.
- Costa CMR, Hermann G, Martins CS, Lins LV & Lamas IR (1998) Biodiversidade em Minas Gerais um atlas para sua conservação. Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas, 92p.
- Edmond JB & Drapala WJ (1958) The effects of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seed. Proceedings of the American Society for Horticultural Science, 71:428-434.
- Faria RT (2005). Floricultura: as plantas ornamentais como agronegócio. Londrina, Mecenas, 116p.
- Fridborg G; Pedersen M; Landstrom L & Eriksson T (1978) The effect of activated charcoal on tissue cultures: absorption of metabolites inhibiting morphogenesis. Physiologia Plantarum, 43:104-106.

- Krikorian AD, Kelly K & Smith DL (1987) Hormones in tissue culture and micropropagation. In: Davies PJ (Eds). Plant hormones and their role in plant growth and development. New York, Macmillan, p.593-613.
- Ledo AS & Cabanelas CIL (1997) Superação de dormência de sementes de graviola (*Annona muricata* L.). Revista Brasileira de Fruticultura, 19:397-400.
- Maguire, JD (1962). Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. Crop Science, 2:176-177.
- Mendonça MP & Lins LV (2000) Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais. Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas, Fundação Zoo-Botânica, 160p.
- Menezes NL, Franzin SM, Roversi T & Nunes EP (2004) Germinação de sementes de *Salvia splendens* Sellow em diferentes temperaturas e qualidades de luz. Revista Brasileira de Sementes, 26:1-5.
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15:473-497.
- Nakagawa J (1994). Testes de vigor baseados na avaliação de plântulas. In: Vieira RD, Carvalho N M (Eds.). Teste de vigor em sementes. Jaboticabal, FUNEP, p. 49-85.
- Nogueira RC, Paiva R, Castro AH, Vieira CV, Abbade LC & Alvarenga, AA (2004) Germinação *in vitro* de Murici pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). Ciência e Agrotecnologia, 28:1053-1059.
- Nunes AG, Figueiredo GSF, Mendes RA & Cardoso LD (2003). Germinação *in vitro* de sementes de *Schlumbergera truncata* (HAW.) Moran (Cactaceae). In In: 14º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, e 1º Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, Lavras, UFLA/FAEPE.p. 463.
- Nunes AG, Figueiredo GSF, Mendes RA & Cardoso LD (2003) Micropropagação *in vitro* de *Melocactus violaceus* ssp. *Margaritaceus* N. P. Taylor (Cactaceae). In: 14º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, e 1º Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, Lavras UFLA/FAEPE.p.242.
- Paula C C & Ribeiro OBC (2004) Cultivo prático de cactáceas. Viçosa, Editora da UFV, 94p.
- Pereira MCT, Nunes CF, Nietsche S, Cunha LMV, Gonçalves VD, Mota WF & Santos FA (2005). Tratamentos físicos e químico na emergência e crescimento de plântulas de pinheira. Bragançã, 64: 411-416.
- Rodrigues PHV (2005) Estabelecimento *in vitro* de *Heliconia rauliniana* (Heliconiaceae). Scientia Agricola, 62:1-5.
- Sampaio E (1998) Fisiologia vegetal: teoria e experimentos. Ponta Grossa, UEPG, 190p.
- Santos BR; Paiva, R, Martinotto, C, Nogueira, RC & Paiva, PD (2005). Indução de calos friáveis em explantes foliares de salix (*Salix humboldtiana* willd). Ciência Rural, 35:510-514.
- Sato AY, Pinto JEBP, Morais AR, Lameira AO & Castro NEA (2001) Efeito de diferentes níveis de nitrogênio, em presença ou ausência de benzilaminopurina, na multiplicação de gérbera (*Gerbera* sp.) de vaso. Ciência e Agrotecnologia, 25:1071-1078.
- Scalon SPQ, Filho Scalon H, Rigoni MR & Veraldo F (2001). Germinação e crescimento de mudas de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) sob condições de sombreamento. Revista Brasileira de Fruticultura, 23:652-655.
- Torres AC, Caldas LS & Buso AJ (1998) Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Brasília; Embrapa-SPI, 864p.