

Influência do substrato e do enraizamento na aclimatização de *Melocactus glaucescens* Buining & Brederoo propagados *in vitro*¹

Sheila Vitória Resende²; Alone Lima-Brito³ José Ranieri Ferreira de Santana⁴

RESUMO

Melocactus glaucescens (Cactaceae) é espécie endêmica da Bahia e está incluída na lista da IUCN e MMA como ameaçada de extinção. A transferência da condição *in vitro* para o ambiente *ex vitro* é uma etapa crítica, podendo ser um fator limitante para a produção das mudas micropropagadas. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito de diferentes substratos e do enraizamento na aclimatização de *Melocactus glaucescens*. As plantas propagadas *in vitro* foram mantidas sob 100% de luminosidade, com regas diárias por 75 dias. Os resultados demonstraram que o substrato adequado para a aclimatização deve conter 50% de terra vegetal e 50% de areia lavada; o tamanho mínimo do diâmetro e do comprimento da parte aérea para transferência para as condições *ex vitro* é de 5 mm e que as etapas de enraizamento *in vitro* e rustificação podem ser eliminadas da micropropagação de *M. glaucescens*. Estudos para demonstrar tempos de dessecação dos brotos acima de 5 mm são necessários, para se eliminar completamente a etapa do enraizamento *in vitro* para esta espécie.

Palavras-chave: Cabeça-de-frade, cacto, condição *ex vitro*, cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

Effect of substrate and rooting on acclimatization of *in vitro* propagated *Melocactus glaucescens* Buining & Brederoo

Melocactus glaucescens (Cactaceae) is endemic to Bahia and is included in the IUCN and MMA lists as endangered species. Transference of *in vitro* cultures to *ex vitro* environment is critical and can become limiting for the production of micropropagated scions. The main objective of this work was to examine the effect of different substrates and rooting during acclimatization of *Melocactus glaucescens*. The plants were *in vitro* propagated and kept in 100 % light, on daily cycles for 75 days. The results suggested that the best substrate should consist of 50 % soil and 50 % sand; plantlets should be at least 5mm in diameter and height before being transferred; and that both steps *in vitro* rooting and harding could be eliminated from micropropagation of *M. glaucescens*. Further studies are still needed on desiccation time of shoots above 5 mm so that the step of *in vitro* rooting can be completely eliminated.

Key words: Cabeça-de-frade, cactus, *ex vitro* environment, *in vitro* culture

Recebido para publicação em março de 2010 e aprovado em outubro de 2010

¹ Parte da Tese de Doutorado da primeira autora

² Bióloga, Doutora. Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Geremoabo s/n, Instituto de Biologia, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Ondina, 40170-115, Salvador, Bahia, Brasil. svresende@yahoo.com.br Autor para correspondência

³ Bióloga, Doutora. Universidade Estadual Feira de Santana - Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Caixa Postal 252-294, 44031-460, Feira de Santana, Bahia, Brasil. lima_brito@yahoo.com.br

⁴ Engenheiro-Agrônomo, Doutor. Universidade Estadual Feira de Santana - Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Caixa Postal 252-294, 44031-460, Feira de Santana, Bahia, Brasil. ranieri@uefs.br

INTRODUÇÃO

O gênero *Melocactus* (L.) Link & Otto (Cactaceae), conhecido como cabeça-de-frade ou coroa-de-frade, possui 37 espécies, sendo 11 espécies e 4 subespécies endêmicas da Bahia (Machado, 2009). *Melocactus glaucescens* Buining & Brederoo é endêmica da região de Morro do Chapéu, ocorrendo em uma pequena área de cerca de 10 km², sendo conhecidas apenas quatro populações, com um número reduzido de indivíduos (Taylor 2000; Taylor & Zappi, 2004).

A lista do Ministério do Meio Ambiente inclui cinco espécies de *Melocactus* ameaçadas de extinção, todas endêmicas do Estado da Bahia, como *M. glaucescens*, que também está incluída na lista de espécies ameaçadas da *The IUCN Red List of Threatened Species* (MMA, 2008; IUCN, 2010).

Muitas espécies do gênero *Melocactus* são coletadas de forma extrativista para fabricação de doces, utilização na medicina tradicional e comercialização como planta ornamental, o que tem levado a uma redução das plantas em seu *habitat* (Lambert 2006a e b; Lone *et al.*, 2009). O fato de os indivíduos serem removidos inteiros da natureza agrava a ameaça de extinção (Fonseca, 2004).

A micropropagação é uma das técnicas da cultura de tecidos vegetais mais utilizadas e que permite altas taxas de multiplicação em curto período, espaço reduzido e plantas livres de patógenos (Estrada-Luna *et al.*, 2008). Para as espécies da família Cactaceae, o cultivo *in vitro*, além de acelerar o crescimento das plantas, resultante da fixação contínua de CO₂ durante os períodos diurno e noturno, possibilita uma alternativa à retirada dos indivíduos do seu *habitat* para a comercialização como planta ornamental e, conseqüentemente, reduz as pressões sobre as populações naturais (Escobar *et al.*, 1986; Hubstenberger *et al.*, 1992; Malda *et al.*, 1999; Retes-Pruneda *et al.*, 2007).

Para as plantas obtidas *in vitro*, é necessário um período de aclimatização, após a remoção do ambiente *in vitro*, o que permitirá sua sobrevivência nas condições de cultivo em campo (Barboza *et al.*, 2006). A transferência da condição *in vitro* para o ambiente *ex vitro* é a etapa mais crítica da micropropagação, podendo ser um fator limitante para a produção das mudas micropropagadas de algumas espécies, pois as plantas são expostas a mudanças súbitas nas condições ambientais, sendo a perda de água o principal problema (Grattapaglia & Machado 1998; Rocha *et al.*, 2008).

A escolha de um substrato adequado reduz a mortalidade das plantas durante a aclimatização (Moreira *et al.*, 2006). O substrato exerce influência na arquitetura do sistema radicular e no estado nutricional das plantas; deve ter, portanto, a capacidade de reter umidade e de não se

compactar excessivamente, o que pode comprometer a drenagem do excesso de água durante as irrigações e a manutenção da aeração do sistema radicular, a fim de possibilitar o desenvolvimento satisfatório das plantas (Grattapaglia & Machado, 1998; Carvalho Filho *et al.*, 2002; Leal *et al.*, 2007).

A eliminação da etapa do enraizamento *in vitro* é desejável do ponto de vista econômico, pois reduz os custos de mão de obra, infraestrutura, espaço da sala de crescimento, energia elétrica e meio de cultura, além de produzir plantas aclimatizadas em curto período (Grattapaglia & Machado, 1998; Malda *et al.*, 1999). Segundo esses autores, o enraizamento *ex vitro*, diretamente no substrato, produz um sistema radicular mais desenvolvido e funcional, com maior número de raízes secundárias, sem a formação intermediária de calo, que dificulta a conexão do sistema vascular entre caule e raiz, o que pode garantir uma alta porcentagem de sobrevivência após a transferência para as condições *ex vitro*.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito de diferentes substratos e do enraizamento, na aclimatização de plantas de *Melocactus glaucescens*, propagadas *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Efeito do substrato na aclimatização dos brotos obtidos in vitro

Os brotos de *M. glaucescens*, com 120 dias, foram obtidos por organogênese direta em meio Murashige e Skoog (MS) (Murashige & Skoog 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, a partir da fragmentação de plantas germinadas *in vitro*.

Para o enraizamento, os brotos com 5-10 mm foram inoculados em tubo de ensaio (25 x 150 mm), contendo 15 mL de meio de cultura MS, com metade da concentração salina, suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose.

Após 30 dias, as raízes foram lavadas para remover o meio de cultura aderido, e, posteriormente, as plantas foram transferidas para recipientes plásticos de 50 mL, contendo 45 mL dos substratos: terra vegetal (T1), terra vegetal e areia lavada (2:1) (T2) e terra vegetal e areia lavada (1:1) (T3).

As plantas foram mantidas em canteiros, sob 100% de luminosidade, com regas diárias, utilizando-se borrifador, e, a cada 7 dias, foram realizadas regas com 8 mL de água. Aos 75 dias, foram avaliados a porcentagem de sobrevivência (%S); o diâmetro da parte aérea (DPA), medido transversalmente, considerando-se a maior largura do cladódio; o comprimento da parte aérea (CPA), medido da base do cladódio até o ápice; o comprimento da maior raiz (CR) e a massa seca total (MST). Essas variáveis foram avaliadas com auxílio de paquímetro digital (150 mm), para

DPA e CPA e régua milimetrada, para CR. A massa seca foi determinada após secagem em estufa com ventilação forçada, a 60 °C, por 72 horas.

Efeito de diferentes períodos de enraizamento na aclimatização dos brotos obtidos in vitro

Os brotos de *M. glaucescens* com 210 dias foram obtidos por organogênese direta em meio MS (Murashige & Skoog 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, a partir da fragmentação de plantas germinadas *in vitro*.

Para avaliar o efeito dos diferentes períodos de enraizamento na aclimatização, os brotos foram submetidos a 4 tratamentos: (T1) dessecados em temperatura ambiente por 4 dias e transferidos para recipientes plásticos de 50 mL, contendo 45 mL do substrato terra vegetal e areia lavada (1:1); transferidos para tubo de ensaio (25 x 150 mm), contendo 15 mL de meio de cultura MS, com metade da concentração salina, suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose por: 8 (T2), 16 (T3) e 23 (T4) dias. Após o período *in vitro*, os brotos, submetidos aos tratamentos 2, 3 e 4, foram retirados, e, quando na presença de raízes, estas foram lavadas para remover todo o meio de cultura aderido. As plantas foram transferidas para recipientes de 50 mL, contendo 45 mL do substrato: terra vegetal e areia lavada (1:1).

Antes da transferência para o substrato, foram avaliados o diâmetro e comprimento da parte aérea (DPA e CPA) e a porcentagem de brotos que produziram raízes (%R), em todos os tratamentos.

Após a transferência para o substrato, as plantas foram mantidas em canteiros, sob 100% de luminosidade, com regas diárias, utilizando-se borrifador e, a cada 7 dias, foram realizadas regas com 8 mL de água. Aos 75 dias, foram avaliados a porcentagem de sobrevivência (%S); o diâmetro e o comprimento da parte aérea (DPA e CPA); o comprimento da maior raiz (CR); a porcentagem de brotos que produziram raiz (%R) e a massa seca total (MST).

Todos os meios de cultura utilizados nesse trabalho foram gelificados com 6,5 g L⁻¹ de ágar, esterilizados quimicamente, segundo a metodologia de Teixeira *et al.* (2006), e o pH foi ajustado a 5,7. Os tubos de ensaio foram fechados com película de polivinilcloro (PVC).

As culturas *in vitro* foram mantidas a 25±3 °C, sob luz fluorescente com radiação fotossintética ativa de 60 μmol.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

Para ambos os experimentos, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com dez repetições e três plantas por repetição (uma planta por recipiente).

Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa estatístico Sisvar 4.3 (Ferreira, 2003). As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito do substrato na aclimatização dos brotos obtidos in vitro

Os valores observados para a sobrevivência das plantas aclimatizadas sob 100% de luminosidade, nos diferentes substratos, foram superiores a 93%, não havendo diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 1). Essas altas taxas de sobrevivência indicam que a etapa de rustificação dos brotos enraizados não é necessária para *M. glaucescens*, o que reduz o tempo *in vitro* e demonstra que a mudança do metabolismo heterotrófico para o autotrófico não é um fator limitante para a aclimatização dessa espécie (Tabela 1).

Esses resultados discordam de Rout *et al.* (2006), que afirmam ser necessário haver uma aclimatização gradual, das plantas micropropagadas, do ambiente de alta umidade e baixa irradiância para um ambiente inverso, capacitando essas plantas a sobreviver sob condições climáticas adversas. Segundo esses autores, as plantas crescidas *in vitro* são expostas a condições controladas, como altas quantidades de nutrientes inorgânicos e orgânicos, alta umidade, baixa luminosidade e poucas trocas gasosas, promovendo rápido crescimento e multiplicação, porém induz mudanças estruturais e fisiológicas nas plantas que podem dificultar sua sobrevivência, quando transferidas diretamente para o campo.

A rustificação é a etapa da micropropagação que induz modificações morfofisiológicas nas plantas, o que aumenta sua sobrevivência durante a transferência do cultivo *in vitro* para as condições *ex vitro* (Santana, 2003).

As espécies da família Cactaceae possuem características especializadas para sobreviverem em ambientes áridos, tais como, a presença de espinhos, de cera, de parênquima aquífero, de sistema radicular fasciculado e de Mecanismo Ácido das Crassuláceas (CAM), que reduzem a perda de água (Sriskandarajah & Serek, 2004; Arruda *et al.*, 2005; Khalafalla *et al.*, 2007). Essas características podem ter favorecido a independência da etapa de rustificação e os valores altos para a sobrevivência nas condições *ex vitro*. Malda *et al.* (1999) observaram que a perda de água após 20 dias de aclimatização não afetou a sobrevivência dos cactos *Coryphanta mínima* e *Obregonia denegrii*, e que, após esse período, as plantas iniciaram um processo de recuperação.

Na avaliação do crescimento das plantas na aclimatização de *M. glaucescens*, não houve diferença significativa para %S, DPA e CPA, nos três diferentes tipos de substratos (Tabela 1). No entanto, o substrato terra vegetal e areia (1:1), foi, em geral, mais eficiente, visto que os resultados observados para a variável CR e MST foram significativamente maiores (30,53 mm e 46,80 mg), do que os observados nos demais substratos (Tabela 1). O maior

valor para CR, no substrato contendo a maior porcentagem de areia, pode estar relacionado com a menor disponibilidade de nutrientes com relação aos demais substratos testados, o que estimularia o maior crescimento em comprimento da raiz em busca de nutrição (Cavalcanti & Resende, 2006).

Os resultados obtidos para as variáveis CR e MST demonstraram que o substrato adequado para o crescimento, na etapa da aclimatização das plantas micropropagadas de *M. glaucescens*, deve conter 50% de terra vegetal e 50% de areia lavada. A maior porcentagem de areia nesse substrato pode ter favorecido o melhor desenvolvimento das plantas, já que suas propriedades físicas possibilitam uma maior aeração e permeabilidade do solo, o que fornece condições para melhor enraizamento (Cavalcanti & Resende, 2006; Lone *et al.*, 2007).

Efeito de diferentes períodos de enraizamento na aclimatização dos brotos obtidos *in vitro*

Na avaliação realizada antes da transferência para o substrato, os valores, para as variáveis DPA e CPA dos brotos que foram mantidos *in vitro* após a excisão (T2, T3 e T4), foram superiores aos observados para os brotos que foram diretamente transferidos para o substrato (T1). Os brotos transferidos aos 8 (T2), 16 (T3) e 23 (T4) dias apresentaram maiores valores para o DPA, que correspondeu a um aumento de 23,40, 34,75 e 46,10%, respectivamente, em comparação com os observados em T1, enquanto, para CPA, o aumento foi de 29,78, 45,76 e 63,68% (Tabela 2).

As raízes surgiram a partir da 3ª semana, apenas em T3 e T4, em que os valores para a variável %R no 16º dia foi de 80%, sendo significativamente menor quando compa-

rado com os valores obtidos no 23º dia (96,67%) (Tabela 2). O período para o início do enraizamento *in vitro* em meio sem regulador vegetal varia entre as diferentes espécies de cactos, como observado em *Ariocarpus kotschoubeyanus* (15ª semana), *Mammillaria san-angelensis* (2ª-3ª semana), *Turbincarpus laui* (2ª semana) (Mata-Rosas *et al.*, 2001; Rubluo *et al.*, 2002; Moebius-Goldammer *et al.*, 2003).

Com relação à sobrevivência das plantas aclimatizadas, para os tratamentos T2, T3 e T4 (90,00, 86,67 e 86,67%, respectivamente) não houve diferença significativa, enquanto T1 (63,33%) apresentou valores significativamente menores (Tabela 3). Esses resultados discordam dos encontrados por Medeiros *et al.* (2006), que não observaram crescimento dos brotos não enraizados de *Notocactus magnificus* e apenas 20% dos brotos enraizados sobreviveram no ambiente *ex vitro*.

Resultados semelhantes para sobrevivência de plantas regeneradas *in vitro* em condições *ex vitro* foram observados para espécies de cactos *A. kotschoubeyanus* (95-100%), *Escobaria mínima* (92%), *Ferocactus acanthodes* (90%), *Mammillaria pectinifera* (76,3%), *Melocactus curvispinus* (75%), *Opuntia ellisiana* (100%), *Peleciphora aselliformis* (81,3%), *Pilosocereus robinii* (66% e 91,6%) e *Turbincarpus laui* (94-100%) (Ault & Blackmon, 1987; Mata-Rosas *et al.*, 2001; Juárez & Passera, 2002; Moebius-Goldammer *et al.*, 2003; Khalafalla *et al.*, 2007; Retes-Pruneda *et al.*, 2007; Quiala *et al.*, 2009).

A menor sobrevivência das plantas *ex vitro*, observada em T1, pode estar relacionada com os menores valores observados para as variáveis DPA e CPA analisadas, antes da transferência desses brotos para o substrato ou da

Tabela 1. Avaliação das plantas micropropagadas de *Melocactus glaucescens* em diferentes substratos após 75 dias da transferência para condição *ex vitro*. %S= Porcentagem de sobrevivência; DPA e CPA=diâmetro e comprimento da parte aérea; CR= Comprimento da maior raiz; MST= Massa seca total

Substrato		%S	DPA (mm)	CPA (mm)	CR (mm)	MST (mg)
Terra vegetal	Areia					
100%	0%	93,33a	7,11a	6,39a	25,33b	25,80b
75%	25%	93,33a	7,06a	6,46a	24,50b	28,50b
50%	50%	96,67a	7,46a	6,63a	30,53a	46,80a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott (p<0,05).

Tabela 2. Avaliação dos brotos micropropagados de *Melocactus glaucescens* mantidos *in vitro*, antes da transferência para o substrato. DPA e CPA=diâmetro e comprimento da parte aérea; %R= porcentagem de brotos que produziram raiz

Transferência	DPA (mm)	CPA (mm)	%R
T1	4,23c	4,13b	0c
T2 (8 dias)	5,22b	5,36a	0c
T3 (16 dias)	5,70b	6,02a	80,00b
T4 (23 dias)	6,18a	6,76a	96,67a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott (p<0,05).

dessecação excessiva desses brotos após a excisão do explante (Tabelas 2 e 3). O período de desidratação possibilita a perda de água acumulada em excesso durante o cultivo *in vitro*, o que evita o apodrecimento das raízes nas condições *ex vitro* (Ramirez-Malagon *et al.*, 2007). Para as espécies de cactos, a presença de uma matriz parenquimática, que permite a distensão e retração do corpo vegetativo, dependendo da disponibilidade de água, permite que tenham capacidade de se reidratar após o cultivo *in vitro* (Mauseth, 1993; Malda *et al.*, 1999; Khalafalla *et al.*, 2007). No entanto, o tempo de dessecação a que os brotos de *M. glaucescens* foram submetidos nesse trabalho, pode ter sido prejudicial.

Os maiores valores observados do DPA e CPA, antes da transferência para o substrato em T2, T3 e T4, refletiram-se nos valores encontrados na avaliação do crescimento *ex vitro*, que mostraram um aumento entre 54,50 e 82,56% para DPA e 58,43 e 103,09% para CPA, em comparação a T1.

Para o CR, os valores observados em T2, T3 e T4 (16,63, 19,00 e 21,30 mm) não apresentaram diferença significativa e foram superiores a T1 (10,67 mm). O mesmo comportamento ocorreu para a variável %R, em que, para T2, T3 e T4, os valores variaram entre 83,33 e 90% e em T1 63,33% (Tabela 3).

Esses resultados demonstram que, para o enraizamento e aclimatização de *M. glaucescens*, não é necessário o tratamento da planta e do substrato com fungicida, o que discorda dos resultados observados por Ramirez-Malagon *et al.* (2007), que demonstraram que esses tratamentos são fundamentais para espécies de cactos, por causa do apodrecimento das raízes, que ocorre no processo de aclimatização das plantas micropropagadas.

O enraizamento *ex vitro* dos brotos de *M. glaucescens*, em T1 e T2, sem nenhum tratamento, demonstra que estes são capazes de emitir raízes, independentemente da condição de cultivo, assim como relatado por Ault e Blackmon (1987), que observaram 90% de sobrevivência após transferência para as condições *ex vitro* dos brotos não enraizados de *Ferocactus acanthodes*. Malda *et al.* (1999) relataram, para *C. mínima* e *O. denegrii*, não haver diferença na aclimatização dessas espécies, quando enraizadas *in vitro* e *ex vitro*. Pérez-Molphe-Balch *et*

al. (1998), ao estudarem 21 espécies de cactos, observaram uma porcentagem de sobrevivência, *ex vitro*, variando de 50 a 95%, alcançada por brotos não enraizados, tratados nas condições *ex vitro* com uma mistura para enraizamento comercial. Os resultados observados neste trabalho discordam dos observados por Rodríguez-Garay & Rubluo (1992) que observaram uma deficiência no enraizamento *in vitro* dos brotos regenerados de *Aztekium ritteri*.

A formação de raízes *in vitro* e *ex vitro* em *M. glaucescens*, sem a necessidade da utilização de regulador vegetal, indica que a concentração dos hormônios endógenos é suficiente para promover a formação das raízes dos brotos nessa espécie. Os cactos, em geral, produzem um excesso de auxina sob condições de cultivo *in vitro*, que pode favorecer a formação de raízes em meio livre de regulador vegetal (Hubstenberger *et al.*, 1992; Sriskandarajah & Serek, 2004).

Resultados semelhantes, em que os brotos desenvolveram raízes sem tratamento com regulador vegetal, foram relatados para *A. kotschoubeyanus*, *C. mínima*, *F. acanthodes*, *Mammillaria carmenae*, *N. magnificus*, *O. denegrii*, *P. robinii*, *T. laui* (Ault & Blackmon, 1987; Malda *et al.*, 1999; Mata-Rosas *et al.*, 2001; Moebius-Goldammer *et al.*, 2003; Medeiros *et al.*, 2006; Retes-Pruneda *et al.*, 2007; Quiala *et al.*, 2009).

Estudos com espécies de cactos, em que o melhor tratamento para o enraizamento ocorreu sem adição de regulador vegetal e na presença de carvão, foram relatados para *Echinocereus schmollii* (72,2%) e *Escontria chiotilla* (100%) (Retes-Pruneda *et al.*, 2007).

Entretanto, o enraizamento com o uso de reguladores vegetais ocorre para algumas espécies de cactos. Frota *et al.* (2004) observaram, para *Opuntia ficus-indica*, que os melhores resultados ocorreram na concentração de 5 mg L⁻¹ de ácido indolacético (AIA). Escobar *et al.* (1986), ao estudarem diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento de *Opuntia amyclaea*, observaram que as raízes mais longas e com maior rapidez no crescimento ocorreram na presença de AIB a 5 µM. Khalafalla *et al.* (2007), ao estudarem em *O. ficus-indica* diferentes tipos (AIB, ácido naftaleno acético-ANA e ácido indolacético-AIA) e concentrações (0,00, 0,25, 0,50 e

Tabela 3. Avaliação das plantas micropropagadas de *Melocactus glaucescens* após 75 dias da transferência para as condições *ex vitro*. %S= Porcentagem de sobrevivência; DPA e CPA=diâmetro e comprimento da parte aérea; CR= Comprimento da maior raiz; %R= porcentagem de brotos que produziram raiz; MST= Massa seca total

Transferência	% S	DPA (mm)	CPA (mm)	CR (mm)	% R	MST (mg)
T1	63,33b	3,67b	3,56b	10,67b	63,33b	14,41a
T2 (8 dias)	90,00a	5,67a	5,64a	16,63a	90,00a	15,35a
T3 (16 dias)	86,67a	5,39a	5,62a	19,00a	83,33a	22,95a
T4 (23 dias)	86,67a	6,70a	7,23a	21,30a	86,67a	27,15a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

1,00 mg L⁻¹) de auxinas, observaram 100% de enraizamento em meio sem regulador vegetal, e que, no meio contendo 0,5 mg L⁻¹ de AIA, e nos demais tratamentos, os valores variaram de 50 a 83,3%. Valores de 100% de enraizamento foram observados para *Opuntia ellisiana* na presença do AIB a 25 e 50 µM (Juárez & Passera, 2002). Retes-Pruneda *et al.* (2007), ao utilizar 0,5 mg L⁻¹, observaram 93,7% de enraizamento em *Melocactus curvispinus*.

Os resultados encontrados em ambos os experimentos demonstram que as plantas de *M. glaucescens* podem ser aclimatizadas diretamente em ambiente sob 100% de luminosidade, assim como relatado por Juárez & Passera (2002) para a espécie *O. ellisiana*.

Tendo em vista que os brotos, em T2, foram transferidos para o substrato sem raiz e obtiveram 90% de sobrevivência e de porcentagem de enraizamento *ex vitro*, e que os valores para estas variáveis, em T1, foram significativamente menores que nos demais tratamentos (63,33%), sugere-se que os brotos com o DPA e CPA acima de 5 mm podem ser transferidos sem a etapa de enraizamento *in vitro*. Entretanto, estudos devem ser realizados para investigar o tempo de dessecação antes da transferência para o substrato, já que este também pode ter sido um fator que levou a valores baixos para %S em T1. Pérez-Molphe-Balch *et al.* (1998) afirmam que brotos de espécies de cactos com tamanho acima de 5 mm são apropriados para o enraizamento.

A restauração da competência de enraizamento, como observado nos tratamentos T1 e T2, é considerada sinônimo de rejuvenescimento na micropropagação, o que pode indicar o sucesso na etapa de aclimatização (Grattapaglia & Machado, 1998).

Na análise da MST, não houve diferença significativa entre os tratamentos e os valores variaram de 14,41 a 27,15 mg.

O menor valor para %S no experimento 2 (86,67 a 90%), em comparação com o 1 (96,67%), pode estar relacionado com um aumento na temperatura e, conseqüentemente, menor disponibilidade de água, decorrente da época do ano, já que o experimento 1 foi conduzido entre junho e agosto de 2009, enquanto o segundo foi conduzido entre setembro e dezembro de 2009.

CONCLUSÕES

É possível a aclimatização de plantas micropropagadas de *M. glaucescens*, sendo adequada a utilização do substrato, contendo 50% de terra vegetal e 50% de areia lavada.

O tamanho mínimo do DPA e CPA para transferência para as condições *ex vitro* é de 5 mm.

As etapas do enraizamento *in vitro* e rustificação podem ser eliminadas da micropropagação de *M. glaucescens*.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

REFERÊNCIAS

- Arruda E, Melo-de-Pinna GF & Alves M (2005) Anatomia dos órgãos vegetativos de Cactaceae da caatinga pernambucana. *Revista Brasileira de Botânica*, 28:589-601.
- Ault JR & Blackmon WJ (1987) *In vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae). *Hort Science*, 22:126-127.
- Barboza SBSC, Graciano-Ribeiro D, Teixeira JB, Portes TA & Souza LAC (2006) Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41:185-194.
- Carvalho Filho JLS, Arrigoni-Blank MF, Blank AF, Santos-Neto AL & Amâncio VF (2002) Produção de mudas de *Cassia grandis* L. em diferentes ambientes, recipientes e misturas de substratos. *Revista Ceres*, 40:341-352.
- Cavalcanti NB & Resende GM (2006). Efeito de diferentes substratos no desenvolvimento do mandacaru sem espinhos (*Cereus hildemannianus* K. Schum). *Revista Caatinga*, 19:255-260.
- Escobar HA, Villalobos, VM & Villegas A (1986) *Opuntia* micropropagation by axillary proliferation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 7:269-277.
- Estrada-Luna AA, Martínez-Hernández JJ, Torres-Torres ME & Chablé-Moreno F (2008) *In vitro* micropropagation of the ornamental prickly pear cactus *Opuntia lanigera* Salm-Dyck and effects of sprayed GA₃ after transplantation to *ex vitro* conditions. *Scientia Horticulturae*, 117:378-385.
- Ferreira DF (2003) SISVAR Sistema de análises estatísticas. Versão 4.3. Lavras, UFLA. CD-ROM
- Fonseca RBS (2004) 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. 123p.
- Frota HM, Carneiro, MSS, Llamoca-Zárate RM, Campos FAP & Peixoto MJA (2004) Proliferação e enraizamento *in vitro* de brotos de palma forrageira-*Opuntia ficus-indica* (L.) MILL Acta Scientiarum Biological Sciences, 26:235-238.
- Grattapaglia D & Machado MA (1998) Micropropagação. In: Torres AC, Caldas LS & Buso JA (Eds.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas v.1*. Brasília, EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPq. p.183-260.
- Hubstenberger JF, Clayton PW & Phillips GC (1992) Micropropagation of Cacti. In: Bayay YPS (Ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry v 20*. Berlin, Springer- Verlag. p.49-68.
- IUCN (2010) IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.2. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>. Acessado em: 25 de julho de 2010.
- Juárez MC & Passera CB, (2002) *In vitro* propagation of *Opuntia ellisiana* Griff. and acclimatization to field conditions. *Biocell*, 26:319-324.
- Khalafalla MM, Abdellatef E, Mohamed-Ahmed MM & Osman MG (2007) Micropropagation of cactus (*Opuntia ficus-indica*) as strategic tool to combat desertification in arid and semi arid regions. *Int. J. Sustain. Crop Production*, 2:1-8.

- Lambert SM, Borba EL, Machado MC & Andrade SCS (2006a) Allozyme diversity and morphometrics of *Melocactus paucispinus* (Cactaceae) and evidence for hybridization with *M. concinnus* in the Chapada Diamantina, North-eastern Brazil. *Annals of Botany*, 97:389-403.
- Lambert SM, Borba EL & Machado MC (2006b) Allozyme diversity and morphometrics of *Melocactus glaucescens* (Cactaceae) and investigation of the putative hybrid origin of *Melocactus xalbicephalus* (*Melocactus ernestii* X *M. glaucescens*) in north-eastern Brazil. *Plant Species Biology*, 21:93-108.
- Leal L, Biondi D & Nunes JRS (2007) Propagação por sementes de *Schlumbergera truncata* (Haw.) Moran (flor-de-maio) em diferentes substratos. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 29:277-280.
- Lone AB, Takahashi LSA, Faria RT & Destro D (2009) Desenvolvimento vegetativo de *Melocactus bahiensis* (Cactaceae) sob diferentes níveis de sobreamento. *Revista Ceres*, 56:199-203.
- Machado MC (2009) The genus *Melocactus* in eastern Brazil: part I - an introduction to *Melocactus*. *British Cactus & Succulent Journal*, 27:1-16.
- Malda BG, Backhaus RA & Martin C (1999) Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of in vitro cultured cactus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 58:1-9.
- Mata-Rosas M, De La Rosa MAM, Moebius-Goldammer K & Chávez-Avila VM (2001) Micropropagation of *Turbincarpus laui* Glass et Foster, an endemic and endangered species. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 37:400-404.
- Mauseth JD (1993) Water-storing and Cavitation-avoiding adaptations in wood of cacti. *Annals of Botany*, 72:81-89.
- Medeiros LA, Salvador RCS, Gallo LA, Oliveira ET & Demattê MESP (2006) *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 84:165-169.
- MMA (2008) Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br>>. Acessado em: 15 de novembro de 2008.
- Moebius-Goldammer KG, Mata-Rosas M & Chávez-Avila VM (2003) Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 39:388-393.
- Moreira MA, Carvalho JG, Pasqual M, Fráguas CB & Silva A (2006) Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. *Ciência e Agrotecnologia*, 30:875-879.
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, 15:473-497.
- Pérez-Molphe-Balch E, Reyes MEP, Amador EV, Rangel EM, Ruiz LRM & Viramontes HJL (1998) Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. *In vitro Cellular and Developmental Biology- Plant*, 34:131-135.
- Quiala E, Matos J, Montalvo G, Feria M, Chávez M., Capote A, Pérez N, Barbón R & Kowalski B (2009) *In vitro* propagation of *Pilosocereus robinii* (Lemaire) Byles et Rowley, endemic and endangered cactus. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 11:18-25.
- Ramirez-Malagon R, Aguillar-Ramirez I, Borodanenko A, Perez-Moreno L, Barrera-Guerra JL, Nuñez-Palenius HG & Ochoa-Alejo N (2007) *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 43:660-665.
- Retes-Pruneda JL, Valadez-Aguilar ML, Pérez-Reyes ME & Pérez-Molphe-Balch E (2007) Propagación *in vitro* de especies de *Echinocereus*, *Escontria*, *Mammillaria*, *Melocactus* y *Polaskia* (Cactaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 81:9-16.
- Rocha MAC da, Costa MAP de, Silva AS, Ledo CAS, Moreira MJS & Bastos LP (2008) Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30:769-774.
- Rodríguez-Garaz B & Rublao A (1992) *In vitro* morphogenetic responses of the endangered cactus *Aztekium ritteri* (Boedeker). *Cactus and Succulent Journal*, 64:116-119.
- Rout GR, Mohapatra A & Mohan Jain S (2006) Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances*, 24:531-560.
- Rublao A, Marín-Hernández T, Duval K, Vargas A & Márquez-Guzmán J (2002) Auxin induced morphogenic responses in long-term *in vitro* subcultured *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada (Cactaceae). *Scientia Horticulturae*, 95:341-349.
- Santana JRF (2003) Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de Annonaceae. Tese de doutorado. Universidade Federal de Lavras, Lavras. 237p.
- Sriskandarajah S & Serek M (2004) Regeneration from phylloclade explants and callus cultures of *Schlumbergera* e *Rhipsalidopsis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 78:75-81.
- Taylor NP (2000) Cacti of eastern Brazil. Royal Botanic Gardens, Kew. Taxonomy and Phytogeography of the Cactaceae of Eastern Brazil. Thesis for the award of 'Doctor of Philosophy'. Royal Botanic Gardens, Kew. 414p.
- Taylor NP & Zappi DC (2004) Cacti of Eastern Brazil. Kew, Richmond, Surrey, UK: Royal Botanic Gardens. 499p.
- Teixeira SL, Ribeiro JM & Teixeira MT (2006) Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv Smooth cayenne) behavior. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 86:375-378.