



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA**

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**



MARIA NAZARÉ GUIMARÃES MARCHI

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS, ANATÔMICOS E MOLECULARES
DA PROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ESPÉCIES
DE CACTOS ENDÊMICOS DA BAHIA**

FEIRA DE SANTANA-BA

2016

MARIA NAZARÉ GUIMARÃES MARCHI

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS, ANATÔMICOS E MOLECULARES
DA PROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ESPÉCIES
DE CACTOS ENDÊMICOS DA BAHIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito final para obtenção do título de Doutor em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana

Co-orientador: Profa. Dra. Moema Cortizo Bellintani

FEIRA DE SANTANA-BAHIA

2016

Ficha catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

Marchi, Maria Nazaré Guimarães

M265a Aspectos fisiológicos, anatômicos e moleculares da propagação e conservação *in vitro* de espécies de cactos endêmicos da Bahia / Maria Nazaré Guimarães Marchi. – Feira de Santana, 2016.

180 f.: il.

Orientador: José Raniere Ferreira de Santana.

Coorientadora: Moema Cortizo Bellintani.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Feira de Santana,
Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéricos Vegetais, 2016.

1. Cactaceae. 2. Cactos – Estabilidade genética - micropropagação.
3. Cactos – Conservação *in vitro*. I. Santana, José Raniere Ferreira de,
orient. II. Bellintani, Moema Cortizo, coorient. III. Universidade
Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU: 582.852

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Alone Lima Brito

Prof. Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira

Profa. Dra. Franciane Tavares Braga

Prof. Dr. Rogério Mercês Ferreira Santos

Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana

Orientador e presidente da banca

FEIRA DE SANTANA-BAHIA

2016

“De todo amor que eu tenho, metade foi tu que me deu.”

A João Batista Marchi, pelo amor maior, indescritível, imensurável e eterno.

Dedico

AGRADECIMENTOS

O fechamento deste ciclo é repleto de imensa gratidão. O maior deles é atribuído a força motriz que rege todo o universo de forma esplendorosa. Agradeço a Jeová Deus não somente pela saúde, força e coragem, mas também por me permitir viver todos esses quatro anos de forma plena e feliz. Gratidão eu devo também pelos inúmeros encontros que foram determinantes para conclusão desta etapa e que certamente foram conduzidos por ele.

Agradeço as duas razões do meu viver: Sr. João Batista Marchi e Sra. Dormelinda Guimarães Marchi. Obrigada pai por suplicar a minha existência, por te sentir presente em todos os momentos, pela sintonia, admiração, amor maior, cuidado e sabedoria. Obrigada por estar presente no fechamento desse ciclo e por podermos realizar esse sonho juntos. Sinto que nosso amor transcenderá a vida e que estaremos unidos sempre. Obrigada mãe pelo cuidado, exemplo de vida, paciência e tanto amor e carinho. Todos os princípios e valores que norteiam a minha vida foram derivados de ti e de todo empenho para manter nossa família unida. Sou grata também pela dedicação e cuidado diário aos dois dos nossos mais precisos membros.

Agradeço a Moema Cortizo Bellintani por ressignificar os meus sonhos e transformar a minha vida. Serei eternamente grata por toda amizade, carinho e respeito continuamente demonstrado. O seu amparo emocional, intelectual e, durante tantas vezes, financeiros, foram imprescindíveis ao longo de minha carreira. Obrigada também pelo aprendizado, confiança e parceria, serão inesquecíveis. Sua coerência, empenho e dedicação profissionais serão sempre exemplos para minha vida. Você foi um anjo e uma das pessoas mais lindas e admiráveis que eu tive a sorte de conhecer.

Agradeço ao Prof. Dr. José Raniere Ferreira de Santana, pela orientação, confiança, apoio e orações que contribuíram para a realização deste projeto.

Agradeço a meus irmãos Marcio Guimarães Marchi e Marcelo Guimarães Marchi e, aos primos que amo de igual maneira, Deise Paula Guimarães, Dênis Guimarães e Marcos Venícius Guimarães por todos os momentos familiares descontraídos e felizes.

Agradeço a Tia Rute e Tia Nice pelo cuidado e carinho e a meu Tio Jonas Marques Alves Sousa (*in memoriam*) pela disponibilidade em tantos momentos nos quais meu pai biológico não pode estar presente.

Agradeço a todos os amigos queridos que me encheram de carinho e me permitiram viver os melhores anos da minha vida. Amigos que a graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Bahia (UFBA) me presenteou e amigos da infância que me acompanharam por todas as etapas. A Rosane Santos, fiel companheira de sagas e projetos futuros, por todas as afinidades e bem querer. A Priscila Barreto pelo exemplo de vida, competência e admiração. A Roberta Canário e Consuelo Navarro que também integram o grupo das metralhas e fizeram parte dessa história.

Agradeço aos amigos “de Feira de Santana” Fábio Espírito Santo, Ana Paula Silva, Rodolfo Alves, Carolina Cerqueira e Cristina Rebouças pelo abrigo, apoio, carinho e todos os momentos felizes compartilhados.

Agradeço o todos que integram o grupo do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) pelo ambiente de trabalho

maravilhoso, respeito e apoio. Agradeço a Daniel Sousa e Adiele Almeida pela ajuda na montagem e avaliação de experimentos e, especialmente a Eva Pires Santa Barbara por ajudar na elaboração das pranchas, disponibilidade, energia positiva e dedicação. A Laila Civatti pela revisão, discussão de resultados e tradução do texto. A Zafira Gurgel, Gabriela Torres, Maira Miele e Gabriele Caroline pelos cafés descontraídos, virotes e pelos finais de tarde regados ao dendê no tabuleiro da baiana de acarajé.

Agradeço a Profa. Dra. Kelly Leite pela orientação e infraestrutura necessária para a análise anatômica no Laboratório de Anatomia e Identificação de Madeiras (LAVIM) da UFBA.

Agradeço a Profa. Dra. Alessandra Schnadelbach pela orientação, disponibilidade e aprendizado fundamentais para a execução das análises moleculares deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Maurício Santana Lordêlo pela colaboração imprescindível nas análises estatísticas.

Agradeço ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (Procad) pelo financiamento do doutorado sanduíche realizado na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e aos professores Vanildo Silveira e Claudete Santa-Catarina pelo acolhimento e orientação.

Agradeço a todos os amigos de Campos dos Goytacazes (RJ). Dalvânia Pinho Rodrigues por ter sido tão hospitaleira e Karina Nogueira pela companhia e afinidades. Agradeço a Angelo Heringer e Ricardo Reis pela orientação nos experimentos,

paciência, disponibilidade e gestações. Agradeço a Bianca Machado pela história de vida encantadora e exemplo de fé e a Ellen Moura, Victor Aragão, Kariane Sousa, Viviane Perdizio e Jackellinne Douétts por todos os momentos maravilhosos compartilhados.

Agradeço ao Irmão Delmar pela dedicação e proteção às espécies nativas de Morro do Chapéu (BA) e também pelo aprendizado e companhia durante as coletas.

Agradeço aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (PPGRGV) especialmente a Flávia Sousa pela ajuda nos trâmites de colegiado.

Agradeço aos alunos de Ciências Biológicas e Biotecnologia do Instituto Multidisciplinar em Saúde – IMS (UFBA) pelo aprendizado, convivência maravilhosa e, sobretudo por realizarem meu sonho em exercer a docência.

Agradeço ao PPGRGV da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) pela formação acadêmica e aprendizado.

Agradeço a Coordenação de Amparo de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos e, de forma geral, a educação pública de qualidade que exerceu um papel transformador em minha vida.

*Esquinas
Mil buzinas
Imagina orquestras
Samba no chafariz
Viva a folia
A dor não presta
Felicidade sim
O sol ensolarará a estrada dela
A lua alumiará o mar
A vida é bela
O sol, a estrada amarela
E as ondas, as ondas, as ondas*

(Dura na queda – Chico Buarque)

RESUMO

A família Cactaceae apresenta cerca de 100 gêneros e 1500 espécies predominantemente americanas e distribuídas por uma ampla diversidade de climas e ecossistemas. Devido à alta singularidade em termos de gêneros e espécies endêmicas bem como o uso potencial destas plantas para diversas finalidades, estudos acerca da propagação *in vitro* e conservação *ex situ* dessas espécies devem ser estabelecidos. Desta forma, o objetivo geral deste trabalho foi compreender as mudanças anatômicas, fisiológicas e moleculares associadas à propagação e conservação *in vitro* de *Discocactus zehntneri* subsp. *boomianus* e *Stephanocereus leutezelburgii*, espécies de cactáceas endêmicas da Bahia com potencial ornamental. Os reguladores aplicados não superaram o controle na indução de brotos/explante em ambas as espécies e para *S. leutezelburgii* a combinação de citocininas e auxinas aumentaram o percentual de brotos hiperidricos que não sobreviveram após a aclimatização. Brotos normais dessa espécie apresentaram 100% de sobrevivência em condições *ex vitro*. A calogênese foi potencializada pela adição de auxinas ao meio nutritivo para as duas espécies analisadas e calos com potencial para morfogênese *in vitro* foram obtidos. A análise proteômica revelou a expressão diferencial de proteínas marcadoras da embriogênese somática em duas linhagens de calos de *S. leutezelburgii*. O protocolo para criopreservação de brotos de *D. zehntneri* não foi eficiente, no entanto o armazenamento de sementes tanto em condições de nitrogênio líquido quanto em ultrafreezer mantiveram a qualidade fisiológica após o armazenamento por 360 e 180 dias, respectivamente. Os agentes osmóticos foram eficientes em inibir o crescimento *in vitro* da espécie por um ano sem perda na viabilidade.

PALAVRAS-CHAVE: estabilidade genética; micropropagação; proteômica.

ABSTRACT

The family Cactaceae has approximately 100 genera and 1500 species predominantly American and distributed by a wide variety of climates and ecosystems. Due to the high singularity in terms of genres and endemic species as well as the potential use of these plants for various purposes, studies on the *in vitro* propagation and *ex situ* conservation of these species must be established. Thus, the aim of this study was to understand the anatomical, physiological and molecular changes associated with the propagation and conservation *in vitro* *Discocactus zehntneri* subsp *boomianus* and *Stephanocereus luetzelburgii*, species endemic cactus of Bahia with ornamental potential. The regulators applied not exceeded the control in the induction of shoots/explant in both species and for *S. luetzelburgii* combination of cytokinins and auxins hiperidricos increased the percentage of shoots that did not survive after acclimatization. Normal shoots of this species have 100% survival in *ex vitro* conditions. The callus formation was enhanced by adding auxin to the nutrient medium for the two species analyzed and calluses with potential for *in vitro* morphogenesis were obtained. The proteomic analysis revealed the marker proteins differential expression of somatic embryogenesis in two strains of *S. luetzelburgii* calluses. The protocol for cryopreservation *D. zehntneri* shoots was not effective, however the seed storage either in liquid nitrogen conditions as for ultrafreezer maintained physiological quality after storage for 360 and 180 days, respectively. Osmotic agents were effective in inhibiting *in vitro* growth of the species for a year without loss of viability.

KEYWORDS: genetic stability; micropropagation; proteomics.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	14
CAPÍTULO 1	
Respostas morfogênicas de <i>Discocactus zehntneri</i> subsp <i>boomianus</i> cultivado <i>in vitro</i> : efeito de reguladores vegetais e tipos de explante.	26
CAPÍTULO 2	
Estratégias para conservação <i>ex situ</i> a médio e longo prazo de <i>Discocactus zehntneri</i> subsp <i>boomianus</i> .	54
CAPÍTULO 3	
Multiplicação <i>in vitro</i> e estabilidade genética de <i>Stephanocereus luetzelburgii</i> , espécie endêmica da Bahia e com potencial ornamental.	100
CAPÍTULO 4	
Induction of calogenesis in <i>Stephanocereus luetzelburgii</i> (Cactaceae): morpho-anatomical characterization and proteomics analysis.	135
CONSIDERAÇÕES FINAIS	179

INTRODUÇÃO GERAL

A família Cactaceae é tipicamente americana (Anderson, 2001) e inclui cerca de 100 gêneros e 1400 espécies (Judd et al. 2009). Poucas espécies ocorrem de forma natural em outros continentes, como *Rhipsalis baccifera*, que ocorre em países da África continental, Madagascar e Sri Lanka (Anderson, 2001; Cavalcante et al. 2013). O leste do Brasil, mais especificamente a região Nordeste e a maioria do Sudeste, é o terceiro centro de diversidade em ordem de importância da família (Taylor e Zappi, 2004; Silva et al. 2011 a), sendo o Estado da Bahia um dos centros de dispersão das cactáceas (Barroso et al. 2002).

Os representantes desta família estão distribuídos em quatro subfamílias: Pereskioideae, Maihuenioideae, Opuntioideae e Cactoideae (Nobel, 2002; Mauseth, 2006). A subfamília Cactoideae apresenta a maior biodiversidade, abrigando cerca de 85% das espécies (Bandyopadhyay e Sharma, 2000; Mauseth, 2006) e, é a mais representativa no território brasileiro (Silva et al. 2011 a).

Os cactos têm fascinado humanos desde que a primeira planta foi encontrada, há relatos da sua utilização há 3000 anos no Peru (Anderson, 2001). Hoje, diversas espécies têm sido utilizadas para fins alimentícios (Bouamama et al. 2011; Langer e Mergener, 2013; El Finiti et al. 2013), terapêuticos (Karimi et al. 2010; Karimi et al. 2012; Astello-Garcia et al. 2013), místicos (Andrade, 2008), ecológicos, (Costa et al. 2001; El Finiti et al. 2013), como fonte de pigmentos (Elias et al. 2014), dentre outros. No entanto, é na ornamentação que se encontra sua mais promissora utilidade, sobretudo para algumas espécies nativas do semiárido brasileiro (Cavalcante et al. 2013). Em resposta aos diferentes habitats, desde terras secas até florestas úmidas, os cactos evoluíram na forma e na fisiologia, de modo que hoje apresentam traços

especiais que fazem deles plantas com aparência distinta e de singular beleza (Cavalcante et al. 2013). Muitas características morfológicas intrínsecas à família tais como redução de folhas a espinhos, coloração e morfologia dos cladódios e das flores, têm despertado interesse de admiradores. Conseqüentemente, muitas espécies têm sido utilizadas para fins ornamentais (Lema-Rumińska, 2011; Teodora, 2012; Langer e Mergener, 2013; Lema- Rumińska et al. 2013). A subfamília Cactoideae é a mais diversificada e que tem despertado maior interesse nesse aspecto (Ritz et al. 2012).

O mercado de plantas ornamentais está em crescimento contínuo e devido às constantes mudanças na tendência desse setor, a cada ano, centenas de novas cultivares são produzidas substituindo variedades atuais (Kulus e Zalewska, 2014). Segundo estes autores, devido às mudanças nas preferências dos consumidores, as espécies que hoje não são usuais, podem no futuro serem atraentes para potenciais compradores e, portanto, constituem uma fonte de recursos genéticos que deve ser protegida e utilizada de forma sustentável. Neste aspecto, o Estado da Bahia apresenta muitas espécies endêmicas com potencial ornamental como *Discocactus zehntneri* subsp *boomianus* e *Stephanocereus luetzelburgii*, espécies alvo deste estudo (Figura 01).

Devido à alta diversidade e valor, sobretudo ornamental, as populações naturais da família têm sido sujeitas a constantes ameaças relacionadas tanto à destruição e fragmentação de habitats quanto ao comércio e a coleta ilegal (Rojas-Aréchiga e Vázquez-Yanes, 2000; Dávila-Figueroa et al. 2005; Silva et al. 2011 a). Conseqüentemente, todos os membros da família estão incluídos no Apêndice II do CITES (Hunt, 1999). Utilizando as categorias e critérios da IUCN Red List, Goettsch et al. (2015), estabeleceram que as cactáceas apresentam 31% das espécies ameaçadas de extinção, sendo o quinto grupo taxonômico mais ameaçado (Figura 02).

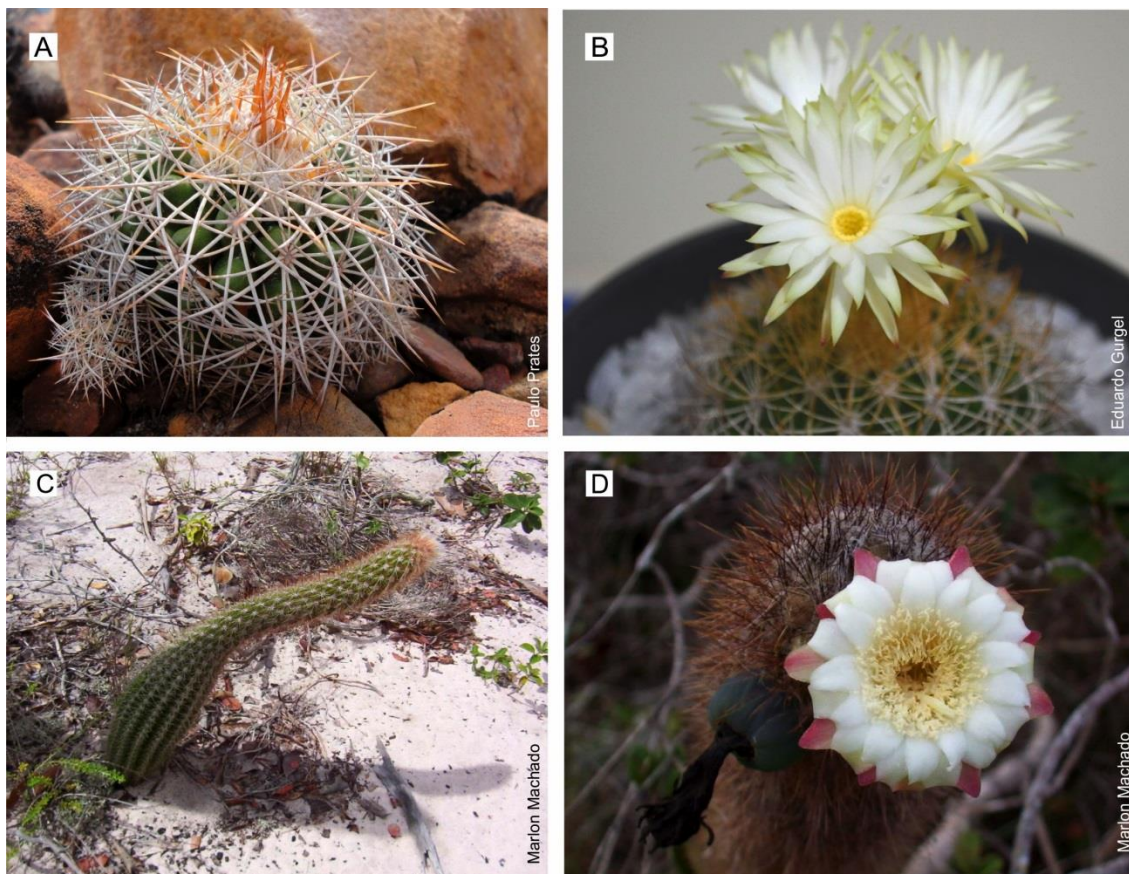


Figura 01. *Discocactus zehntneri* subsp *boomianus* (A, B) e *Stephanocereus luetzelburgii* (C e D): aspectos vegetativos (A, C) e reprodutivos (B, D).

O principal argumento para apoiar a conservação das cactáceas do Brasil relaciona-se com o grau de singularidade que as cactáceas brasileiras possuem, em termos de gêneros e espécies endêmicas, com relação às Américas como um todo (Silva et al. 2011 a). De acordo com a IUCN mais de 40% dos táxons brasileiros estão ameaçados em maior ou menor grau (Silva et al. 2011 a) e, portanto, necessitam de medidas de conservação (Figura 02). No Brasil alguns *hotspots* de ameaça para a família são encontrados no sul do Rio Grande do Sul, leste da Bahia e norte de Minas Gerais (Goettsch et al. 2015). Em decorrência da ampla distribuição e do quadro

intensivo de ameaças e degradação a que se sujeitam as cactáceas foi estabelecido o Plano de Ação para a Conservação das Cactáceas - PAN (Silva et al. 2011 a).

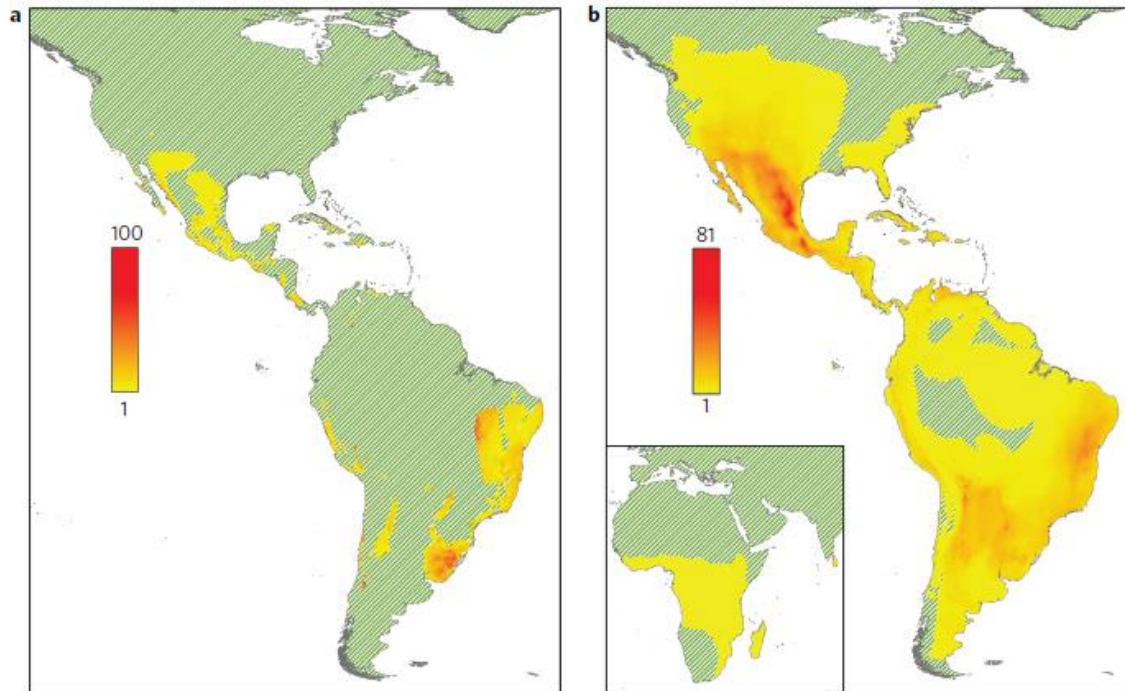


Figura 02. Padrões de biodiversidade de Cactaceae. Proporção de espécies que estão ameaçadas (vulneráveis, ameaçadas e criticamente ameaçadas) (A). Total de riqueza de espécies (B). Fonte: Goettsch et al. (2015).

Estudos de propagação constituem uma alternativa para a conservação da família Cactaceae (Rojas-Aréchiga e Vázquez-Yanes 2000). A propagação de cactos nativos geralmente é feito por sementes ou estaquia, no entanto estes métodos convencionais são inadequados para muitas espécies que apresentam sementes dormentes ou com baixas taxas de germinação, auto-esterilidade, crescimento lento, ou que necessitam de muitos anos para amadurecer (Clayton et al. 1990; Elias et al. 2014). Segundo Marchi et al. (2013) *D. zehntneri* e *S. luetzelburgui* apresentam baixas taxas de germinação, assim

como outras espécies nativas da Bahia que apresentam potencial ornamental (Veiga-Barbosa et al. 2012; Barbara et al. 2015; Civatti et al. 2015) o que reforça a necessidade de estratégias alternativas para sua multiplicação.

A cultura de tecidos vegetais é um eficiente método para a conservação *ex situ* da diversidade genética (Silva et al. 2011 a) e pode superar certas limitações associadas com a propagação convencional de cactos (Clayton et al. 1990). A micropropagação, a aplicação mais prática da cultura de tecidos (Grattapaglia e Machado, 1998), possibilita a propagação vegetativa em condições assépticas e com a utilização de pequenos fragmentos das plantas (Lema-Ruminska e Kalus, 2014) permitindo assim a rápida multiplicação de plantas geneticamente idênticas, independente da estação do ano, livres de doenças e em um pequeno espaço (Khattab et al. 2014; Perullo et al. 2015; Lema-Ruminska e Kalus, 2014). Além disso, as plantas derivadas deste sistema de multiplicação são mais robustas e apresentam um crescimento acelerado em relação àquelas derivadas da germinação de sementes ou estaquia (Lema-Ruminska e Kalus, 2014; Perullo et al. 2015), o que é especialmente importante para espécies com crescimento lento (Lema-Ruminska e Kalus, 2014). Desta forma, a cultura de tecidos vegetais constitui-se uma excelente estratégia tanto para conservação quanto para produção comercial de espécies ameaçadas e de importância econômica (Lema-Ruminska e Niedojadlo, 2012; Lema-Ruminska e Kalus, 2014; Elias, et al. 2014).

A regeneração *in vitro* é um fenômeno complexo que pode ser influenciado por um grande número de fatores genéticos e ambientais (Sriskandarajah et al. 2006) e pode ocorrer por duas vias: organogênese e embriogênese somática. Durante a morfogênese *in vitro* os brotos e embriões podem ser formados diretamente do explante ou através da fase intermediária de calo (George et al. 2008). No entanto, para muitas espécies a

formação de embriões somáticos está diretamente relacionada à indução da calogênese (Gueye et al. 2009). Não é possível estabelecer um protocolo de regeneração que se aplique às plantas de forma geral porque muitas respostas dos vegetais a cultura de tecidos é altamente dependente do genótipo e algumas importantes modificações e ajustes devem ser feitos quando uma nova espécie ou cultivar é utilizada, especialmente para otimizar as condições ambientais de cultura, como meio nutritivo, tipo, concentração e combinação de reguladores vegetais (Estrada-Luna et al. 2008). A utilização de marcadores bioquímicos, como as poliaminas (PAs) e hormônios vegetais, em conjunto com marcadores moleculares, como as proteínas e a expressão de genes marcadores, podem apresentar uma excelente estratégia para a otimização e controle dos processos morfogenéticos *in vitro* (Floh et al. 2007).

Apesar de historicamente a regeneração via cultura de tecidos ser considerada um método de clonagem que induz a propagação de cópias exatas da planta parental (Larkin e Scowcroft, 1981), atualmente a variação somaclonal tem sido comumente associada a este sistema de propagação (Khattab et al. 2014). A variação somaclonal pode ser definida como a variação encontrada em plantas derivadas da cultura de tecidos vegetais (Larkin e Scowcroft 1981). Quando o objetivo das culturas é a produção de plantas para fins comerciais, é necessário o estabelecimento de um sistema de micropropagação que produza plantas geneticamente iguais e estáveis (Khattab et al. 2014). Esse aspecto também deve ser considerado quando as técnicas de propagação *in vitro* são utilizadas para fins de conservação (Malda et al., 1999).

A variação somaclonal pode se oriunda de alterações genéticas devido à mutação, de modificações epigenéticas, da combinação de ambas (Sahijram et al. 2003) ou de variações citogenéticas (Khattab et al 2014). No ambiente *in vitro* diversos

fatores tais como o método usado para propagação, tipo de tecido ou material vegetal inicial, tipo e a concentração de reguladores vegetais, número e duração de subculturas e efeito do estresse e genótipo podem contribuir para a origem desta variação (Bairu et al. 2011).

Marcadores moleculares têm sido utilizados como detector de variações somaclonais nas culturas (Larkin e Scowcroft 1981; Sahijram et al. 2003) inclusive para algumas espécies de cactáceas (Resende et al. 2010; Hua et al. 2014; Khattab et al. 2014). O *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) tem sido um marcador frequentemente utilizado para a análise da fidelidade genética de plantas regeneradas *in vitro*, em virtude de ser reproduzível, simples, rápido e necessitar de uma pequena quantidade de DNA (Bhatia et al. 2011; Liu et al. 2011; Khattab et al. 2014).

A cultura de tecidos vegetais além de atuar indiretamente na conservação dos recursos genéticos por possibilitar a multiplicação de plantas ameaçadas em maior ou menor grau, é um eficiente método para a conservação *ex situ* da diversidade genética (Silva et al. 2011b; Flores et al. 2013). Os métodos empregados, seja a criopreservação ou o crescimento mínimo, são diferentes dependendo do tempo de armazenamento requisitado (Engelmann, 2011).

Desta forma, o objetivo geral deste trabalho foi compreender as mudanças anatômicas, fisiológicas e moleculares associadas à propagação e conservação *in vitro* de *D. zehntneri* subsp *boomianus* e *S. leutezlbургii*, espécies de cactáceas endêmicas da Bahia com potencial ornamental.

REFERÊNCIAS

- Anderson, E. F. The Cactus Family. Portland: Timber Press, 2001. 776p.
- Andrade, T., S., A. Cactos úteis na Bahia: ênfase no semi-árido. Pelotas: Ed. UESB, 2008. 128p.
- Astello-García, M. G., Robles-Martínez, M., Rosa, A. P. B. Santos-Díaz, M. S. Establishment of callus from *Opuntia robusta* Wendl., a wild and medicinal cactus, for phenolic compounds production. African Journal of Biotechnology. v.12, n.21, p.3204-3207, 2013.
- Bandyopadhyay, B. e Sharma, A. The use of multivariate analysis of karyotypes to determine relationships between species of *Opuntia* (Cactaceae). Caryologia, v.2, n. 53, p.121-126, 2000.
- Bairu, M. W., Aremu, A. O., Staden, J. V. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. Plant Growth Regulation, v.63, p. 147–17, 2011.
- Bhatia, R., Singh, K. P., Sharma, T. R., Jhang, T. Evaluation of the genetic fidelity of in vitro-propagated gérbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) using DNA-based markers. Plant Cell Tissue Organ Culture, v. 104, n.1, p. 131–135, 2011.
- Barroso, G. M., Peixoto, A. L., Ichaso, C. L. F., Guimarães, E. F., Costa, C. G. Sistemática de angiospermas do Brasil. v.1. 2 ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 309p.
- Bárbara, E. P. S., Silva, S. A., Souza, M. M. O. R., Gurgel, Z. E. R., Marchi, M. N. G., Bellintani, M. C. Germinação e criopreservação de sementes de cactos nativos da Bahia. Gaia Scientia. v.9, n. 2, p.91-96, 2015.
- Bouamama, B., Salem, A. B., Zoghلامي, N., Zemni, H., Mliki, A., GhorbeL, A. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature anthers of *Opuntia ficus-indica*. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, v.86, n. 4, p. 313–318, 2011.
- Cavalcante, A., Teles, M., Machado, M. Cactos do semiárido do Brasil: guia ilustrado. Campina Grande: Instituto Nacional do Semiárido, INSA, 2013. 103p.
- Civatti, L. M., Marchi, M. N. G., Bellintani, M. C. Conservação de sementes de cactos com potencial ornamental armazenadas sob diferentes condições de umidade. Gaia Scientia, v. 9, n.2, p. 17-26, 2015.
- Clayton, P. W., Hubstenberger, J. F. Phillips, G. C. Micropropagation of Members of the Cactaceae Subtribe Cactinae. Journal of the American Society for Horticultural Science. v.115, n.2, p.337-343, 1990.

Costa, S. P., Soares, A. A., Arnholdt-Schmitt, B. Studies on the Induction of Embryogenic Globular Structures in *Opuntia ficus-indica*. J. PACD, p. 66-74, 2001.

Dávila-Figueroa, C. A., Rosa-Carrillo, M. L., Pérez-Molphe-Balch, E. *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant, v. 41, p.540–545, 2005.

El Finti, A., El Boullani, R., Aabd, A. N., Msanda, F., Serghini, M. A. El Mousadik, A. *In Vitro* Propagation of Three Moroccan Prickly Pear Cactus *Opuntia* and Plant Establishment in Soil. Notulae Scientia Biologicae. v.5, n.1, p.39-44, 2013.

Elias, H. Taha, R. M., Hasbullah, N. A., Mohamed, N. Manan, A. A., Mahmad, N., Mohajer, S. The effects of plant growth regulators on shoot formation, regeneration and coloured callus production in *Echinocereus cinerascens* in vitro. Plant Cell Tissue Organ Culture, v. 120, p.729-739, 2014.

Engelmann, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant. v. 47, n.1, p. 5-16, 2011.

Estrada-Luna, A. A., Martínez-Hernández, J. J., Torres-Torres, M. E., Chablé-Moreno, F. *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. v.117, n.4, p.378–385, 2008.

Floh, E. I. S., Santa-Catarina, C., Silveira, V. Marcadores bioquímicos e moleculares para estudos da morfogênese in vitro. Revista Brasileira de Horticultura Ornamental, v.13, p. 1992-2001, 2007.

Flores, R., Uliana, S. C., Pimentel, N., Garlet, T. M. B. Sucrose and sorbitol on the *in vitro* conservation of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). Journal of Biotechnology and Biodiversity. v.4, n.3, p. 192-199, 2013.

George, E. F., Hall, M. A., Klerk, G. Plant Propagation by Tissue Culture. The Background. 3ed. v.1. Dordrecht: Springer, 2008. 504p.

Grattapaglia, D., Machado, M. A., Micropropagação. In: Torres, A. C., Caldas, L. S., Buso, J. A. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de plantas. vol.1. Brasília: Embrapa-SPI, 1998, cap.9, p.183-260.

Goettsch. B. et al. High proportion of cactus species threatened with extinction. Nature Plants. n. 15142, p. 1-7, 2015.

Gueye, B., Saïd-Ahmed, H., Morcillo, F., Borgel, A., Sané, D., Hilbert, J.-L., Verdeil, J.-L., Blervacq, A.-S., Callogenesis and rhizogenesis in date palm leaf segments: are there similarities between the two auxin-induced pathways? Plant Cell, Tissue and Organ Culture. v.98, n.1, p.47–58, 2009.

- Hua, Q., Chen, P., Liu, W., Ma, Y., Liang, R., Wang, L., Wang, Z., Hu, G., Qin, Y. A protocol for rapid in vitro propagation of genetically diverse pitaya. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 120, p.741-745, 2015.
- Hunt, D.R. 1999. *Capes Cactaceae Checklist*. Royal Botanic Gardens, Kew, 315 p.
- IUCN 2001. *IUCN Red List Categories: Version 3.1*. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. Pp. 23.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., Donoghue, M. J. *Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 612p.
- Karimi, O., Saidi, A. The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic Embryogenesis. *Molecular Biology Reports*. v.37, p.2493–2507, 2010.
- Karimi, N., Kianamiri, S., Mousavi, E., Barkhordar, M. 2012. Study of genotype effect, different media and time of explanting on callus induction in *Cereus peruvianus* Mill.(Cactaceae). *Trakia Journal of Sciences*. v.10, p.19-22, 2012.
- Khattab, S., El Sherif, F., El-Garhy, H. A., Ahmedc, S., Ibrahimc, A. Genetic and phytochemical analysis of the in vitro regenerated *Pilosocereus robinii* by ISSR, SDS–PAGE and HPLC. *Gene*, v.533, n.1, p.313–321, 2014.
- Kulus, D. e Zalewska, M. Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species – A review. *Scientia Horticulturae*, v.168, p. 88–107, 2014.
- Langer, D. F. e Mergener, R.A. Cultivo *in vitro* de *Cereus hildmannianus* K. Shum. *Unoesc & Ciência – ACBS*. v.4, n.1, p.7-14, 2013.
- Larkin, P.J. e Scowcroft W.R. Somaclonal Variation - a Novel Source of Variability from Cell Cultures for Plant Improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, v.60, p.197-214, 1981.
- Lema-Rumińska, J.e Kulus, D. Micropropagation of Cacti - a Review. *Haseltonia*. n.19, 46–63, 2014.
- Lema-Rumińska, J., Flow cytometric analysis of somatic embryos, shoots, and calli of the cactus *Copiapoa tenuissima* Ritt. forma *monstruosa*. In *Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 106, n.3, p 531-535, 2011.
- Lema-Rumińska, J., Goncerzewicz, K., Gabriel, M. Influence of Abscisic Acid and Sucrose on Somatic Embryogenesis in Cactus *Copiapoa tenuissima* Ritt. forma *monstruosa*. *The ScientificWorld Journal*, v. 2013, p.1-7, 2013.
- Liu, F., Huang, L., Li, Y., Reinhoud, P., Jongsma, M. A., Wang, C. Shoot organogenesis in leaf explants of *Hydrangea macrophylla* ‘Hyd1’ and assessing genetic

- stability of regenerants using ISSR markers. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, v. 104, n. 1, p. 111–117, 2011.
- Malda, G., Suzán, H.; Backhaus, R. *In vitro* cultura as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae*, v.81, p.71-87, 1999.
- Marchi, M.N.G. Viana, C. M., Civatti, L. M., Bellintani, M. C. Santana, J. R. F. et al. Seed cryopreservation of the native cacti *Discocactus zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* and *Stephanocereus luetzelburgii* from Bahia, Brazil. *African Journal of Biotechnology*. v.12, n.21, p.3250-3254, 2013.
- Mauseth, J. D. Structure-function relationships in highly modified shoots of Cactaceae. *Annals of Botany*, v.98, p.901-926, 2006.
- Perullo, N., Determann, R. O., Cruse-Sanders, J. M., G. S. Seed cryopreservation and micropropagation of the critically endangered species swamp pink (*Helonias bullata* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. v.51, n. 3, p. 284-293, 2015.
- Nobel, Park S. *Cacti: Biology and Uses*. California: Regents of the University of California, 2002. 280 p.
- Sahijram, L., Soneji, J. R., Bollamma, K. T. Analyzing somaclonal variation in micropropagated Bananas (*Musa Spp.*). *In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant*, v.39, p.551–556, 2003.
- Sriskandarajah, S., Prinsen, E., Motyka, V. Dobrev, P. I., Serek, M. *Schlumbergera* and *Rhipsalidopsis* in Relation to Endogenous Phytohormones, Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase, and Peroxidase Activities. *Journal of Plant Growth Regulation*. v.25, n.1, p.79–88, 2006.
- Silva, S. R., Zappi, D., Taylor, N., Machado, M. Plano Nacional para Conservação das Cactáceas. Série Espécies Ameaçadas n° 24. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Diversidade, ICMBIO. 111p. 2011. a
- Silva, R. C., Camillo, J., Luis, Z. G., Scherwinski-Pereira, J. E. Potencial germinativo e morfoanatomia foliar de plântulas de pinhão-manso originadas de germoplasma criopreservado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.46, n.8, p.836-844, 2011.b
- Resende, G. A., Claudete, A. M., Machado, M. F. P. S. Somaclonal variation in *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae): its potential to generate new varieties and broaden the species's genetic basis. *Journal of Basic & Applied Genetics*, v. 21, n.1, p. 33-42, 2010.
- Ritz, C. M., Reiker, J., Charles, G., Hoxey, P., Hunt, D., Lowry, M., Stuppy, W., Taylor, N. Molecular phylogeny and character evolution in terete-stemmed Andean *Opuntias* (Cactaceae_Opuntioideae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 65, p.668–681, 2012.

Rojas-Aréchiga, M. e Vázquez-Yanes, C., Cactus seed germination: a review. *Journal of Arid Environments*, v. 44, p.85–104, 2000.

Taylor, N. e Zappi, D. *Cacti: of Eastern Brazil*. Richmond, Surrey: Royal Botanic Gardens, Kew, 2004. 499 p.

Teodora, V. I. Investigation on the of 2,4 –dichlorophenoxyacetic acid (2,4-d) on the process of callus from in vitro cultures *Echinocactus* (pfiff.) *mihanovichii*. *Analele Universității din Oradea, Fascicula Protecția Mediului*, v.19, p.305-311, 2012.

Veiga-Barbosa, L., González-Benito, M.E., Assis, J.G.A., Pérez-García, F. Germination and cryopreservation of several cactus species from NE Brazil. *Seed Science and Technology*, v.38, p.218-224, 2010.

CAPÍTULO 01

RESPOSTAS MORFOGENÉTICAS DE *Discocactus zehntneri* subsp *boomianus*
CULTIVADO *in vitro*: EFEITO DE REGULADORES VEGETAIS E TIPOS DE
EXPLANTE

RESUMO

Discocactus zehntneri subsp. *boomianus* é uma espécie de cacto nativo do semiárido brasileiro que apresenta potencial ornamental. No entanto, a baixa germinabilidade das sementes bem como o crescimento lento típico de espécies com metabolismo CAM (metabolismo ácido das crassuláceas) limitam significativamente a sua propagação. O objetivo deste trabalho foi estabelecer protocolo para a morfogênese *in vitro* desta espécie com ênfase no tipo de explante, regulador vegetal e condições de cultivo. Foram realizados dois experimentos independentes onde foi analisada a interação entre diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D: 0; 9; 18; 27; 36 μM) e cinetina (0; 4,65; 9,29 μM) no explante transversal cultivado na luz e tipos e concentrações das auxinas ácido naftalenoacético (ANA), 2,4D e picloram (0; 50; 100; 200; 400 μM) no explante TCL (*thin cell layer*) cultivado no escuro. Não houve interação significativa entre 2,4D e cinetina para as variáveis analisadas no explante transversal, apenas o 2,4D potencializou interferiu significativamente. Concentrações intermediárias desse regulador foram mais eficientes para calogênese e brotos foram induzidos em meio nutritivo isento de regulador vegetal por organogênese direta. Quando diferentes tipos de auxina foram testados o picloram apresentou os melhores resultados independente da concentração de regulador testada. Os calos obtidos variaram quanto à textura e coloração e, quando cultivados na luz, houve a ocorrência da rizogênese sob baixas concentrações de auxina. Calos derivados do explante tipo TCL cultivados no escuro em meios suplementados com picloram apresentaram centros meristemáticos que sugerem potencial para organogênese ou embriogênese somática desde que estímulos específicos sejam disponibilizados.

PALAVRAS-CHAVE: cultura de tecidos; cactos; calogênese; organogênese; reguladores vegetais.

ABSTRACT

Discocactus zehntneri subsp *boomianus* is a species of cactus native of the Brazilian semiarid with ornamental potential. However, poor seed germination as well as the typical slow-growing species with CAM metabolism (crassulacean acid metabolism) significantly limit their propagation. The objective of this study was to establish protocol for the in vitro morphogenesis of this species with emphasis on the type of explant, plant growth regulator and growing conditions. Two independent experiments were conducted where it was analyzed the interaction between different acid concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2.4-D: 0; 9; 18; 27; 36 μM) and kinetin (0; 4.65; 9.29 μM) in the transversal explant cultivated in light and types and concentrations of naphthalene acetic acid auxin (NAA), 2.4-D and picloram (0, 50, 100, 200, 400 μM) in explant TCL (thin cell layer) cultivated in the dark. There was no significant interaction between 2.4-D and kinetin for the variables analyzed in the transversal explant, only 2.4D potentiated significantly interfered. Intermediate concentrations of this regulator were more efficient for callus induction and buds were induced in nutrient medium free of plant growth regulator for direct organogenesis. When different types of auxin were tested picloram showed the best results, regardless of the tested regulator concentration. The calli obtained vary in texture and color, and when grown in light, there was the occurrence of root formation at low concentrations of auxin. Callus derived from explant type TCL cultivated in the dark supplemented with picloram media showed meristematic centers that suggest potential for organogenesis or somatic embryogenesis from that specific stimuli are available.

KEYWORDS: cacti; callogenesis; organogenesis; plant growth regulator; tissue culture.

INTRODUÇÃO

A família Cactaceae é tipicamente americana e distribuída por uma ampla variedade de climas e ecossistemas, como no semiárido brasileiro, considerado um centro de riqueza de cactos por abrigar cerca de 100 espécies nativas das quais cerca de 80 são endêmicas (Cavalcante et al. 2013). Muitas dessas espécies são utilizadas para fins terapêuticos, alimentícios, místicos e ornamentais (Andrade, 2008). Devido à rusticidade e beleza oferecida, o interesse popular nos cactos para ornamentação criou uma forte demanda comercial (Cavalcante et al. 2013).

O gênero *Discocactus* em quase sua totalidade é restrito ao Brasil (Machado et al. 2005) e seis espécies são nativas do semiárido, entre elas o *D. zehntneri* subsp *boomianus* (Cavalcante et al. 2013). Estes cactos possuem cladódio globoso não ramificado, como os coroas-de-frade (Cavalcante et al. 2013), e apresentam potencial ornamental. Todas as espécies de *Discocactus* encontram-se ameaçadas de extinção, razões intrínsecas para isso incluem o tamanho reduzido de populações conhecidas para cada espécie e a especificidade de habitat fazendo com que as populações ocorram em áreas restritas (Machado et al. 2005). Além disso, segundo os autores, as populações são extremamente vulneráveis tanto a modificação e destruição de habitat quanto à coleta extrativista.

A propagação de cactos nativos geralmente é feita por germinação de sementes e estaquia, entretanto estes métodos de propagação são inadequados para algumas espécies com sementes dormentes e/ou baixas taxas de germinação e crescimento lento (Clayton et al. 1990). *D. zehntneri* subsp *boomianus* assim como outras espécies nativas e de potencial ornamental apresentaram baixas taxas de germinação *in vitro*, provavelmente associada a algum tipo de dormência (Bárbara et al. 2015; Civatti et al.

2015; Marchi et al. 2013), o que limita a sua propagação sexual. As técnicas de cultura de tecidos podem superar certas limitações associadas à propagação convencional de muitas espécies de cactos raros ou nativos (Clayton et al. 1990; Sudharsan et al. 2003), entretanto, na literatura são escassos os trabalhos que abordem o tema (Bárbara et al. 2015; Karimi et al. 2012; Resende et al. 2010; Medeiros et al. 2006; Al-Ramamneh et al. 2006).

A micropropagação é um método de propagação vegetativa realizada sob condições assépticas com a utilização de fragmentos de plantas denominados explantes (Lema-Ruminska e Kalus, 2014). Esta ferramenta possibilita a produção em larga escala de clones, livres de doenças e em um curto espaço de tempo (Khattab et al 2014; Perullo et al. 2015). Além disso, as plantas derivadas deste sistema de propagação são muitas vezes mais robustas e apresentam um crescimento mais acelerado em comparação com plantas semelhantes produzidas por germinação de sementes ou estaquia (Perullo et al. 2015).

A regeneração *in vitro* é um fenômeno complexo que pode ser influenciado por um grande número de fatores genéticos e ambientais (Sriskandarajah et al. 2006). Um protocolo geral não é possível porque muitas das respostas das plantas a cultura de tecidos é altamente dependente do genótipo e algumas importantes modificações e ajustes devem ser feitos quando uma nova espécie ou cultivar é utilizada, especialmente para otimizar as condições ambientais de cultura, como meio nutritivo e tipo, concentração e combinação de reguladores vegetais (Estrada-Luna et al. 2008). Auxinas e citocininas são os reguladores vegetais mais importantes para a regulação do crescimento e morfogênese *in vitro* (George et al. 2008) e diversas classes dessas substâncias reguladoras tem sido eficientes na propagação *in vitro* de cactáceas (Nunez

et al. 2014; Hua et al. 2014; Román et al. 2014; Khattab et al. 2014; Astello-Garcia et al. 2013; Viñas et al. 2012; Karimi et al. 2010).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a morfogênese *in vitro* de *D. zehntneri* subsp *boomianus* em função de diferentes tipos e concentrações de reguladores vegetais, tipos de explantes e ambientes de cultivo, bem como realizar a análise anatômica de calos com potencial de regeneração *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Estabelecimento in vitro

Frutos maduros de *Discocactus zehntneri* subsp *boomianus* foram coletados em diferentes populações da espécie no município de Morro do Chapéu – BA. Após a retirada dos frutos, as sementes foram secas em papel filtro, beneficiadas e armazenadas em sacos de papel a temperatura ambiente. Posteriormente, as sementes foram desinfestadas quimicamente por um minuto em álcool absoluto e 15 minutos em hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) e lavadas três vezes em água estéril. Em seguida, as sementes foram inoculadas em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) com metade da concentração salina (MS/2) suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 6,5 g L⁻¹ de ágar. O meio de cultura teve o pH aferido para 5,6 - 5,8 e, posteriormente, foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C. Após a germinação as plantas foram incorporadas a coleção do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal da Bahia (LCTV-UFBA) e, após aproximadamente dois anos de estabelecimento *in vitro*, foram utilizadas como fonte de explante.

Efeito de 2,4D e cinetina na morfogênese in vitro de explantes transversais cultivados na luz (Experimento 01)

Segmentos transversais do cladódio de aproximadamente 5-6 mm de comprimento foram excisados de plantas previamente estabelecidas *in vitro* e inoculados em tubos de ensaio contendo 15 ml de meio MS suplementado com diferentes concentrações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D: 0; 9; 18; 27; 36 μM) e cinetina (0; 4,65; 9,29 μM) isolados ou combinados entre si. Os meios nutritivos foram acrescidos de 30 g L^{-1} de sacarose e solidificados com 6,5 g L^{-1} de ágar. As unidades experimentais foram mantidas por 90 dias em sala de crescimento a $25 \pm 3^\circ\text{C}$ sob luz branca fluorescente ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e 16h de fotoperíodo. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 5 x 3 (concentrações de 2,4D x concentrações de cinetina) com seis repetições de cinco amostras cada por tratamento.

Efeito de diferentes tipos de auxina na morfogênese in vitro de explantes TCL cultivados no escuro (Experimento 02)

Foram testadas diferentes concentrações (50; 100; 200; 400 μM) de três tipos de auxina, 2,4D, ácido naftalenoacético (ANA) e picloram, além de um tratamento controle isento de regulador vegetal, para segmentos do cladódio de espessura fina (*thin cell layer*, TCL) com aproximadamente 1 mm de comprimento (Silva et al. 2003). Os explantes foram inoculados em placas de Petri (90 mm x 15 mm) contendo 50 mL de meio MS suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, acrescido de 1,5 g L^{-1} de carvão ativado e solidificado com 6,5 g L^{-1} de ágar. As unidades experimentais foram mantidas por 30 dias em câmeras tipo BOD no escuro a $25 \pm 3^\circ\text{C}$. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3 x 4 (tipo de auxina x concentração de regulador) com cinco repetições de seis amostras cada.

Variáveis analisadas e análise estatística

Transcorrido o tempo estabelecido para cada experimento as variáveis analisadas no primeiro ensaio foram sobrevivência (%), brotação (%), número de brotos/explantes e calogênese. No ensaio seguinte apenas a calogênese foi analisada (%). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo Teste de Scoot-Knott a 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico Sisvar 5.1 (Ferreira, 2011).

Análise histológica

Segmentos transversais de calos induzidos em explantes tipo TCL em meio MS suplementado com 100 µM de picloram foram selecionados para a análise anatômica. As amostras foram fixadas em FAA₇₀ (formaldeído, ácido acético e etanol 70%, 1:1:18, v/v) (Johansen, 1940) por no mínimo 24 horas, a fim de estabilizar os componentes celulares e paralisar tanto os processos vitais quanto a autólise (Kraus e Arduin, 1997). Após a fixação, as amostras foram emblocadas em resina histológica sintética (Leica historesin). Para tanto, as amostras foram submetidas à desidratação em série etílica crescente (álcool 70, 80, 90 e 100%) por uma hora na primeira concentração e duas horas nas seguintes; pré-infiltração em álcool 100% e resina pura (1:1) por duas horas e posterior infiltração em resina ativada por no mínimo 24 horas em ambiente refrigerado. Todas as etapas seguiram as instruções do fabricante. Para a obtenção dos cortes histológicos, as amostras foram montadas em histomoldes de polietileno 6x9mm contendo resina de inclusão (resina ativada + endurecedor) e, imediatamente levadas à estufa a 50 °C para endurecimento. As amostras incluídas em resina foram seccionadas em micrótomo rotativo (Thermo scientific – HM 325) obtendo-se secções transversais de 5 µm de espessura. Em seguida, as lâminas foram coradas com azul de toluidina

0,05% (O'Brien et al. 1965) por 5 minutos e lavadas em água de torneira. As lâminas foram montadas em meio permanente com resina sintética Entellan®. A visualização ocorreu em microscópio óptico Axio Scope A1 com câmera digital Cannon acoplada utilizando software AxioVision Release versão 4.8.2.

RESULTADOS

Para o explante transversal cultivado em condições de luz não houve interação significativa entre os fatores 2,4D e cinetina para as variáveis analisadas ($p > 0,05$). Neste caso, apenas o 2,4D interferiu significativamente. O aumento da concentração do 2,4D diminuiu significativamente a sobrevivência dos explantes de 100% (controle) para até 7%, na presença de 36,02 μM de 2,4D.

Tabela 1: Efeito de diferentes concentrações de 2,4D na sobrevivência (%), brotação (%) brotos/explantes e calogênese (%) de *Discocactus zehntneri* subsp *boomianus*.

2,4D (μM)	Sobrevivência (%)	Brotação (%)	Brotos/explante	Calogênese (%)
0,00	100a	62a	1,00a	0b
9,05	49b	1b	0,11b	11a
18,10	26c	0b	0,00b	7a
27,15	12d	0b	0,00b	7a
36,02	7d	0b	0,00b	2b

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas linhas não diferem significativamente entre si pelo teste Skoot-knott ($p > 0,05$).

As variáveis brotação e número de brotos/explante seguiram a mesma tendência. O 2,4D reduziu significativamente a brotação de 62% (controle) para até 0% no

tratamento com concentração igual ou superior a 18,10 μM e, o melhor resultado para a variável número de brotos/explante foi obtido na ausência de reguladores vegetais (Tabela 01). Os brotos foram obtidos via organogênese direta através ativação das aréolas (Figura 01 A), meristemas laterais típicos de representantes da família.

Apenas os tratamentos suplementados com 2,4D induziram a formação de calo (Tabela 01). O controle e o tratamento suplementado com a maior concentração de auxina apresentaram os resultados menos favoráveis, 0 e 2% respectivamente. Os melhores resultados, 11 e 7%, ocorreram nas concentrações intermediárias de auxina. Os calos derivados do explante transversal iniciaram o seu desenvolvimento depois da terceira semana de cultivo na luz e ao final dos 90 dias apresentaram um padrão morfológico variado que não apresentou uma tendência entre as diversas concentrações de 2,4D e cinetina testadas. De modo geral, os calos apresentaram textura compacta (Figura 01 B-F) e sua formação ocorreu tanto na superfície adaxial (Figura 01 B, E) quanto nas laterais do explante transversal (Figura 01 C). A superfície dos calos compactos variou de lisa (Figura 01 B) e com estruturas filamentosas (Figura 01 D) a irregular (Figura 01 E), neste último caso foi possível observar a presença de células pequenas e isodiamétricas na superfície (Figura 01 F).

Com relação à coloração, houve uma variação entre translúcido, verde e amarelo. Em concentrações menores de 2,4D a coloração dos calos variou entre translúcido e tons de verde e em concentrações mais elevadas de 2,4D apenas calos amarelos foram identificados. Além disso, em alguns calos (9,05 μM 2,4D; 9,05 μM 2,4D + 9,29 μM cinetina; 18,10 μM 2,4D + 9,29 μM cinetina) foi possível observar estruturas semelhante a pêlos radiculares, evidenciando a regeneração de raiz por parte

destes (Figura 01 D). Na maioria dos casos houve uma densidade significativa dos pêlos que impossibilitou a visualização da raiz primária.

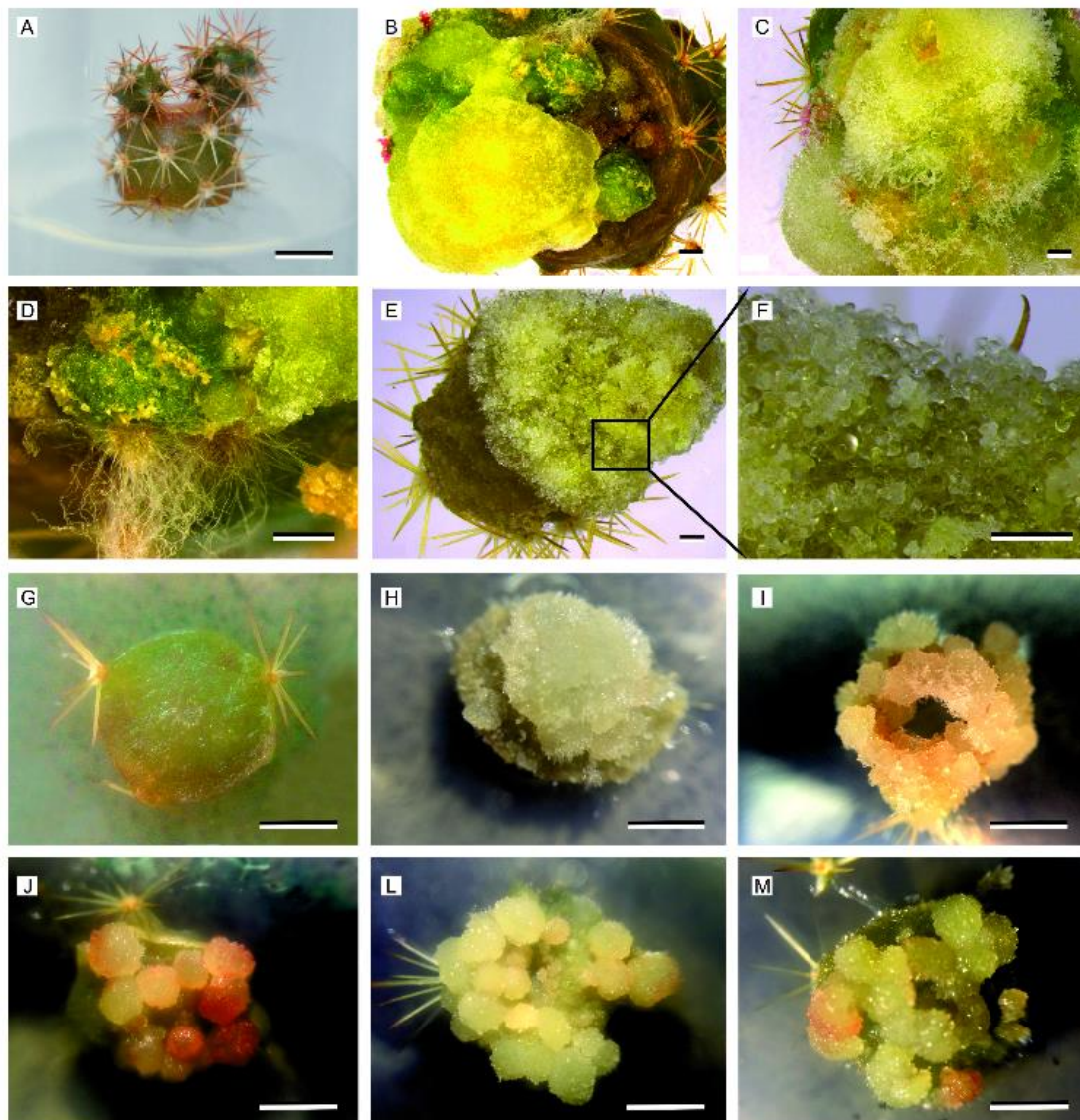


Figura 01. Morfogênese *in vitro* de *Discocactus zehntneri* subsp *boomianus* em função de diferentes tipos e concentrações de reguladores vegetais e ambientes de cultivo. Formação de brotos através dos meristemas laterais (A). Indução de calogênese no explante transversal na presença de luz em função de diferentes concentrações de 2,4D e cinetina (B, C, D, E, F). Indução de calogênese para o explante tipo TCL no escuro em meio MS isento de regulador (G) e suplementado com diferentes concentrações de picloram 50 (H), 100 (I), 200 (J, L) e 400 (M) μM . Barras: A, G, H, I, J, L, M: 5 mm; B, C, D, E, F: 1 mm.

Visando potencializar a indução de calogênese a fim de subsidiar estudos posteriores de regeneração via embriogênese somática, apenas tratamentos envolvendo diferentes tipos e concentrações de auxinas foram testadas para o explante TCL no escuro. Neste caso, houve interação significativa entre os fatores tipo e concentrações de auxina ($p < 0,05$). De modo geral, auxina picloram apresentou os melhores resultados para a indução de calo, cujos percentuais variaram de 93 a 100% (Tabela 02) independente da concentração de regulador analisada. No entanto, nas concentrações mais baixas de regulador, 50 e 100 μM , o 2,4D apresentou resultados similares (90 e 73% respectivamente) ao picloram e, na maior concentração de regulador testada não houve diferenças significativas entre o picloram e o ANA (80%) (Tabela 02).

Tabela 2: Indução de calogênese (%) em explantes tipo TCL de *Discocactus zehntneri* subsp *boomianus* em função de diferentes tipos e concentrações de auxinas.

Concentrações (μM)	Auxinas			Média geral
	ANA	2,4D	Picloram	
0	0	0	0	
50	33bB	90aA	100aA	74A
100	33bB	73aA	97aA	68A
200	50bB	50bB	93aA	64A
400	80aA	28bB	100aA	75A
Média Geral	49b	64b	97a	

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$)

Com relação às concentrações analisadas, para o ANA houve um aumento significativo da calogênese à medida que as concentrações de regulador no meio nutritivo aumentavam, cujo percentual máximo (80%) ocorreu a 400 μM (Tabela 02).

Por outro lado, o 2,4D demonstrou um efeito contrário, concentrações mais baixas desse regulador, 50 e 100 μM , foram significativamente mais eficientes na indução da calogênese apresentando cerca de 90 e 73% de calos, respectivamente. Neste caso, os resultados menos satisfatórios ocorreram a 200 e 400 μM , 50 e 28% respectivamente. O picloram não apresentou diferenças significativas entre as concentrações testadas (Tabela 02).

Nos dois experimentos realizados o meio nutritivo desprovido de regulador vegetal não apresentou formação de calo (Tabelas 01 e 02; Figura 01 G). Para o explante TCL houve apenas o entumescimento da superfície adaxial de alguns explantes. Isso demonstra que para esta espécie a presença de reguladores vegetais, especialmente auxina é imprescindível para indução da dediferenciação celular.

Os calos derivados do explante TCL iniciaram a sua formação entre primeira e segunda semana de cultivo e apresentam um padrão morfológico diferenciado. A textura dos calos variou de compacto a friável e sua coloração variou de branca opaca a avermelhada (Figura 01 H-M). Assim como os calos derivados do explante tipo transversal nos tratamentos induzidos com ANA e 2,4D os calos formados apresentaram um crescimento desordenado. Por outro lado, em todas as concentrações de picloram testadas o crescimento de calos se deu através de estruturas globulares (Figura 01 I-M), exceto em poucas amostras (Figura 01 H). Não houve diferenças significativas entre o número de estruturas globulares formadas e as concentrações de picloram analisadas e a média geral para todos os tratamentos de estruturas globulares/explante foi de 3,45 (dados não apresentados). Alguns explantes induzidos com 200 e 400 μM de 2,4D também apresentaram um crescimento similar, mas em um número inexpressivo.

A análise histológica de calos induzidos com 100 μM de picloram revelou que as estruturas esféricas são centros meristemáticos organizados, constituídos por células indiferenciadas, pequenas e de conteúdo citoplasmático denso, com núcleo e nucléolos evidentes (Figura 02). Alguns centros meristemáticos apresentaram no seu interior células de formato alongado (Figura 02 C, E).

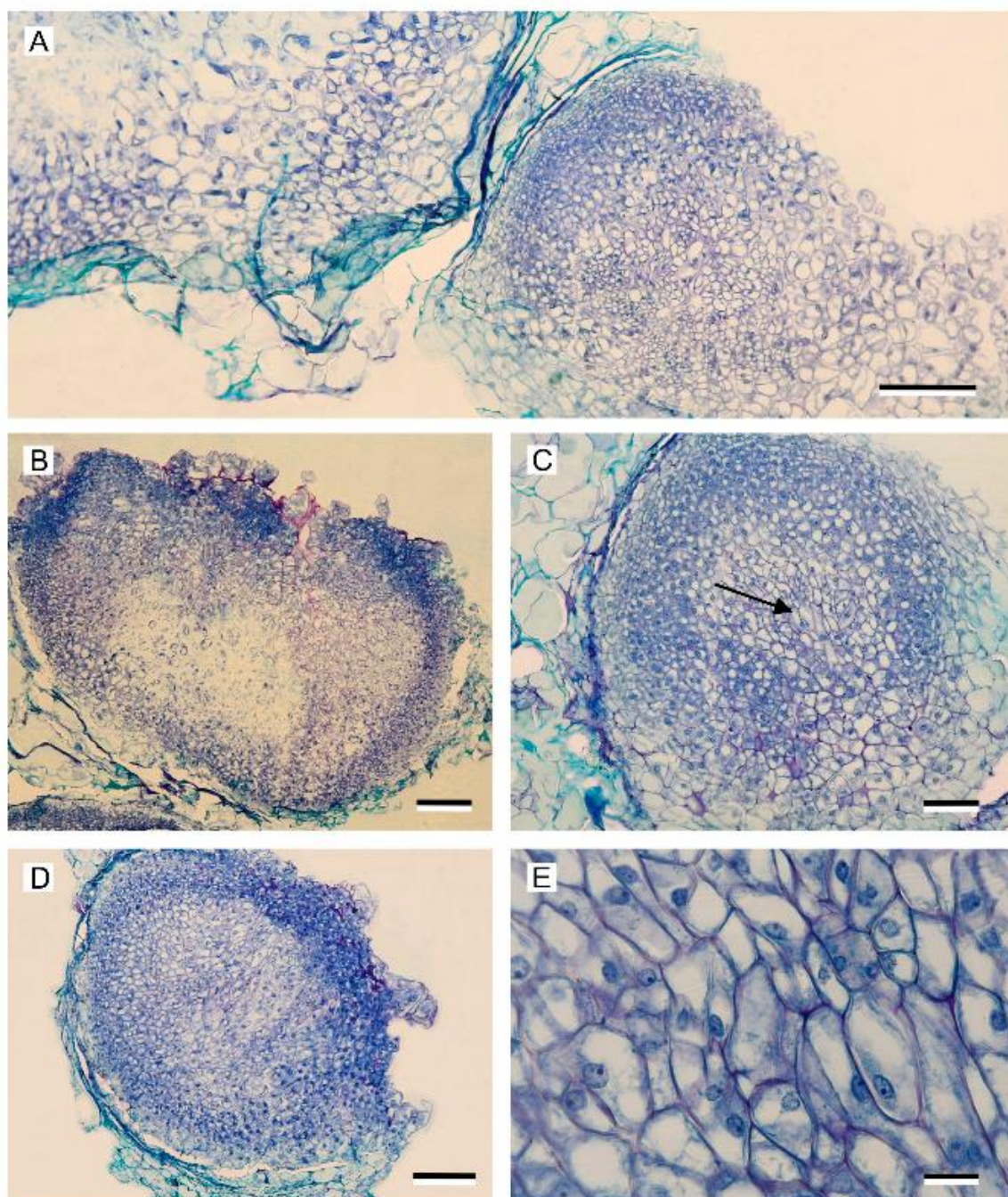


Figura 02: Análise histológica de calos derivados do explante tipo TCL cultivado no escuro em meio MS suplementado com 100 μM de picloram. Aspecto geral evidenciando a disposição de dois centros meristemáticos (A), centros meristemáticos individualizados (B, C e D) e, em detalhe, células alongadas localizadas na porção central dos centros meristemáticos (E). Barras: A, B e D: 200 μM ; C: 100 μM ; E: 20 μM .

DISCUSSÃO

O estabelecimento *in vitro* através de sementes, sobretudo de espécies ameaçadas e de distribuição restrita, é uma alternativa viável não somente pelo sucesso na desinfestação, mas também para evitar agressões à planta mãe no campo e/ou a retirada de indivíduos no habitat natural (Lema-Rumińska e Kulus, 2014). Uma vez estabelecida *in vitro*, diversos tipos de explantes podem ser utilizados para a micropropagação de cactos, como aréolas isoladas (Viñas et al. 2012; Lema-Rumińska e Kulus, 2014; Nunez et al. 2014), segmentos do cladódio (Garcia-Rubio e Maldabarrera, 2010; Khattab et al. 2014; Román et al. 2014) e da raiz (Khattab et al. 2014). A utilização de explantes derivados da porção intermediária do cladódio além de apresentar o melhor resultado para algumas espécies de cactos (Nunez et al. 2014; Román et al. 2014) possibilita a regeneração do ápice em um meio nutritivo para crescimento e, conseqüentemente, a utilização por diversas vezes da mesma planta como fonte de explante (Resende, 2010). Além disso, segundo Choreño-Tapia et al. (2002) a eliminação do ápice estimula a síntese de citocininas que ativam as aréolas e, conseqüentemente, induzem o crescimento de brotos laterais.

A formação de brotos adventícios em representantes da família Cactaceae varia tanto na via de regeneração quanto em relação os tipos e concentrações de reguladores

vegetais, condições de cultura, tipos de explante e genótipo. Neste trabalho todos os brotos foram obtidos via organogênese direta, sem a fase intermediária de calo, mediante a ativação das aréolas em meio isento de regulador (Tabela 01). Resultados similares foram obtidos para *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Moebius-Goldammer et al. 2003) e *Hylocereus costaricensis* ou pitaya (Viñas et al. 2012; Hua et al. 2014). Além da regeneração ocorrer de forma mais rápida e com um menor custo, a organogênese direta oferece menos riscos de alteração genética (George et al. 2008; Moebius-Goldammer et al. 2003). No entanto, para algumas espécies como *Selenicereus megalanthus* (Nunez et al. 2014) e *Opuntia ficus-indica* (Angulo-Bejarano e Paredes-López, 2011) a organogênese indireta também mostrou-se eficaz na produção de brotos. Segundo Lema-Rumińska e Kulus (2014) a quantidade e a proporção de reguladores vegetais aplicados, o genótipo e até mesmo o local da excisão do explante podem determinar a via de organogênese.

Auxinas e citocininas desempenham papéis fundamentais na indução (Hua et al. 2014) e desenvolvimento de brotos (Sriskandarajah et al. 2006). Para diversas espécies de cactos a adição de reguladores vegetais ao meio nutritivo potencializa a multiplicação (El Finiti et al. 2013; Hua et al. 2014; Román et al. 2014; Khattab et al. 2014) no entanto, não existe um consenso entre o balanço ideal de reguladores. Segundo Clayton et al. (1990) concentrações baixas ou mesmo a ausência de auxinas e moderada a altas concentrações de citocinina são ideais enquanto para Lema-Rumińska e Kulus (2014) raramente uma concentração de citocinina maior do que de auxina é requerida para o desenvolvimento de brotos axilares. Esta ausência de padrão demonstra que o efeito do tipo e concentrações de reguladores é genótipo específico (Alves et al. 2013; Román et al. 2014). Para *D. zehntneri* os tipos e as concentrações de reguladores vegetais utilizadas reduziram significativamente a formação de brotos, e o melhor

resultado foi obtido no meio nutritivo isento de regulador vegetal. Esses resultados divergem dos obtidos para *Cereus hildmannianus* (Langer e Mergener, 2013) e *Hilocereus costaricensis* (Viñas et al. 2012), em que meios nutritivos desprovidos de reguladores vegetais não apresentaram indução de brotos. Contudo, outras espécies de cactos também demonstraram potencial organogênico na ausência de reguladores vegetais como *Coryphantha retusa* (Ruvalcaba-Ruiz et al. 2010) *Mammillaria mathildae* (Garcia-Rubio e Malda-Barrera, 2009; Garcia-Rubio e Malda-Barrera, 2010), *M. densispina*, *M. hahniana*, *M. hutchisoniana*, *M. orcutii*, *M. perbella*, *M. picta*, *M. rhodantha*, *M. zephyranthoides*, *M. bocasana*, *M. pectinifera* (Ramirez-Malagon et al. 2007), *M. san-angelensis* (Rublo et al. 2002), *M. elongata* (Papafotiou et al. 2001), *Pilosocereus robinii* (Quiala et al. 2009), *Opuntia lanigera* (Estrada-Luna et al.2008), *Pelecypora aselliformis*, *P. strobiliformis* (Pérez-Molphe-Balch & Dávila-Figueroa, 2002) e *Turbinicarpus laui* (Rosas et al. 2001). Isto sugere que níveis endógenos de hormônios presente nos tecidos podem ter sido responsáveis pela formação dos brotos (Moebius-Goldammer et al.2003; Sriskandarajah et al. 2006; Garcia-Rubio e Malda-Barrera, 2010; Lema-Rumińska e Kulus, 2014). Segundo Hubstenberger et al. (1992) os cactos tem a capacidade de sintetizar excesso de auxina *in vitro*, o que poderia justificar tanto a brotação em meio nutritivo desprovido de regulador quanto essa amplitude de respostas dentro da família. No entanto, o baixo número de brotos obtidos para esta espécie torna necessário o desenvolvimento de protocolos que potencializem a sua multiplicação *in vitro*, como a regeneração através da embriogênese somática e, para algumas espécies, a indução de calos é um pré-requisito para essa via de regeneração (Gueye et al. 2009).

Neste estudo, os explantes, reguladores e ambientes de cultivo utilizados induziram a calogênese (Tabela 01 e 02). Sob estímulos químicos específicos o

metabolismo de células especializadas no explante é alterado e é dado início a um processo de divisão celular ativa que dá origem a um novo tecido composto por células meristemáticas e sem especialização (George et al. 2008). Durante a desdiferenciação, produtos de armazenamento tipicamente encontrado em células em repouso tendem a desaparecer e, células meristemáticas dão origem a células indiferenciadas, parenquimatosas, e sem qualquer ordem estrutural característica do órgão ou tecido que lhe deu origem (George et al. 2008). Embora as culturas de calos aparentemente pareçam uma massa de células uniforme, na realidade sua estrutura é relativamente complexa com variações morfológicas, fisiológicas e genéticas no seu interior (Hartmann et al. 2011).

Segundo George et al. (2008) os calos variam em seu grau de competência morfogenética e, em alguns casos, linhagens de calo com diferentes aparências como cor e textura e diferentes capacidades morfogenéticas podem ser isoladas de um mesmo explante e podem refletir o potencial epigenético das células ou ser causado pelo aparecimento de variabilidade genética entre as células da cultura. Desta forma, sua caracterização morfológica, bioquímica e ultra-estrutural pode evidenciar mudanças relacionadas ao processo morfogenético *in vitro* de tecidos vegetais e podem auxiliar ainda na identificação dos fatores que desencadeiam mudanças fisiológicas nos explantes, como a aquisição da friabilidade ou o desenvolvimento de embriões somáticos (Vasconcelos et al. 2012). No entanto, estudos de regeneração através do estabelecimento de culturas de calo *in vitro* são escassos para espécies de cactos (Angulo-Bejarano e Paredes-López, 2011) apesar de constituir um valioso material biológico tanto como ferramenta para transformação genética e produção de novas variedades ornamentais (Teodora e Olimpia, 2011; Angulo-Bejarano e Paredes-López, 2011) quanto para multiplicação de mudas.

A indução de calos *in vitro* é governada por um complexo mecanismo regulatório (Ikeuchi et al. 2013) e controlado por diversos fatores como genótipo, composição de meio de cultura, status fisiológico do doador do explante, posição do explante na planta, tamanho do explante (Karimi et al. 2010) e sazonalidade (Karimi et al 2012; Lema-Ruminska e Kalus, 2014). De todos os fatores que regulam a indução da calogênese *in vitro*, os reguladores vegetais adicionados ao meio nutritivo têm sido o mais freqüente em trabalhos de indução de calogênese *in vitro* para representantes da família Cactaceae. Nos últimos 14 anos a análise de pelo menos 17 trabalhos publicados com relação à indução de calogênese *in vitro* para cactos revelou que 100% analisaram o efeito de reguladores vegetais.

Além dos reguladores exógenos, o balanço hormonal obtido entre os níveis de citocininas e auxinas endógenas, podem estimular a proliferação celular (Nogueira et al. 2007) e ser fundamental para que células somáticas diferenciadas e especializadas se desdiferenciem. Em *D. zehntneri* os reguladores foram imprescindíveis para a calogênese (Tabela 01 e 02), assim como para outras espécies de cactos (Angulo-Benjarano e Paredes-López, 2011; García-Rubio e Malda-Barrera, 2010). No entanto, a interação entre auxinas e citocininas não potencializou a indução de calos para o explante transversal cultivado na luz. A adição de citocinina exógena, juntamente com a citocinina endógena do explante pode causar uma elevada concentração deste regulador em relação à auxina e diminuir a formação de calo (Nogueira et al. 2007). Esses resultados corroboram os obtidos para *Schlumbergera truncata* (Ali et al. 2001) e discordam dos obtidos para outras espécies como *Opuntia robusta* (Astello-Garcia et al. 2013), *Cereus hildmannianus* e *C. jamacaru* (Karimi et al. 2010), *Schlumbergera truncata* (Al-Ramamneh et al. 2006), *Selenicereus megalanthus* (Nunez et al. 2014) e

Cephalocereus senilis (Choreño-Tapia et al. 2002) nas quais a associação entre estes dois reguladores vegetais estimulou a proliferação de calos.

A regeneração de raízes a partir de calos foi relatada para duas espécies de cactos *Stenocereus gummosus* e *Ferocactus peninsulæ*, e, de modo similar a este trabalho, segundo os autores, não houve padrão entre as concentrações de auxinas e citocininas testadas e a indução da rizogênese (Shishkova et al. 2007).

Neste trabalho, apenas as auxinas foram eficientes na indução da calogênese, independente do explante, tipo e concentração de regulador vegetal e condições de cultivo. As auxinas parecem ser capazes de alterar o programa genético que controla o estado diferenciado dos tecidos, e, sob sua ação, as células podem se desdiferenciar e começar a se dividir (George et al. 2008). Esta reprogramação pode está relacionada ao aumento do nível de metilação de DNA, causado por algumas auxinas naturais e sintéticas, como 2,4D, ANA e AIA (Lo Schiavo et al. 1989). O tipo e a concentração de auxina foi determinante para a desenvolvimento dos calos em *Opuntia robusta* (Astello-Garcia et al. 2013), segundo os autores o AIA, IBA e 2,4D apresentaram resultados mais satisfatórios que o ANA na indução de calos. Das auxinas testadas o picloram apresentou os melhores resultados (Tabela 2), uma vez que não diferiu significativamente em todas as concentrações testadas (93-100%) e, sobretudo apresentaram calos com potencial morfogênético. No entanto, esta auxina tem sido utilizada em poucos estudos para indução de calogênese *in vitro* de outras espécies de cactos (Astello-Garcia et al. 2013). Além dos reguladores vegetais outros aditivos têm sido frequentemente adicionados ao meio nutritivo para potencializar a indução de calos, como a água de coco (Karimi et al 2010), biotina, caseína hidrolisada, glutamina e prolina (Astello-Garcia et al. 2013).

As condições de cultivo para indução de calo em cactos variam desde estudos com fotoperíodo estabelecido (Ali et al. 2001; Angulo-Bejarano e Paredes-López, 2011) a ausência total de luz (Karimi et al. 2010; Karimi et al. 2012; Astello-Garcia et al. 2013). Para *D. zehntneri* as duas condições de luminosidade promoveram a calogênese (Tabela 01 e 02). Similarmente, para *Selenicereus megalanthus* os calos foram produzidos tanto na luz quanto no escuro, no entanto em ambas as condições de cultivo tiveram aparências similares e apresentaram porções regenerantes, determinada pelo regulador vegetal utilizado (Nunez et al. 2014). Por outro lado, para *Stenocereus gummosus* e *Ferocactus peninsulae*, as condições de fotoperíodo foram mais favoráveis a indução de calo que o escuro (Shishkova et al. 2007). Segundo Nogueira et al. (2007) a presença de luz pode favorecer a produção de compostos fenólicos que interferem na atividade dos reguladores vegetais e, além disso, a auxina natural (AIA) presente no tecido vegetal também pode sofrer fotodegradação, diminuindo as quantidades de auxinas totais que desencadeariam o processo de formação de calo.

Embora o calo seja caracterizado pela multiplicação de células indiferenciadas de forma desordenada, alguns tipos de células especializadas podem voltar a ocorrer de forma aleatória e podem estar associadas a centros de morfogênese, que podem dar origem a órgãos, como raízes e brotos, ou embriões (George et al. 2008). Centros meristemáticos, composto por células pequenas e com conteúdo citoplasmático denso, levaram à formação de embriões somáticos na fase globular para *Schlumbergera truncata*, cacto nativo do Brasil (Al-Ramamneh et al. 2006). No entanto, segundo os autores, o aspecto das estruturas globulares foi associado ao desenvolvimento da protoderme, que é camada mais externa de um embrião em desenvolvimento e, segundo George et al. (2008), é o primeiro tecido a diferenciar, através de divisões periclinais de células do embrião globular nos estádios iniciais. Células alongadas no interior dos

centros meristemáticos como as obtidas neste trabalho (Figura 02 C e E) podem indicar o início da desorganização celular (Nepomuceno, 2012) ou a diferenciação de células do sistema vascular. Provavelmente a manutenção dos calos na condição de indução isto é, no escuro e em meio nutritivo com elevadas concentrações de reguladores, pode ter impossibilitado o desenvolvimento de estruturas organizadas, seja brotos ou embriões. Desta forma, sugere-se a transferência dos calos para condições que possibilitem o desenvolvimento da morfogênese, ou seja, para condições de luz e em meio nutritivo apropriado. Segundo Werner et al. (2009) estruturas filamentosas na superfície de calos similares as encontradas neste trabalho (Figura 01 D), são elementos diferenciados, como fibras e traqueídeos, e indica que tais porções dos calos não conseguiram se desdiferenciar, não sendo por isso embriogênicas.

CONCLUSÃO

A expressão da morfogênese *in vitro* de *Discocactus zehntneri* subsp *boomianus* foi dependente dos tipos e concentrações de reguladores vegetais, tipo de explante e ambientes de cultivo. Para a indução da organogênese direta de brotos, sugere-se a utilização de explantes transversais em meio MS isento de regulador vegetal. Com relação à indução de calo com potencial morfogenético, evidenciado pela presença de centros meristemáticos, os resultados mais satisfatórios ocorreram para o explante tipo TCL no escuro em meio MS suplementado com picloram. Neste caso, a utilização de meios nutritivos suplementados com a menor concentração de regulador são mais indicados. Novos estudos devem ser conduzidos a fim de estimular a regeneração *in vitro* dos calos obtidos, seja através da organogênese ou embriogênese somática, a fim de potencializar a multiplicação *in vitro* da espécie.

REFERÊNCIAS

- Ali, A., Naz, S., Siddiqui, F. A., Iqbal, J. Callogenesis, embryogenesis and organogenesis in Christmas cactus (*Schlumbergera bridesi*). Pakistan Journal of Botany. v. 33, p.569-574, 2001.
- Alves, F. A. L., Soares, W. S.; Fernandes, Y. T. D., Rêgo, M. M. Efeito de benziladenina na regeneração de duas variedades de palma forrageira (*Opuntia* spp.). Scientia Plena. v.9, n.6, p.1-8, 2013.
- Andrade, T., S., A. Cactos úteis na Bahia: ênfase no semi-árido. Pelotas: Ed. UESB. 2008. 128p
- Astello-García, M. G., Robles-Martínez, M., Rosa, A. P. B. Santos-Díaz, M. S. Establishment of callus from *Opuntia robusta* Wendl., a wild and medicinal cactus, for phenolic compounds production. African Journal of Biotechnology. v.12, n.21, p.3204-3207, 2013.
- Al-Ramamneh, E. A., Sriskandarajah, S., Serek, M., Plant regeneration via somatic embryogenesis in *Schlumbergera truncate*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. v.84, n.3, p.333–342, 2006.
- Angulo-Bejarano, P. I., e Paredes-López, O. Development of a regeneration protocol through indirect organogenesis in prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill). Scientia Horticulturae. v.128, n.3, p. 283–288, 2011.
- Bárbara, E. P. S., Silva, S. A., Souza, M. M. O. R., Gurgel, Z. E. R., Marchi, M. N. G., Bellintani, M. C. Germinação e criopreservação de sementes de cactos nativos da Bahia. Gaia Scientia. v.9, n.2, p. 91-96, 2015.
- Cavalcante, A., Teles, M., Machado, M. Cactos do semiárido do Brasil: guia ilustrado. Campina Grande: Instituto Nacional do Semiárido, INSA. 2013.103p.
- Civatti, L. M., Marchi, M. N. G., Bellintani, M. C. Conservação de sementes de cactos com potencial ornamental armazenadas sob diferentes condições de umidade e temperatura. Gaia Scientia. v.9, n.2, p.17-26, 2015.
- Choreño-Tapia, J. M. González-Rosas, H., Terrazas-Salgado, T. Hernández-Livera, A. Propagación *in vitro* de *Cephalocereus senilis* haworth pfeiffer a partir de aréolas. Revista Chapingo Serie Horticultura. v.8, n.2, p.183-196, 2002.
- Clayton, P. W., Hubstenberger, J. F., Phillips, G. C. Micropropagation of Members of the Cactaceae Subtribe Cactinae. Journal of the American Society for Horticultural Science. v.115, n.2, p.337-343, 1990.

Estrada-Luna, A. A., Martínez-Hernández, J. J., Torres-Torres, M. E., Chablé-Moreno, F. *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*. v.117, n.4, p.378–385, 2008.

El Finti, A., El Boullani, R., Aabd, A. N., Msanda, F., Serghini, M. A. El Mousadik, A. *In Vitro* Propagation of Three Moroccan Prickly Pear Cactus *Opuntia* and Plant Establishment in Soil. *Notulae Scientia Biologicae*. v.5, n.1, p.39-44, 2013.

Fereira, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*. v.35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

Johansen, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. New York: Mc Graw Hill Book. 523 p.

García-Rubio, O. e Malda-Barrera, G. Micropropagation and Reintroduction of the Endemic *Mammillaria mathildae* (Cactaceae) to its Natural Habitat. *Hortscience*. v.45, n.6, p.934–938. 2010.

Garcia-Rubio, O. e Malda-Barrera, G. Conservation *in situ* and *ex situ* of *Mammillaria mathildae*, endemic, endangered cacti of Querétaro City. *Ciencia@uaq*. v.2, n.1, p.3-16, 2009.

George, E. F., Hall, M. A., Klerk, G. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3rd Edition Volume 1. The Background. Dordrecht: Springer. 2008, 504p.

Gueye, B., Saïd-Ahmed, H., Morcillo, F., Borgel, A., Sané, D., Hilbert, J.-L., Verdeil, J.-L., Blervacq, A.-S., Callogenesis and rhizogenesis in date palm leaf segments: are there similarities between the two auxin-induced pathways? *Plant Cell Tiss Organ Culture*. v.98, n.1, p.47–58, 2009.

Hartmann, H. T. *Plant Propagation: principles and practices*. 8 ed. United States: Pearson. 2011, 915p.

Hua, Q., Chen, P., Liu, W., Ma, Y., Liang, R., Wang, L., Wang, Z., Hu, G., Qin, Y., A protocol for rapid *in vitro* propagation of genetically diverse pitaya. *Plant Cell Tiss Organ Culture*. v.120, n.2, p.741-745, 2015.

Hubstenberger, J. F., Clayton, P. W., Phillips, G. C. *Micropropagation of Cacti*. 1992. In: Bayay, Y. P. S. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, v. 20. Berlin: Springer,. Cap. 4, p.49- 68.

Karimi, N., Kianamiri, S., Mousavi, E., Barkhordar, M. Study of genotype effect, different media and time of explanting on callus induction in *Cereus peruvianus* Mill.(Cactaceae). *Trakia Journal of Sciences*. *Trakia Journal of Sciences*. v.10, n.3, 19-22, 2012.

Karimi, N. Mofid, M. R., Ebrahimi, M., Naderi, R. Effect of areole and culture medium on callus induction and regeneration *Cereus peruvianus* mill. (Cactaceae). *Trakia Journal of Sciences*. *Trakia Journal of Sciences*. v.8, n.2, p 31-35, 2010.

Khattab, S., El Sherif, F., El-Garhy, H. A., Ahmedc, S., Ibrahimc, A. Genetic and phytochemical analysis of the in vitro regenerated *Pilosocereus robinii* by ISSR, SDS–PAGE and HPLC. *Gene*. *Gene*. v.533, n.1, p.313–321, 2014.

Kraus, J. E. e Arduin, M. Manual Básico de Métodos em Morfologia Vegetal, Rio de Janeiro: EDUR. 1997, 198p.

Langer, D. F., Mergener, R.A. Cultivo *in vitro* de *Cereus hildmannianus* K. Shum. *Unoesc & Ciência – ACBS*. v.4, n.1, p.7-14, 2013.

Lema-Rumińska, J. e Kulus, D. Micropropagation of Cacti - a Review. *Haseltonia*. n.19, 46–63, 2014.

Lo Schiavo , F., Pitto, L., Giuliano , G., Torti, G., Nuti-Ronchi, V., Marazziti, D., Vergara, R., Orselli, S., Terzi, M. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theoretical and Applied Genetics*. v.77, n.7, p.325-331, 1989.

Machado, M. C., Zappi, D. C., Taylor, N. P., Borba, E. L. Taxonomy and conservation of the *Discocactus* Pfeiff. (Cactaceae) species occurring in the state of Bahia, Brazil. *Bradleya*. v.23, p.41-56, 2005.

Marchi, M.N.G., Civatti, L.M., Viana, C.M., Assis, J.G.A., Bellintani, M.C., Santana, J.R.F. Seed cryopreservation of the native cacti *Discocactus zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* and *Stephanocereus luetzelburgii* from Bahia, Brazil. *African Journal of Biotechnology*. v.12, n.21, p.3250-3254, 2013.

Medeiros, L. A., Ribeiro, R. C. S., Gallo, L. A., Oliveira, E. T., Dematte, M. E. S. P. *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. v.84, n.2, p.165–169, 2006.

Moebius-Goldammer, K. G., Mata-Rosas, M., Chávez-Avila, V. M. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (lem.) K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered mexican species. v.39, n.4, p.388–393, 2003.

Murashige, T. e Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, v.15, n.3, 473–497, 1962.

Nepomuceno, C. F. Propagação e conservação *in vitro* de *Martianthus leucocephalus* (MART. Ex BENT.) J.F.B. Pastore. 2012.164 f. Tese. (Doutorado em Botânica) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2012.

Nogueira, R. C., Paiva, R., Oliveira, L. M., Soares, G. A., Soares, F. P., Castro, A. H. F., Paiva, P. D. O. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). *Ciência e Agrotecnologia*. v.31, n.2, p.366-370, 2007.

Nunez, D. G. C., Escobar, R., Caetano, C. M., Vaca, J. C. V. Estandarización de un protocolo de regeneración en pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran). *Acta Agronómica*. v.63, n.1, p.31-41, 2014.

O'Brien, T. P., Feder, N., McCully, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *O Protoplasma*. v.59, n.2, p.368-373, 1965.

Ramirez-Malagon, R., Aguilar-Ramirez, I., Borodanenko, A., Perez-Moreno, L., Barrera-Guerra, J. L., Nuñez-Palenius, H. G., Ochoa-Alejo, N. *In vitro* propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. v.43, n.6, p.660-665, 2007.

Resende, S. V., Lima-Brito, A., Santana, J. R. F. Influência do substrato e do enraizamento na aclimatização de *Melocactus glaucescens* Buining & Brederoo propagados *in vitro*. *Rev. Ceres*. 57, 803-809. *Revista Ceres*. v.57, n.6, p.803-809, 2010.

Resende, S. V. Micropropagação e conservação *in vitro* de *Melocactus glaucescens* Buining & Brederoo e *Melocactus paucispinus* G. Heimen & R. Paul (Cactaceae), espécies endêmicas da Bahia e ameaçadas de extinção. 2010. 140 f. Tese de doutorado (Doutorado em Botânica). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana 2010.

Román, R. S. S., Caetano, C. M., Ramírez, H. Osorio, J. G. M. Multiplicación de *Selenicereus megalanthus* (pitahaya amarilla) e *Hylocereus polyrhizus* (pitahaya roja) vía organogénesis somática. *Acta Agronómica*. v.63, n.2, p.272-281, 2014.

Rosas, M. M., De La Rosa, M. A. M., Goldammer, K. M., Avila, V. M. C. Micropropagation of *Turbincarpus laui* glass et foster, an endemic and endangered species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. v.37, n.3, p.400-4004, 2001.

Rubluo, A., Marín-Hernández, T., Karina Duval, K., Vargas, A., Márquez-Guzmán, J. Auxin induced morphogenetic responses in long-term in vitro subcultured *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada (Cactaceae). *Scientia Horticulturae*. v.95, n.4, p.341–349, 2002.

Ruvalcaba-Ruiz, D., Rojas-Bravo, D., Valencia-Botín, A. J. Propagación *in vitro* de *Coryphantha retusa* (Britton & Rose) un cactus endémico y amenazado. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. v.12, n.1, 139-143, 2010.

Silva, J. A. S. Thin Cell Layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. *African Journal of Biotechnology*. v.2, n.12, 683-691, 2003.

Shishkova, S., García-Mendoza, E., Castillo-Díaz, V., Moreno, N. E., Arellano, J., Dubrovsky, J. G. Regeneration of roots from callus reveals stability of the developmental program for determinate root growth in Sonoran Desert Cactaceae. *Plant Cell Reports*. v.26, n.5, p.547–557, 2007.

Sriskandarajah, S., Prinsen, E., Motyka, V. Dobrev, P. I., Serek, M. *Schlumbergera* and *Rhipsalidopsis* in Relation to Endogenous Phytohormones, Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase, and Peroxidase Activities. *Journal of Plant Growth Regulation*. v.25, n.1, p.79–88, 2006.

Teodora, V. I., Olimpia, U. Study on the regenerative capacity and organogenesis of *Aylostera* (speg.) *heliosa* explants, in the presence of 2,4 - dichlorophenoxyacetic acid (2,4-d) in culture medium. *Analele Universității din Oradea, Fascicula Protecția Mediului*. v.17, p. 305-212, 2011.

Teodora, V. I. Investigation on the of 2,4 –dichlorophenoxyacetic acid (2,4-d) on the process of callus from in vitro cultures *Echinocactus* (piff.) *mihanovichii*. *Analele Universității din Oradea, Fascicula Protecția Mediului*. v.19, p.305-311, 2012.

Werner, E. T., Cuzzuol, G. R. F., Pessotti, K. V., Lopes, F. P., Roger, J. A. Controle da calogênese do pau-brasil *in vitro*. *Revista Árvore*. v.33, n.6, p.987-996, 2009.

Vasconcelos, J. N. C ., Cardoso, N. S. N., Oliveira, L. M., Santana, J. R. F., Fernandez, L. G., Bello Koblitz, M. G., Silva, M. L. C. Indução, caracterização bioquímica e ultra-estrutural de calos de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. v.14, n.4, p.592-597, 2012.

Viñas, C. M., Fernández-Brenes, M., Azofeifa, A., Jiménez, V. M. *In vitro* propagation of purple pitahaya (*Hylocereus costaricensis* [F.A.C. Weber] Britton & Rose) cv. Cebra. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. v.48, n.5, p.469–477, 2012.

CAPÍTULO 02

ESTRATÉGIAS PARA CONSERVAÇÃO *ex situ* A MÉDIO E LONGO PRAZO DE

Discocactus zehntneri subsp *boomianus*

RESUMO

O gênero *Discocactus* é predominantemente brasileiro e apresenta todas as suas espécies ameaçadas de extinção. Visto que apenas duas populações do gênero encontram-se incluídas em áreas de proteção, estratégias de conservação *ex situ* são fundamentais para salvaguardar os recursos genéticos destas espécies. O objetivo deste trabalho foi estabelecer metodologias para conservação *ex situ*, a médio e longo prazo, para *Discocactus zehntneri* subsp. *boomianus*, espécie endêmica do estado da Bahia. Para tanto, foram realizados quatro ensaios visando estabelecer protocolos para a criopreservação de brotos e sementes, conservação de sementes em temperaturas ultrabaixas e crescimento mínimo de plantas derivadas da germinação *in vitro*. Brotos derivados da organogênese direta (3-7mm) foram submetidos a diferentes soluções de carregamento e, posteriormente à solução de vitrificação (PVS2) (Sakai et al. 1990), antes da imersão direta em nitrogênio líquido (-196 °C), onde permaneceram durante sete dias. As sementes foram transferidas para criotubos e armazenadas em nitrogênio líquido ou ultrafreezer (-80°C) por diferentes períodos de tempo. Foram realizadas análises de viabilidade utilizando a solução de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio para as sementes que não germinaram. Para o ensaio de crescimento mínimo, plantas derivadas da germinação *in vitro* foram inoculadas em meio nutritivo suplementado com diferentes concentrações de sacarose (30, 60, 90 e 120 g L⁻¹) apenas ou 30 g L⁻¹ de sacarose associada a diferentes concentrações de manitol (15, 30, 45 e 60 g L⁻¹). O protocolo utilizado para conservação de brotos não foi eficiente para manutenção da viabilidade das plantas após o congelamento. Por outro lado, os ensaios para conservação de sementes mostraram que não houve redução da qualidade fisiológica ao longo do tempo, tanto para as armazenadas em nitrogênio líquido quanto para as conservadas em ultrafreezer. Com relação ao crescimento mínimo, os agentes osmóticos

analisados mantiveram a sobrevivência das plantas durante 365 dias sem subculturas e, de modo geral, o aumento na concentração de carboidratos no meio inibiu o desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular das plantas cultivadas *in vitro*. Desta forma, tanto a conservação de sementes quanto o crescimento mínimo podem ser aplicadas para a espécie, desde que avaliações sobre a qualidade fisiológica por períodos de tempo superiores aos analisados neste trabalho sejam conduzidas.

PALAVRAS-CHAVE: armazenamento de sementes; cactos; conservação; crescimento mínimo; ultrafreezer.

ABSTRACT

The *Discocactus* genus is predominantly Brazilian and presents all its endangered species. Since only two of the genus populations are included in protected areas, conservation *ex situ* strategies are essential to safeguard the genetic resources of these species. The aim of this study was to establish methodologies for *ex situ* conservation in the medium and long term for *Discocactus zehntneri* subsp *boomianus*, endemic to the state of Bahia. Therefore, were conducted four trials involving cryopreservation shoots and seeds, seed conservation at ultralow temperatures and minimal growth of plants derived from *in vitro* germination. Shoots derived from direct organogenesis (3-7mm) were subjected to different loading solutions and after the vitrification solution (PVS2) (Sakai et al. 1990) prior to direct immersion in liquid nitrogen (-196 °C). The shoots were stored for seven days. The seeds were transferred to cryovials and stored in liquid nitrogen or Ultrafreezer (-80 ° C) for different periods of time. Viability analysis were performed using the solution of 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride to the seeds that did not germinate. For the minimum growth assay, plants derived from *in vitro* germination were inoculated into nutrient medium supplemented with different concentrations of sucrose (30, 60, 90 and 120 g L⁻¹) alone or 30 g L⁻¹ sucrose associated with different concentrations mannitol (15, 30, 45 and 60 g L⁻¹). The protocol used for conservation shoots was not efficient for plant viability maintenance after freezing. Moreover, assays for seed storage showed no reduction in seed quality over time for both seed stored in liquid nitrogen and stored in ultrafreezer. With respect to the minimum growth, analyzed osmotic agents kept plant survival for 365 days without subcultures, and generally increasing the concentration of the medium carbohydrate inhibited the development of shoot and root systems of plants grown *in vitro*. Thus, both the conservation of seeds and the minimum growth can be applied to the species, since

reviews of the physiological quality for periods of time greater than those analyzed in this work are conducted.

KEYWORDS: cacti; conservation; minimal growth; seed storage; ultrafreezer.

INTRODUÇÃO

A família Cactaceae apresenta cerca de 100 gêneros e 1400 espécies (Judd et al. 2009) distribuídas por uma ampla diversidade de climas e ecossistemas. O leste do Brasil é o terceiro centro de diversidade da família (Taylor e Zappi, 2004; Silva et al. 2011a), sendo o Estado da Bahia um dos centros de dispersão das cactáceas (Barroso et al. 2002). Recentemente, uma avaliação global dessas espécies, no âmbito da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), revelou que os cactos estão entre os grupos taxonômicos mais ameaçados, com cerca de 31% das espécies sob algum tipo de ameaça (Goettsch et al. 2015). Além das Orchidaceae e Bromeliaceae, Cactaceae é uma das famílias com maior número de espécies ameaçadas dentre a flora brasileira (Pilatti et al. 2011), sendo o leste do Brasil um dos *hotspots* de espécies ameaçadas (Goettsch et al. 2015).

Fatores como o grau de singularidade que as cactáceas brasileiras possuem, em termos de gêneros e espécies endêmicas, com relação às Américas como um todo (Silva et al. 2011a) bem como o grau de vulnerabilidade o qual essas espécies estão submetidas (Goettsch et al. 2015), suscitam a necessidade de estudos de conservação a fim de salvaguardar os recursos genéticos dessas espécies.

O gênero *Discocactus* é quase totalmente restrito ao Brasil, com apenas três táxons que ocorrem em áreas de fronteira com Bolívia e Paraguai (Machado et al. 2005) e todas as espécies do gênero estão ameaçadas de extinção segundo o apêndice I do CITES (Luthy e Luthy, 2001). Diversos fatores contribuem para a vulnerabilidade do gênero como o comércio e coleta ilegal (Machado et al. 2005; Silva et al. 2011a) e a mineração, uma vez que o tipo de substrato ao qual estão associados é a calcário, utilizado para a fabricação de cimento (Silva et al. 2011a). Segundo Machado et al.

(2005) apenas duas populações do gênero encontram-se incluídas em áreas de proteção, *D. zehntneri* que ocorre dentro do Parque Estadual de Morro de Chapéu (BA) e *D. catingicola* que ocorre dentro da Área de Proteção Ambiental (APA) de Acaba Vidas (BA).

Embora os biomas brasileiros estejam susceptíveis a diversos tipos de pressão antrópica, a conservação *in situ* de espécies nativas é a abordagem predominante para a proteção da biodiversidade e conservação de germoplasma (Pilatti et al. 2011). A conservação *in situ* dos recursos genéticos vegetais requer áreas extensas, mão de obra intensiva, recursos contínuos e é necessária a utilização de pessoal treinado. Além disso, os acessos estão constantemente sob risco de serem perdidos por causa de adversidades ambientais, ataques de pragas, dificuldades de multiplicação e limitações orçamentárias, especialmente em países em desenvolvimento, onde estão sujeitos a mudanças das políticas do governo e desenvolvimento urbano (Engelmann, 1991; Silva et al. 2011b). Desta forma, o estabelecimento de medidas para conservação *ex situ* dos recursos genéticos são imprescindíveis, sobretudo para espécies endêmicas e ameaçadas de extinção, como *D. zehntneri* subsp *boomianus*.

As técnicas de cultura de tecidos vegetais são eficientes para a conservação *ex situ* da diversidade genética (Silva et al. 2011b; Flores et al. 2013) e podem ser utilizadas como uma ferramenta crucial para a conservação e gestão sustentável de espécies de cactáceas ameaçadas (Perez-Molphe-Balch, et al. 2012). Os métodos empregados são diferentes dependendo do tempo de armazenamento requisitado (Engelmann, 1991; 2010). Para o armazenamento a longo prazo utiliza-se a criopreservação e quando o objetivo é armazenar os materiais biológicos a curto e médio prazo, são utilizadas as técnicas de crescimento mínimo (Engelmann, 1991; 2010).

A capacidade de tecidos vegetais sobreviverem à criopreservação depende da sua tolerância à desidratação e à temperatura (Santos, 2000). Diversos tipos de explantes podem ser criopreservados, como suspensões celulares, embriões, protoplastos, gemas, calos e pólen (Carvalho e Vidal, 2003; Sarasan, 2006; Silva et al. 2011b; Srinivasan, 2012). O principal desafio desta técnica é evitar a formação de cristais de gelo intracelular durante o congelamento das culturas, pois estes podem causar a ruptura do sistema de endomembranas e resultar na perda da semi permeabilidade e da compartimentalização celular (Santos, 2000; Kaviani et al. 2009; Goldfarb et al. 2010). Desta forma, apesar da criopreservação ser aplicada a diversos tipos de explantes, materiais biológicos com baixos teores de umidade geralmente são mais favoráveis ao congelamento (Goldfarb et al. 2010).

Um número significativo de trabalhos tem se dedicado a estudar a influência da criopreservação sobre a viabilidade das sementes (Chetverikova, 2011). Para fins de preservação e, conseqüentemente, reintrodução de plantas a utilização de semente além de maximizar a variação genética natural minimiza possíveis variações decorrentes da cultura *in vitro* (Perullo et al. 2015). A criopreservação de sementes já foi realizada com sucesso para a conservação de espécies ameaçadas (Perullo et al. 2015) e nos últimos anos já foram realizados alguns trabalhos cujas espécies alvo foram cactos ornamentais nativos e/ou ameaçados (Veiga-Barbosa et al. 2010; Marchi et al. 2013; Barbara et al. 2015; Civatti et al. 2015a,b). Uma das dificuldades principais para a conservação das sementes em bancos de germoplasma é o pouco conhecimento sobre a biologia das sementes das cactáceas nativas, uma vez que quase todas as publicações sobre germinação de sementes de cactáceas se referem a espécies de outros centros de diversidade (Silva et al. 2011a).

Apesar das vantagens associadas à criopreservação de sementes, a utilização de outros materiais biológicos torna possível a conservação de plantas que produzem sementes inviáveis ou com baixa germinabilidade, como *Discocactus zehntneri* (Marchi et al. 2013; Veiga-Barbosa et al. 2010) ou espécies que demoram muitos anos para passar do estágio juvenil para o reprodutivo (Santos, 2000). A vitrificação pode ser uma técnica eficiente para o armazenamento de órgãos complexos, como brotos e embriões, que contêm uma variedade de tipos de células (Engelmann, 2010) e, neste caso, para prevenir a formação de cristais de gelo causado pelo congelamento do sistema de endomembranas, técnicas de crioproteção podem ser utilizadas (Ferrari et al. 2016). Este é o primeiro estudo que tem por objetivo realizar a criopreservação de brotos de *D. zehntneri* por meio da técnica de vitrificação. E, até o momento não há registros de trabalhos similares para nenhum representante da família Cactaceae.

Apesar da criopreservação ser uma técnica reconhecida para armazenamento dos recursos genéticos a longo prazo poucos estudos se destinam a fazer uma avaliação da viabilidade do material por longos períodos bem como uma avaliação ao longo do armazenamento a fim de analisar o tempo limite que o material pode permanecer armazenado. Segundo Pilatti et al. (2011) a maioria das pesquisas realizadas para a criopreservação de sementes no Brasil relaciona-se a exposição de curta duração, de três a sete dias em nitrogênio líquido. A análise da longevidade de sementes criopreservadas de *D. zehntneri* subsp *boomianus* por até 120 dias sugere que a perda de viabilidade não é um problema (Veiga-Barbosa et al. 2010; Marchi et al. 2013) e, até o momento, um único trabalho foi realizado a fim de avaliar a eficiência da técnica para espécies de cactos por um período superior a este (Barbara et al. 2015).

O armazenamento criogênico requer um investimento com a aquisição de tanques bem como a reposição regular do nitrogênio líquido. Outras estratégias de

conservação de sementes convencionais relacionadas à redução na temperatura têm sido conduzidas com sucesso para outros representantes da família (Abud et al. 2012; Salazar et al. 2013; Civatti et al. 2015a; Nascimento et al. 2015) e, pode ser uma alternativa para a conservação de sementes das espécies. Até o momento não há registros de trabalhos relacionados à utilização de ultrafreezer (-80°C) para cactáceas apesar de ser uma alternativa viável, pois é um equipamento comum em instituições e/ou bancos de germoplasma que conservam outros materiais biológicos e, uma vez adquirido, os custos são baixos.

O crescimento lento, outro método para conservação *ex situ*, consiste em reduzir o metabolismo da planta, aumentando ao máximo os intervalos de subcultivos ou estendendo-o indefinidamente, sem afetar a viabilidade das plantas (Lemos et al. 2002). Além dos componentes do meio nutritivo, como reguladores osmóticos, hormonais e concentração de sais, diversos fatores interferem na redução do crescimento *in vitro* como a temperatura, condição fisiológica do explante, recipiente de cultura e modificações na atmosfera gasosa (Engelmann, 1991). No entanto, a conservação *in vitro* sob condições e crescimento lento assegura a conservação do germoplasma vegetal somente por curtos períodos de tempo (seis a doze meses), dependendo do procedimento ou da espécie de planta (Santos, 2000).

Apesar dos cactos reconhecidamente apresentarem crescimento lento em virtude da fisiologia CAM (Metabolismo Ácido das Crassuláceas), uma comparação entre as taxas de crescimento em diferentes ambientes de cultivo demonstrou que plantas cultivadas *in vitro* apresentam um crescimento acelerado (Malda et al. 1999) o que indica a necessidade de estudos com espécies da família. Até o momento, não há registro de trabalhos na literatura acerca da tolerância da espécie em estudo com relação à utilização agentes osmóticos. Apenas dois trabalhos foram realizados visando

estabelecer protocolos para representantes da família. Resende (2010) estabeleceu protocolo para duas espécies nativas de coroa de frade, *Melocactus glaucescens* e *M. paucispinus*, enquanto Perez-Molphe-Balch et al. (2012) realizou a conservação de espécies e subespécies do gênero *Turbinicarpus*.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer diferentes metodologias para conservação de *D. zehntneri* subsp. *boomianus*, a fim de propor estratégias que possibilitem o estabelecimento de bancos de germoplasma *ex situ* desta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material vegetal

Frutos maduros de *Discocactus zehntneri* subsp. *boomianus* foram coletados em diferentes populações da espécie localizadas em Morro do Chapéu, na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil (S11°20'11,1" W41°22'17,4"; S11°20'25,6" W41°22'12,2"; S11°29'25,6" W41°20'34,2"). As sementes foram extraídas dos frutos, secas em papel filtro, beneficiadas e, posteriormente, armazenadas em sacos de papel à temperatura ambiente até a montagem dos experimentos.

2. Criopreservação de brotos

Plantas oriundas da germinação de sementes *in vitro* foram utilizadas como fonte de explante para a micropropagação da espécie. Brotos laterais derivados da organogênese direta (capítulo 01) com parte aérea medindo de 3-7 mm de comprimento foram submetidos a seis tratamentos de crioproteção que envolveram diferentes soluções de carregamento bem como diferentes temperaturas de exposição à solução de vitrificação (Tabela 01). Os brotos foram inseridos em criotubos contendo ou não, diferentes soluções de carregamento (glicerol 2M, sacarose 0,4M ou glicerol 2M +

sacarose 0,4M) por 20 minutos a 25°C. Posteriormente, foram submetidos à vitrificação PVS2 (Sakai et al. 1990), composta por 30% de glicerol, 15% de etilenoglicol e 15% de dimetilsulfóxido (DMSO), em meio Murashige e Skoog (1962) com a metade das concentrações salinas (MS/2) suplementado com 0,4M de sacarose (pH=5,7) por dez minutos a 0°C ou 25°C.

Tabela 01. Criopreservação de brotos de *Discocactus zehntneri* subsp. *boomianus* submetidos a diferentes soluções de carregamento e a solução de vitrificação (PVS2) em diferentes temperaturas.

Tratamento	Soluções de carregamento		Solução de vitrificação	
	Tipo	Temperatura	Tipo	Temperatura
Controle	-	-	-	-
T1	Glicerol		PVS2	
T2	Sacarose	25°C	PVS2	25°C
T3	Glicerol+ sacarose		PVS2	
T4	Glicerol		PVS2	
T5	Sacarose	25°C	PVS2	0°C
T6	Glicerol+ sacarose		PVS2	

Os criotubos foram mantidos no tanque de nitrogênio (-196°C) por sete dias. Transcorrido o tempo estabelecido, foram retirados do tanque, mantidos por 40 min a

temperatura ambiente e, posteriormente, aquecidos em banho maria (40°C) durante 15 min. Em capela de fluxo laminar, os brotos foram retirados dos criotubos, lavados em meio MS/2 líquido, suplementado com 0,4M de sacarose (ph=5,7) e inoculados em tubos de ensaio contendo 15 ml de meio MS/2 suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 6,5 g L⁻¹ de ágar. Foram utilizadas cinco repetições de cinco brotos em cada tratamento. As unidades experimentais foram mantidas por 30 dias em sala de crescimento a 24 ± 3°C sob luz fluorescente branca (60 μmol m⁻² s⁻¹) e 16 horas de fotoperíodo.

3. *Conservação de sementes*

A conservação de sementes por congelamento foi avaliada em duas temperaturas: -196°C (nitrogênio líquido) ou -80°C (ultrafreezer). As sementes foram transferidas para criotubos e congeladas diretamente (Marchi et al. 2013). Foram avaliados diferentes períodos de armazenamento em nitrogênio líquido (30, 90, 180 ou 360 dias) e ultrafreezer (30, 90 ou 180 dias). O grupo controle foi imediatamente inoculado uma vez que não foi submetido ao congelamento. Após a conclusão de cada período de armazenamento, os criotubos foram removidos do tanque de nitrogênio e do ultrafreezer e as sementes foram descongeladas durante uma hora à temperatura ambiente (24-25°C). Posteriormente, em fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas quimicamente por um minuto em álcool absoluto e 15 minutos em hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) e, em seguida, lavadas três vezes em água estéril. As sementes foram inoculadas em frascos de vidro de 250 mL contendo 50 mL de meio Murashige e Skoog (1962) com metade das concentrações salinas (MS/2), suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose e 6,5 g L⁻¹ de ágar. O meio nutritivo teve o pH ajustado para 5,6 - 5,8 e foi esterilizado em autoclave durante 15 minutos a 121 °C. Após a inoculação as unidades

experimentais foram acondicionadas em câmeras tipo BOD a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sob luz fluorescente branca ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e 16 horas de fotoperíodo.

3.1 Teste de tetrazolio para análise da viabilidade dos embriões

A análise da viabilidade das sementes foi realizada segundo Veiga-Barbosa et al. (2010) com modificações. Cerca de dez sementes tiveram o seu opérculo removido com o auxílio de um bisturi e, em seguida, foram submetidas a embebição em água por 24h. Posteriormente, as sementes foram imersas em solução de 2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio a 0,6% por 24h a temperatura ambiente. Transcorrido o tempo estabelecido, as sementes tiveram as testas fragmentadas e os embriões foram excisados e visualizados em lupa. Os embriões foram classificados quanto à viabilidade de acordo com sua coloração. Foram consideradas viáveis as sementes cujo embrião apresentou tons de vermelho.

3.2 Amostragem e variáveis analisadas

Foram utilizadas 100 sementes para cada tratamento divididas em quatro repetições de 25 sementes cada. Os experimentos foram avaliados diariamente durante 21 dias após a germinação da primeira semente e foram consideradas germinadas as sementes cuja emissão da radícula foi superior a dois milímetros (Figura 01 F). As variáveis analisadas foram baseadas em Ferreira e Borghetti (2004) e consistiram de germinabilidade, que representa a porcentagem das sementes germinadas em relação ao número de sementes dispostas a germinar (%G), tempo médio de germinação (TMG: $\sum n_i \cdot t_i / \sum n_i$) e velocidade média de germinação (V: $\sum n_i / \sum n_i \cdot t_i$). Onde n_i refere-se ao número de sementes germinadas e t_i expressa o intervalo de tempo entre a germinação. Além disso, foi analisada a frequência acumulada da germinação (FA).

3.3 Delineamento e análise estatística

O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC) e os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) através do software estatístico R (R Development Core Team, 2013). Foram utilizados os testes de Shapiro-Wilk e Bartlett para averiguar a normalidade de resíduos e homogeneidade de variâncias, respectivamente. Quando não atendidas às pressuposições da análise de variância o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para análise dos dados e para os demais casos foi utilizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparação de médias ou o modelo de regressão.

4. Crescimento mínimo

Plantas oriundas da germinação *in vitro* de sementes com aproximadamente um ano de idade foram inoculadas em meio MS suplementado com diferentes concentrações dos agentes osmóticos sacarose e manitol (Tabela 02).

Tabela 02: Diferentes concentrações de sacarose e manitol distribuídas em oito tratamentos para conservação *in vitro* de *Discocactus zehntneri* subsp. *boomianus* e seus respectivos potenciais osmóticos.

Tratamento	Sacarose (g L ⁻¹)	Manitol (g L ⁻¹)	Potencial osmótico (Ψ _o)
01	30	-	- 0,2170 MPa
02	60	-	- 0,4340 MPa
03	90	-	- 0,6510 MPa
04	120	-	- 0,8680 MPa
05	30	15	- 0,3255 MPa
06	30	30	- 0,4340 MPa
07	30	45	- 0,5425 MPa
08	30	60	- 0,6510 MPa

O meio nutritivo foi gelificado com 7 g L^{-1} de ágar e teve o seu pH ajustado para 5,6 - 5,8 antes da esterilização em autoclave durante 15 minutos a $121 \text{ }^\circ\text{C}$. Após a inoculação as unidades experimentais foram mantidas por 365 dias em sala de crescimento a $24 \pm 3^\circ\text{C}$ sob luz fluorescente branca ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e 16 horas de fotoperíodo.

4.1 Amostragem e variáveis analisadas

Foram utilizadas oito repetições constituídas por três plantas em cada tratamento. Após 365 dias foram avaliadas as variáveis comprimento da parte aérea (mm), diâmetro da parte aérea (mm) e comprimento da maior raiz (mm), com auxílio de um paquímetro digital. Para massa seca da parte aérea e massa seca do sistema radicular as plantas foram submetidas à secagem em estufa com ventilação forçada por 96 horas .

4.2 Delineamento e análise estatística

O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC) e os dados foram analisados através do software estatístico R (R Development Core Team, 2013). Foram utilizados os testes de Shapiro-Wilk e Bartlett para averiguar a normalidade de resíduos e homogeneidade de variâncias, respectivamente. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade para comparação de médias.

RESULTADOS

1. Criopreservação de brotos

As diferentes soluções de carregamento bem como a solução de vitrificação, PVS2, independente da temperatura, não foram eficientes para a conservação de brotos

de *Discocactus zehntneri* subsp *boomianus* em nitrogênio líquido (-196°C). Após 30 dias de cultivo apenas os brotos do tratamento controle sobreviveram (Figura 01 A e B).

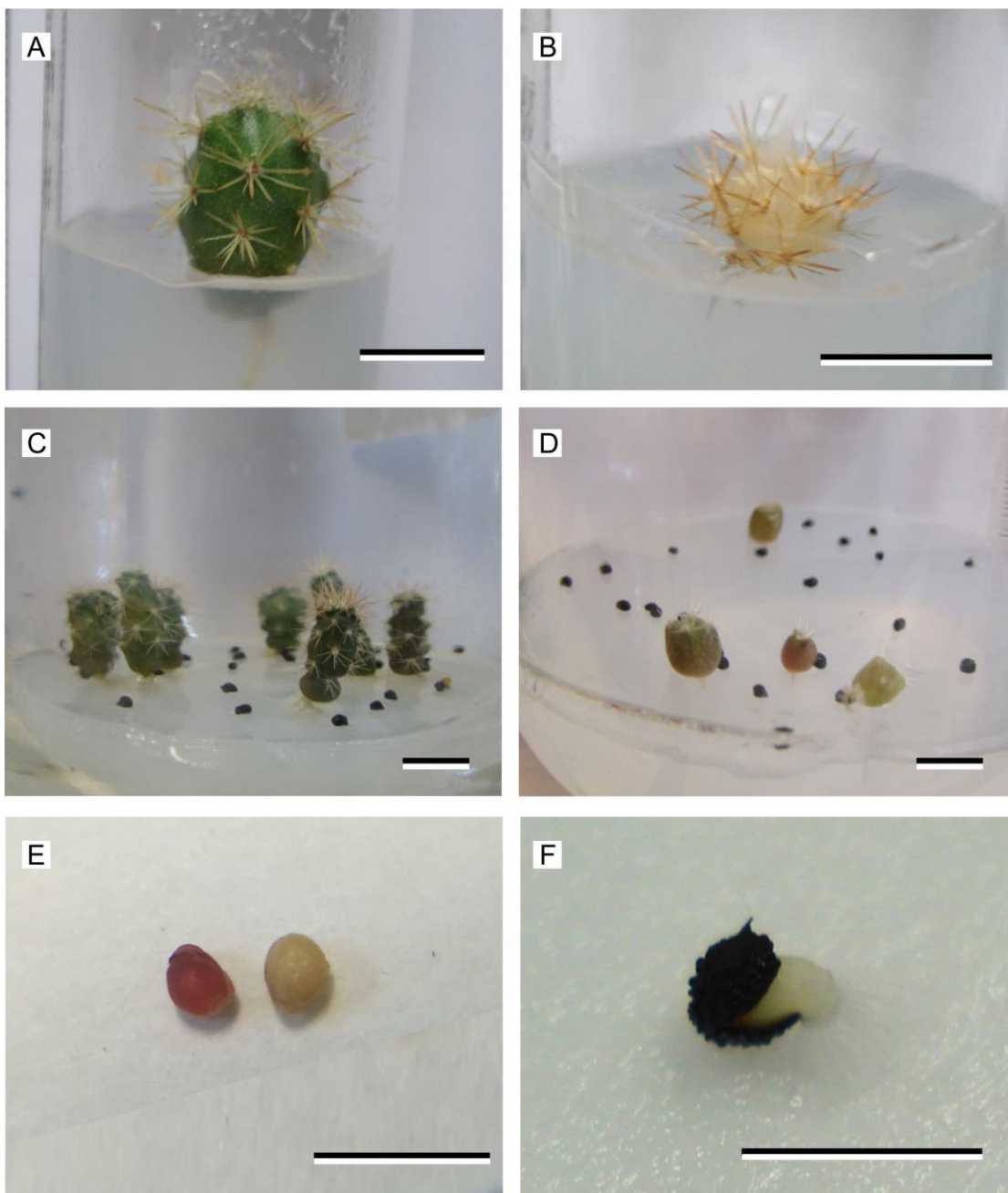


Figura 01. Conservação *ex situ* de *Discocactus zehntneri* subsp *boomianus*. Brotos derivados do tratamento controle (A) e conservados por sete dias em nitrogênio líquido (B). Aspectos morfológicos de plantas derivadas da germinação de sementes no tratamento controle (C) e após o armazenamento em ultrafreezer (D). Teste de

viabilidade de sementes (E) e protrusão da radícula (F). Barras: A, B, C e D: 1 cm; E e F: 1mm.

2. Criopreservação de sementes

O início da germinação de sementes de *D. zehntneri* ocorreu entre o quarto e o sétimo dia para as sementes armazenadas em nitrogênio líquido (Figura 02). De modo geral, o início da germinação foi inversamente proporcional ao tempo imerso em nitrogênio, ou seja, as sementes criopreservadas pelo menor tempo, tiveram o início da germinação mais precoce, enquanto que as sementes armazenadas pelo maior tempo, bem como o controle, começaram a germinar mais tardiamente. Exceto o controle, cuja germinação se estabilizou no décimo quinto dia, as sementes criopreservadas apresentaram um aumento da germinabilidade até o último dia de avaliação.

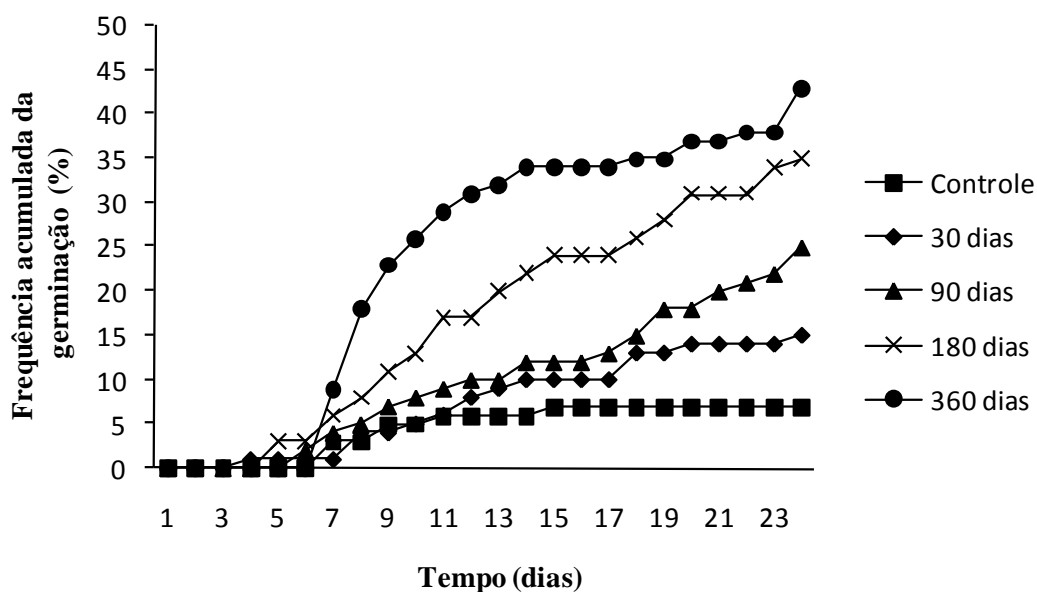


Figura 02. Distribuição da frequência acumulada (FA) da germinação de sementes de *Discocactus zehntneri* subsp *boomianus* durante o armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C). Os valores de FA representam a somatória das quatro repetições simultâneas.

O armazenamento em condições de nitrogênio líquido não reduziu a qualidade fisiológica das sementes. De acordo com a Figura 03 houve um aumento significativo da germinabilidade ao longo do tempo de armazenamento. As sementes do tratamento controle apresentaram o menor percentual de germinação, 7%, enquanto as sementes armazenadas por 360 dias, aproximadamente um percentual cinco vezes maior, 44%. A análise de regressão indicou modelo matemático quadrático ascendente para a germinabilidade em função do tempo de armazenamento em nitrogênio líquido (Figura 03).

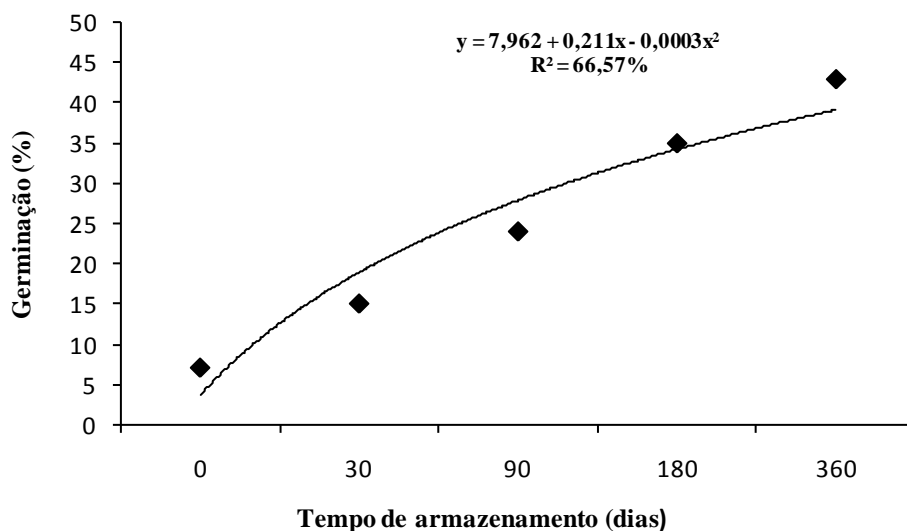


Figura 03: Germinabilidade de sementes de *Discocactus zehntneri* subsp *boomianus* durante o armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C).

Com relação à cinética da germinação, de acordo com a tabela 03, o tempo médio de germinação das sementes criopreservadas por 30, 90 e 180 dias (13,30; 15,39; e 13,29 respectivamente) foi significativamente maior que o controle (6,37). No entanto, as sementes armazenadas pelo maior tempo, 360 dias (11,22), não diferiu significativamente das sementes não criopreservadas. A variável velocidade média de

germinação não apresentou diferenças significativas durante os períodos de tempo avaliados e variou entre 0,0650 a 0,0930 para sementes armazenadas durante 90 e 360 dias, respectivamente.

Tabela 03: Efeito do tempo de armazenamento em nitrogênio líquido no tempo médio de germinação (TMG) e velocidade média de germinação (VM) de sementes de *Discocactus zehntneri* subsp *boomianus*.

Tempo de armazenamento (dias)	TMG	VM
Controle	6,37a	0,0907a
30	13,30bc	0,0776a
90	15,39c	0,0650a
180	13,29b	0,0756a
360	11,22ab	0,0930a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

3. Armazenamento em ultrafreezer (-80°C)

O início da germinação de sementes de *D. zehntneri* ocorreu entre o sexto e o oitavo dia para as sementes armazenadas em ultrafreezer (Figura 04). O aumento no período de armazenamento esteve diretamente relacionado ao atraso no início do processo germinativo, visto que no tratamento controle a germinação iniciou-se no quinto dia e, após o armazenamento por 180 dias, apenas a partir do oitavo.

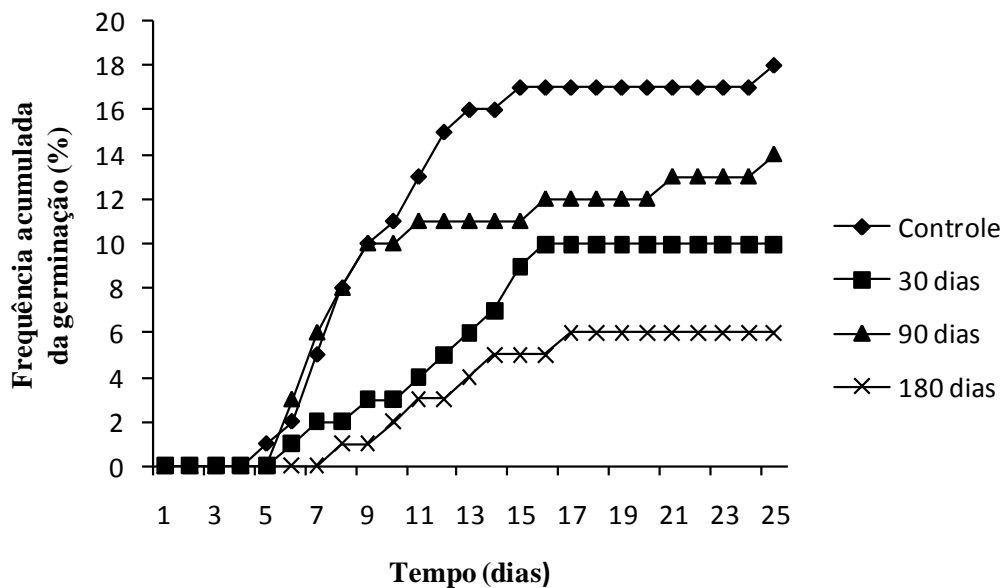


Figura 04. Distribuição da frequência acumulada (FA) da germinação de sementes de *Discocactus zehntneri* subsp *boomianus* durante o armazenamento ultrafreezer (-80°C). Os valores de FA representam a somatória das quatro repetições simultâneas.

O aumento no período de armazenamento não reduziu a qualidade fisiológica das sementes (Tabela 04). Não houve diferenças significativas entre as sementes armazenadas e o tratamento controle, cujos percentuais variaram de 6 a 18%. No entanto, o teste de tetrazolio realizado com sementes não germinadas ao final do experimento indicou que as sementes submetidas ao armazenamento apresentaram um percentual de viabilidade de cerca de 50% enquanto as derivadas do tratamento controle apresentaram um percentual superior, 58%. (Figura 1 E).

O tempo médio de germinação também não sofreu influencia do tempo de armazenamento (Tabela 04). No entanto, a velocidade média de germinação, foi significativamente alterada. Houve uma redução na velocidade ao longo do período de armazenamento. As sementes do tratamento controle apresentaram uma velocidade

significativamente maior (0,1330) que as armazenadas por 180 dias (0,0408). O armazenamento pelos períodos intermediários, 30 e 90 dias, não diferiu significativamente do controle e das sementes armazenadas por 180 dias, 0,0851 e 0,0978, respectivamente.

Tabela 04: Efeito do tempo de armazenamento em temperaturas ultrabaixas (-80°C) na germinabilidade (G%), tempo médio de germinação (TMG) e velocidade média de germinação (VM) de sementes de *Discocactus zehntneri* subsp *boomianus*.

Tempo de armazenamento (dias)	G (%)	TMG	VM
Controle	18a	8,23a	0,1330a
30	10a	12,18a	0,0851ab
90	15a	11,30a	0,0978ab
180	6a	6,12a	0,0408b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

4. Efeito de diferentes agentes osmóticos no crescimento mínimo das plantas

Após 365 dias de cultivo, sem a realização de subculturas, os agentes osmóticos analisados foram eficientes em reduzir o crescimento *in vitro* das plantas (Figura 05). Houve 100% de sobrevivência independente do tipo e concentração dos agentes osmóticos analisados.

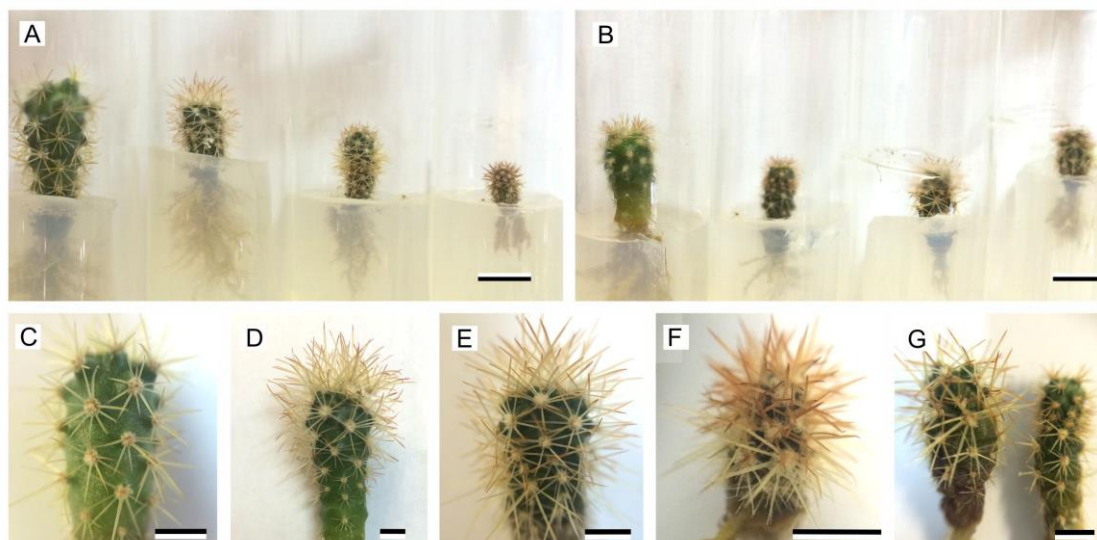


Figura 05. Conservação *in vitro* de *Discocactus zehntneri* subsp *boomianus* utilizando diferentes agentes osmóticos. Brotos submetidos a 30, 60, 90 ou 120 g L⁻¹ de sacarose (A) e 30 g L⁻¹ de sacarose + 15, 30, 45 ou 60 g L⁻¹ de manitol (B) em ordem crescente de solutos. Diferentes padrões morfológicos de plantas derivadas da conservação: cladódio de coloração verde e espinhos de tamanho e disposição normais (C), cladódio apresentando concentração de espinhos no ápice (D), cladódio verde escuro com espinhos desenvolvidos (E), cladódio verde escuro com espinhos desenvolvidos e de coloração vermelha (F) e cladódios verde escuro e espinhos desenvolvidos ou de disposição normal (G). Barras: 1 cm.

A redução do comprimento da parte aérea (CPA) esteve diretamente relacionada com o aumento da concentração de sacarose (Tabela 05). O tratamento cujo meio nutritivo foi suplementado com a maior concentração de sacarose, 120 g L⁻¹ e menor potencial hídrico (-0,8680 MPa), apresentou o menor tamanho dentre os oito testados (9,58 mm), seguido dos tratamentos com 90 g L⁻¹ de sacarose e 30 g L⁻¹ de sacarose + 60 g L⁻¹ de manitol (10,76 e 11,61mm respectivamente). O diâmetro da parte aérea (DPA) dos cladódios nos tratamentos com as maiores concentrações de sacarose (T3 e T4) e de manitol (T7 e T8) apresentaram um tamanho significativamente menor

variando entre 3,83 a 4,32 mm na maior concentração de manitol e de sacarose testada, respectivamente (Tabela 05).

Tabela 05: Efeito de diferentes tipos e concentrações de agentes osmóticos no comprimento da parte aérea (CPA), diâmetro da parte aérea (DPA), massa seca da parte aérea (MSPA), comprimento da maior raiz (CMR) e massa seca do sistema radicular (MSSR) de *Discocactus zehntneri* subsp *boomianus*.

Sacarose (g L ⁻¹)	Manitol (g L ⁻¹)	CPA (mm)	DPA (mm)	MSPA (g)	CMR (mm)	MSSR (g)
30	-	24,11a	7,45a	0,122a	28,80a	0,038ab
60	-	13,69bc	5,88b	0,122a	22,37ab	0,066a
90	-	10,76e	4,32d	0,078bc	14,28c	0,029bc
120	-	9,58f	3,85d	0,072bc	11,07de	0,035b
30	15	13,74b	5,67b	0,105a	22,01b	0,049a
30	30	12,40cd	4,84c	0,140a	15,76c	0,021cd
30	45	11,42e	4,11d	0,069c	12,43cd	0,020cd
30	60	11,61de	3,83d	0,111ab	9,52e	0,016d

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não difere significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Os tratamentos que apresentavam os menores potenciais osmóticos também foram mais eficientes em inibir o crescimento da maior raiz (Tabela 05). O tratamento com a maior concentração de manitol reduziu significativamente esta variável (9,52 mm), no entanto, não houve diferença significativa entre este tratamento e aquele suplementado com a maior concentração de sacarose (11,07mm).

Com relação à massa seca da parte aérea o tratamento que apresentou a menor redução desta variável foi o que a sacarose (30 g L^{-1}) esteve combinada com 45 g L^{-1} de manitol, $0,069\text{g}$, no entanto esse resultado não diferiu significativamente dos tratamentos suplementados com 90 e 120 g L^{-1} de sacarose, $0,078$ e $0,072 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente (Tabela 05). Os tratamentos suplementados com manitol foram mais eficientes na redução da massa seca do sistema radicular. O tratamento no qual 30 g L^{-1} de sacarose esteve combinada com a maior concentração do manitol apresentou $0,016\text{g}$ e não diferiu estatisticamente daqueles suplementados com 30 e 45 g L^{-1} deste agente osmótico ($0,021$ e $0,020 \text{ g L}^{-1}$ respectivamente).

A utilização de diferentes tipos e concentrações de agentes osmóticos resultou em uma mudança de coloração das plantas que variou entre os tratamentos após 365 dias de cultura (Figura 05 C-G). Na condição de maior potencial hídrico (30 g L^{-1} de sacarose ou 30 g L^{-1} de sacarose + 15 g L^{-1} de manitol) a coloração dos cladódios e espinhos foram majoritariamente verdes (Figura 05 C), considerada condição padrão. À medida que houve redução no potencial osmótico do meio nutritivo foi observada uma maior proporção de cladódios verde escuro (Figura 05 E, F e G) e espinhos vermelhos (Figura 05 F). Além disso, considerando o padrão de tamanho e distribuição de espinhos no cladódio (Figura 05 C) foram observadas algumas variações pontuais como concentração de espinhos no ápice (Figura 05 D) e espinhos mais desenvolvidos (Figura 05 E e F), no entanto não houve correlação entre essas características e os tratamentos aplicados, inclusive porque foram encontrados diferentes padrões dentro do mesmo tratamento (Figura 05 G).

DISCUSSÃO

1. Criopreservação de brotos

As técnicas mais recentes de criopreservação são baseadas na vitrificação, a qual envolve desidratação dos tecidos para um teor de umidade em que não exista mais água disponível para a cristalização (Santos, 2000). Neste caso, a desidratação celular é realizada antes do congelamento por meio da exposição das amostras a crioprotetores e/ou dessecação do ar (Engelmann, 2010). Os crioprotetores comumente utilizados, em uma solução altamente concentrada, incluem o dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol, metanol, glicerol e propilenoglicol (Santos, 2000; Benson, 2008). No entanto, visto que elevadas concentrações destes aditivos podem causar estresse físico e químico aos materiais biológicos (Benson, 2008), uma alternativa seria a utilização de açúcares, como sacarose, trealose e glicose, porque são excelentes agentes vitrificadores e, além disso, não apresentam toxicidade para as células vegetais, mesmo quando se acumulam em grande quantidade no citoplasma (Santos, 2000).

O insucesso da metodologia aplicada para a criopreservação dos brotos de *Discocactus zehntneri* subsp *boomianus* pode estar relacionado à citotoxicidade dos crioprotetores (Benson, 2008; Ray e Bhattacharya, 2008) ou a formação de cristais de gelo intracelular, que pode ter resultado no colapso do sistema de endomembranas (Santos et al. 2000; Kaviani et al. 2009) e, conseqüentemente, na morte dos tecidos após a exposição a temperaturas ultrabaixas do nitrogênio líquido (Figura 01 B).

Segundo Antony et al. (2010) a duração na solução de PVS2 é um dos fatores que mais influenciam a recuperação pós-descongelamento dos explantes criopreservados. Assim, a formação dos cristais de gelo pode estar associado ao tempo

limitado de exposição dos tecidos à solução de vitrificação. Neste trabalho as amostras permaneceram apenas durante 10 minutos em contato com a solução de PVS2 e na literatura há registro de trabalhos que utilizam escala de horas (Vendrame et al. 2007) ou que relacionam o sucesso na regeneração ao maior o tempo de exposição ao PVS2 (Santos et al. 2015). O tamanho do explante utilizado também pode justificar a morte dos brotos. Quando analisado o tamanho dos segmentos nodais de *Rauvolfia serpentina*, os maiores explantes, 0,47 – 0,59 cm, na sua maioria não conseguiram se recuperar após o armazenamento (Ray e Bhattacharya, 2008). Segundo os autores, explantes maiores podem apresentar uma penetração incompleta da solução de vitrificação que conduzem a vitrificação abaixo do ideal das camadas celulares internas. De modo geral, estruturas de tamanho reduzido são mais apropriadas para o congelamento, uma vez que a desidratação e congelamento ocorrem de forma mais rápida e uniforme em estruturas menores (Santos, 2000). No entanto, para híbridos de *Dendrobium* protocormos maiores, de 3-4mm, apresentaram maior viabilidade que os de tamanho reduzido, de 1-2mm (Antony et al. 2010). Os explantes menores também apresentam a desvantagem de sofrerem mais injúrias mecânicas (Antony et al. 2010) provavelmente serem mais sensíveis e, conseqüentemente, incapazes de lidar com o estresse (Ray e Bhattacharya, 2008). Isso demonstra que o tamanho ideal depende do tipo de explante e, sobretudo, da espécie analisada. Além disso, a recristalização, durante a etapa de descongelamento, pode ter sido outro fator que inviabilizou o protocolo aplicado. Neste caso, a formação do gelo pode ocorrer tanto pelo congelamento da água liberada da desvitrificação quanto pelo crescimento de cristais de gelo diminutos que possam ter se formado durante o congelamento e que retomaram o crescimento após o aumento da temperatura (Santos, 2000).

Apesar de metodologias similares terem se mostrado eficientes para manutenção da sobrevivência de outras espécies de plantas após o congelamento (Ray e Bhattacharya, 2008; Santos et al. 2015) a estrutura peculiar os tecidos dos representantes desta família, que apresentam grandes proporções de parênquima aquífero (Dettke e Milaneze-Gutierre, 2008) parece exigir protocolos mais específicos.

2. *Conservação de sementes em nitrogênio líquido e ultrafreezer*

A redução do teor de umidade e de temperatura são fatores que interferem significativamente na longevidade durante o armazenamento das sementes (Ferreira e Borghetti, 2004). De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, tanto a criopreservação (-196°C) quanto o armazenamento em ultrafreezer (-80°C) mantiveram a qualidade fisiológica das sementes durante 360 e 180 dias, respectivamente, não sendo necessário nenhum tratamento de desidratação adicional ou crioproteção (Figura 02, Tabela 04). Isso demonstra que sementes dessa espécie podem ser conservadas com a umidade inicial logo após a coleta. A manutenção da viabilidade após o armazenamento em nitrogênio líquido por 30 ou até 120 dias corrobora os resultados obtidos por Marchi et al. (2013) e Veiga-Barbosa et al. (2010) para esta espécie e pode ser atribuído ao fato de serem classificadas como sementes ortodoxas quanto ao comportamento em relação ao armazenamento (Marchi et al. 2013). Similarmente algumas espécies de cactáceas como *Pilosocereus pachycladus* (Barbara et al. 2015), *P. robinni* (Salazar et al. 2013) e *Micranthocereus flaviflorus* (Civatti et al. 2015 b), além de outras espécies de plantas (Silva et al. 2014; Jaganathan et al. 2015; Ferrari et al. 2016) também foram classificadas como ortodoxas e mantiveram sua viabilidade após o congelamento convencional (-20°C), em ultrafreezer (-80°C) e/ou em nitrogênio líquido (-196°C).

As sementes ortodoxas são altamente tolerantes a baixas temperaturas (Engelman, 1991; Walters et al. 2013; Silva et al. 2014) e ao eventual descongelamento ocasionado pelo armazenamento em temperaturas ultrabaixas (Silva et al. 2014). As sementes ortodoxas durante o seu desenvolvimento sofrem uma acentuada desidratação e adquirem tolerância ao dessecamento na fase de maturação (Song-Quan et al. 2003; Kerbauy, 2004). A tolerância à dessecação pode ser atribuída a diversos processos ou mecanismos como características físicas intracelulares (redução no grau de vacuolação, quantidade e natureza das reservas insolúveis acumuladas, conformação do DNA, cromatina e arquitetura nuclear, dentre outras), sistemas antioxidantes, acúmulo de proteínas LEA, sacarose e oligossacarídeos, moléculas anfipáticas, camada periférica de oleosina em torno corpos lipídicos e a presença e o funcionamento de mecanismos de reparo durante a reidratação (Pammenter e Berjak, 1999). Segundo Engelmann (2011; 2004) alguns materiais tais como sementes ortodoxas e gemas dormentes exibem um processo de desidratação natural e podem ser criopreservados sem nenhum tratamento prévio. A importância da dessecação em algumas espécies foi evidenciada pela perda da qualidade fisiológica após o armazenamento em baixas temperaturas em condições de elevado teor de água (Jaganathan et al. 2015; Michalak et al. 2015). A perda do potencial germinativo em tais condições pode ser atribuída às oscilações nos teores de umidade que segundo alguns autores podem favorecer a colonização de fungos e, conseqüentemente, contribuir para deterioração das sementes (Fonseca et al. 2012).

A redução da temperatura seja através da criopreservação ou do congelamento tradicional tem sido uma metodologia eficiente para conservação de sementes de outras espécies de cactos com potencial ornamental ou ameaçado em maior ou menor grau. O nitrogênio líquido não reduziu a qualidade fisiológica de sementes de espécies como *Cereus jamacaru*, *Melocactus concinnus*, *M. paucispinus*, (Veiga-Barbosa et al. 2010),

Pilosocereus gounelli (Veiga-Barbosa et al. 2010; Marchi et al. 2013), *Stephanocereus luetzelburgii* (Marchi et al. 2013) e *Micranthocereus flaviflorus* (Veiga-Barbosa et al. 2010; Civatti et al. 2015 b). No entanto, *Melocactus albicephalus* (Veiga-Barbosa et al. 2010), *Micranthocereus polyanthus* e *Melocactus conoideus* (Civatti et al. 2015 b) apresentaram uma queda no percentual germinativo após o armazenamento que pode ser atribuída a uma possível dormência secundária derivada da imersão em nitrogênio líquido (Civatti et al. 2015 b).

Até o momento não há estudos com relação ao armazenamento em ultrafreezer (-80°C) para sementes de cactos, no entanto o congelamento convencional (-20°C) mostrou-se eficiente para o armazenamento de *Micranthocereus polyanthus*, *Melocactus conoideus* (Civatti et al. 2015 a) e *Pilosocereus robinii* (Salazar et al. 2013). Além disso, a redução da temperatura para 10°C em *P. gounellei* (Abud et al. 2012) e 7±2°C para *P. pachycladus* e *P. tuberculatus* (Nascimento et al. 2015) foram eficientes para manutenção da qualidade fisiológica das sementes em relação ao controle. Ainda que a redução na temperatura não paralise o metabolismo vegetal, segundo Abud et al. (2012) esse ambiente possibilita o controle da temperatura e da umidade relativa do ar, reduzindo dessa forma a deterioração dos compostos de reserva e, conseqüentemente, essa pode ser outra alternativa viável para a conservação de diversas espécies.

A perda da viabilidade dos embriões após a conservação pode ser atribuída a incidência de injúria nos tecidos das sementes causada pela exposição à temperatura extrema (Silva et al. 2011) bem como ao lote utilizado para a montagem do experimento. Segundo Kerbauy (2004) durante a fase de desenvolvimento da semente, diversos fatores, como água, luz, temperatura e o estado nutricional, podem influenciar na germinação da semente madura.

A baixa germinação inicial de *D. zehntneri* associada ao aumento da germinabilidade após o armazenamento em nitrogênio líquido (Figura 02) sugere que essa espécie pode apresentar dormência primária do tipo física. As condições de armazenamento sob baixas temperaturas em sementes com teor de água reduzido podem promover a superação de dormência (Padua et al. 2011). Segundo Veiga-Barbosa et al. (2010) e Marchi et al. (2013) esta espécie apresenta algum tipo dormência e temperaturas ultrabaixas podem ter potencializado a sua germinação (Marchi et al. 2013). Similarmente, sementes de *Helonia bullata* apresentaram um percentual de germinação superior ao de sementes não congeladas (Perullo et al. 2015). Tweddle et al. (2003) correlacionam diferentes tipos de dormência, como a dormência física, com espécies cujas sementes apresentam tolerância à dessecação. A dormência física pode ser causada por uma ou mais camadas de células paliçádicas impermeáveis na testa da semente que previne a passagem de água para o embrião (Baskin et al. 2000; Vivian et al. 2008) e, somente quando esta barreira é rompida de algum modo, a embebição pode ocorrer e a germinação começar (Tweddle et al. 2003). O congelamento pode ter causado microfissuras no tegumento das sementes possibilitando assim a quebra da sua dormência física. Segundo Pilatti et al. (2011) o nitrogênio líquido e os ciclos de congelamento/descongelamento atuam como um tratamento de escarificação resultando em uma maior permeabilidade e/ou alterações na fisiologia das sementes que podem resultar em um maior potencial germinativo em relação ao tratamento controle. É provável que a escarificação provocada pelo nitrogênio líquido tenha sido mais intensa que a provocada pelo armazenamento em ultrafreezer (-80°C) uma vez que estas mantiveram os percentuais similares estatisticamente em relação ao tratamento controle (Tabela 04).

Além do armazenamento em nitrogênio aumentar o percentual de sementes germinadas, houve um aumento no percentual de germinação ao longo do período de armazenamento. De modo similar, espécies do gênero *Turbinicarpus* apresentaram altas porcentagens de germinação em sementes envelhecidas em comparação com sementes frescas (Flores et al. 2008). Segundo os autores a dormência das sementes pode justificar a manutenção da viabilidade ao longo do tempo e indica o potencial destas espécies para produzir um banco de sementes no solo.

Apesar do acréscimo ou estabilidade da germinação ao longo do período de armazenamento, houve uma redução na cinética do processo germinativo em relação ao controle evidenciada tanto pela redução do tempo médio de germinação (Tabela 03) quanto pela velocidade média de germinação (Tabela 04) para as sementes conservadas em nitrogênio líquido (-196°C) e ultrafreezer (-80°C), respectivamente. Possivelmente, a retomada da atividade metabólica das sementes congeladas seja mais lenta em virtude de terem permanecido com o metabolismo paralisado durante o período de tempo no qual ficaram armazenadas, o que pode ter atrasado a cinética do processo em relação ao controle. Além disso, essa resposta pode indicar que ocorreram mudanças fisiológicas negativas que pode estar relacionada a uma predisposição bioquímica para a deterioração mediada por estresse oxidativo ou, inversamente, por apresentar baixo status antioxidante (Higa et al. 2011). Esses resultados discordam dos obtidos por Marchi et al. (2013), cuja cinética do processo germinativo, expressa pelo índice de velocidade de germinação (IVG), foi acelerada para sementes criopreservadas por 30 dias em relação ao controle. *Micranthocereus flaviflorus* também apresentou um IVG superior para sementes armazenadas por sete dias (Civatti et al. 2015 b). No entanto, para *Pilosocereus pachycladus* não houve diferenças significativas entre os parâmetros cinéticos da germinação analisados entre o controle e as sementes criopreservadas por

até 360 dias (Barbara et al. 2015). O tempo médio de germinação de diversas espécies de cactos armazenadas por períodos de 24 a 30 meses a $7\pm 2^{\circ}\text{C}$ variou de cinco a sete dias entre as sementes armazenadas e as recém coletadas e também não diferiu significativamente (Nascimento et al. 2015).

Após a germinação as plantas permaneceram sendo avaliadas com relação às características morfológicas e até o momento não foram observadas diferenças entre aquelas derivadas do armazenamento e o grupo controle (Figura 01 C e D). Esses resultados corroboram os obtidos para outras espécies (Higa et al. 2011; Cejas et al. 2012; 2013; Vineesh et al. 2015; Ferrari et al. 2016) inclusive de cactáceas nativas (Veiga-Barbosa et al. 2010; Marchi et al. 2013; Barbara et al. 2015; Civatti et al. 2015 b). No entanto, períodos prolongados de exposição ao nitrogênio líquido pode ter reduzido o tamanho das plantas de pinhão manso em relação às derivadas de sementes não criopreservadas e induzido a produção de folhas anormais, frequentemente apresentando calos (Silva et al. 2011b). Os autores atribuíram a redução na altura das plantas à redução do metabolismo causado pela exposição dos materiais vegetais a temperatura subzero. Segundo Chetverikova (2011) alterações relacionadas à estrutura e regulação de DNA podem justificar as mudanças morfológicas obtidas após a criopreservação. No entanto, a utilização de marcadores SSR (*Simple Sequence Repeats*) demonstrou que a similaridade morfológica pode ser assegurada pela inexistência de mudanças estruturais no genoma (Cejas et al. 2013).

3. *Crescimento mínimo*

O crescimento *in vitro* de *D. zehntneri* foi influenciado significativamente pelos agentes osmóticos adicionados ao meio nutritivo e não houve redução na sobrevivência das plantas após 365 dias de cultivo. Similarmente, após 12 meses de

cultivo 16 espécies e subespécies do gênero *Turbiniarpus* apresentaram 100% de sobrevivência em condições de crescimento mínimo estimulado pelos agentes osmóticos manitol, sorbitol ou baixas temperaturas (Perez-Molphe-Balch et al. 2012).

De modo geral, o aumento na concentração de carboidratos do meio inibiu o desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular das plantas cultivadas *in vitro* (Figura 06 e Tabela 05). Esses dados corroboram os obtidos para *Opuntia laginera* onde o alongamento dos brotos foi diretamente afetado pela concentração de sacarose. Segundo os autores, concentrações acima de 75 g L^{-1} de sacarose, resultaram tanto em um menor comprimento quanto no menor peso fresco de brotos (Estrada-Luna et al. 2006). Por outro lado, para *O. amyclaea* a concentração ótima para o crescimento *in vitro* foi de 50 g L^{-1} de sacarose e concentrações superiores a essa resultaram em um menor número de brotos e massa seca (Escobar et al. 1986). Quando analisado o crescimento *in vitro* utilizando os agentes osmóticos manitol e sorbitol ou redução na temperatura para 4°C , 12 de 16 espécies e subespécies de *Turbiniarpus* apresentaram redução no crescimento *in vitro* e, para uma delas, *T. schmiedickeanus* subsp. *schwarzii*, somente o manitol foi efetivo na inibição do crescimento (Perez-Molphe-Balch et al. 2012). Para *Mammillaria gracilis* diferentes concentrações de manitol também resultaram na diminuição do crescimento de tumores e calos (Balén et al. 2013).

O aumento na concentração de carboidratos no meio tem favorecido crescimento mínimo de outras espécies. Para *Comanthera mucugensis* o aumento nas concentrações de sacarose assim como a combinação de sacarose e manitol também reduziram o comprimento da parte aérea à medida que houve aumento na concentração total de carboidratos no meio (Lima-Brito et al. 2011). Para a cana de açúcar o tratamento com 20 g L^{-1} de sacarose resultou na manutenção da viabilidade dos explantes em crescimento lento por mais tempo (Lemos et al. 2002). Neste caso,

concentrações mais elevadas bem como a associação entre este açúcar e o manitol resultou na redução da viabilidade das plantas. Para a bromélia *Vriesia inflata* o número de raízes, folhas e comprimento da raiz diminuem linearmente com o aumento de sacarose no meio (Freitas et al. 2015).

Em alguns casos apenas o açúcar álcool é suficiente para reduzir o crescimento *in vitro* de plantas e garantir a viabilidade do material após o armazenamento. Para *Pfaffia tuberosa*, os melhores resultados foram obtidos com 10 g L⁻¹ de sorbitol (Flores et al. 2013) e para a mangabeira 10 ou 20 g L⁻¹ deste mesmo agente osmótico foi mais eficiente (Santos et al. 2011). O comprimento de brotos da orquidea *Vanilla planifolia* foi significativamente reduzido à medida que houve o aumento da concentração de manitol de 10 para 30 g L⁻¹ de 5,3 cm para 0,26 cm, respectivamente (Bello-Bello et al. 2015). No entanto, estes trabalhos relatam que concentrações elevadas de sorbitol (Santos et al. 2011; Flores et al. 2013) ou manitol (Bello-Bello et al. 2015) causaram toxicidade nas plantas e reduziram a sua viabilidade.

Os carboidratos adicionados ao meio nutritivo afetam significativamente o crescimento e as respostas fisiológicas das plantas *in vitro*, atuando tanto como fonte de energia e de carbono quanto como regulador osmótico do meio de cultura (Flores et al. 2008). O manitol, assim como o sorbitol, é um açúcar-álcool utilizado frequentemente para reduzir o potencial hídrico do meio de cultura (George et al. 2008). Segundo Steinitz, (1999) eles comumente penetram nas células, se acumulam e podem ser translocados para ser metabolizado em vários graus. A absorção do manitol já foi relatada para várias espécies cultivadas *in vitro* como *Daucus carota*, *Nicotiana tabacum*, *Pinus radiata* (Thompson, 1986), *Solanum tuberosum*, *Brassica napus* e *Triticum aestivum* (Lipavská e Vreugdenhil, 1996). O metabolismo do manitol ocorre através da via das hexoses (Thompson, 1986) onde é possível a sua utilização como

substrato respiratório (Trip et al. 1964). Além de serem metabolizados em graus variados em culturas heterotróficas, segundo George et al. (2008) o açúcar-álcool têm a função de estimular respostas fisiológicas específicas, por aparentemente atuar como sinais químicos.

A resposta da variável massa seca da parte aérea (MSPA) não seguiu uma tendência de linearidade entre os tratamentos à medida que havia a redução do potencial hídrico do meio, como as demais variáveis analisadas (Tabela 05). A massa seca no tratamento com maior concentração de manitol (Tabela 05) foi similar ao controle e aos tratamentos com menor concentração de solutos. Embora não se tenha realizado estudos mais aprofundados, o aumento na incorporação de carbono associado ao aumento na concentração de manitol sugere que este açúcar-álcool para essa espécie não atue apenas como osmorregulador, mas também seja metabolizável a concentrações acima de 40 g L⁻¹. Similarmente, em *Turbinicarpus pseudomacrolele* subsp. *lausseri* o crescimento de brotos em meios suplementados com sorbitol foi maior que o controle (Perez-Molphe-Balch et al. 2012). No entanto, a capacidade em metabolizar açúcar-álcool parece ser espécie-dependente. Nadel et al. (1989) assegurou que em culturas *Apium graveolens* o manitol não pode fornecer energia suficiente para crescimento contínuo e divisão celular e a sacarose deve ser utilizada para fornecer energia necessária ao desenvolvimento *in vitro*.

A redução do crescimento vegetativo, em particular do crescimento de brotos é um efeito fisiológico relacionado ao estresse hídrico (Mahajan e Tuteja, 2005) e pode estar relacionado à redução na atividade da CDK2 (quinases dependentes de ciclina) que determina o progresso no início da mitose em células eucariotas (Schuppler et al. 1998).

As plantas podem resistir ao estresse osmótico por um processo conhecido como o ajuste osmótico, onde um grande número de compostos são sintetizados e

desempenham um papel fundamental na manutenção do equilíbrio osmótico e na proteção de membranas e macromoléculas (Mahajan e Tuteja, 2005). Segundo os autores, a prolina, glutamato, glicina, betaína, carnitina, os frutanos, a trealose, oligossacidos e íons inorgânicos, como K^+ , são alguns desses compostos. Em tumores do cacto *Mammillaria gracilis* submetidos a diferentes concentrações de manitol foi observado o acúmulo de prolina (Balén et al. 2013), o que evidencia que esse composto pode estar associado a manutenção do equilíbrio osmótico para representantes da família. Além disso, o sucesso na sobrevivência e manutenção em meios nutritivos com déficit hídrico durante 365 dias pode ser justificado pelo fato de cactos, assim como outras plantas que apresentam o metabolismo ácido das crassuláceas (CAM), apresentarem alta eficiência no uso da água e tolerância a seca (Balén et al. 2013).

Quando o objetivo da conservação na cultura de tecidos é manter um genótipo específico, obviamente qualquer sistema que induz mutações é inaceitável (Sarkar et al. 2001). Neste trabalho as alterações morfológicas observadas, sobretudo relacionadas ao padrão de coloração (Figura 05 C-G), podem ser atribuídas ao estresse hídrico aos quais as culturas foram submetidas. Segundo Resende (2010) coloração vermelha de alguns ápices e brotos de *M. glaucescens* e *M. paucispinus* em altas concentrações de sacarose, podem estar relacionada ao déficit hídrico, que pode ter estimulado a produção de betalainas. Betalainas são alcalóides nitrogenados característicos de dez famílias da ordem Caryophyllales cuja síntese ocorre após períodos de estresse exógeno, como frio, seca extrema, alta salinidade e restrita disponibilidade de nutrientes (Stintzing et al. 2001). O que reforça essa hipótese é o fato de indivíduos jovens de cactos que ainda não possuem morfologia para evitar a perda de água, como a presença de espinhos, também apresentarem coloração avermelhada (Resende, 2010). Similarmente, durante o armazenamento de *Lilium davidii* e *L. longiflorum* sob diferentes concentrações do meio

MS ou concentrações de sacarose e ABA, algumas plantas *in vitro* apresentaram alterações morfológicas, como coloração roxa, que também foi atribuído a alterações fisiológicas produzidas sob condições de estresse (Yun-Peng et al. 2012).

Os diferentes padrões de desenvolvimento de espinhos observados em *D. zehntneri* foram similares aos relatados para *Melocactus glaucescens* e *M. paucispinus*. Nos *Melocactus* essa característica esteve associada a meios com elevadas concentrações de sacarose e pode estar relacionado à redução do potencial hídrico do meio, o que levou as plantas a desenvolverem mecanismos para evitar a perda de água (Resende 2010).

As alterações morfológicas derivadas do estresse osmótico durante o crescimento mínimo podem ser atribuídas à hipermetilação do DNA (Harding, 1994). A metilação do DNA é um dos mecanismos que estão envolvidos no controle epigenético durante a expressão gênica (Valledor et al. 2007). O estado de metilação pode ser herdado pelos clones (Harding, 1994; Valledor et al. 2007) e alterar os fenótipos expressos nas gerações seguintes (Harding, 1994). No entanto, o significado biológico desta resposta pode ser a conservação dos recursos celulares durante condições de baixa atividade metabólica (Harding, 1994).

Durante a manutenção das plantas *in vitro*, algumas desvantagens estão associadas à necessidade de frequentes subculturas, tais como a possibilidade de erros de identificação e contaminação com microorganismos (Santos, 2000). Para o crescimento mínimo das espécies *Lilium daviddi* e *L. longiflorum* os autores sugerem a substituição do meio nutritivo a cada três meses por conta do consumo (Yun-Peng et al. 2012). Desta forma, a busca de um protocolo eficiente deve assegurar o cultivo sem subcultura por um maior período de tempo dos materiais biológicos. *D. zehntneri* foi mantido durante um ano sem subcultura e sem redução da sobrevivência o que enfatiza

a eficiência dos tratamentos aplicados. No entanto, a redução do crescimento *in vitro* e a manutenção de altas taxas de sobrevivência não devem ser os únicos parâmetros para avaliar a eficiência de protocolos para conservação *in vitro*. É interessante avaliar também a capacidade de regeneração das plantas após o armazenamento. Algumas espécies de cactos já demonstraram redução na brotação lateral após terem sido submetidas a baixas temperaturas e/ou diferentes agentes osmóticos (Perez-Molphe-Balch et al. 2012).

CONCLUSÃO

Este é o primeiro trabalho que explora diferentes técnicas de conservação *ex vitro* para *Discocactus zehntneri* subsp. *boomianus* e aborda diferentes metodologias que variam como relação ao tempo de armazenamento, investimento e tipo de material biológico a ser conservado. O protocolo de vitrificação aplicado para a conservação de brotos não foi eficiente para manutenção da integridade dos tecidos após a exposição ao nitrogênio líquido (-196°C). No entanto, a manutenção da qualidade fisiológica tanto para sementes armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) quanto em ultrafreezer (-80°C) asseguram que a conservação *ex situ* de sementes de *D. zehntneri* pode ser uma alternativa para conservação dos recursos genéticos dessa espécie. Os agentes osmóticos sacarose e manitol foram eficientes em inibir o crescimento *in vitro* da espécie por um ano sem perda na viabilidade. Todas as variáveis analisadas, exceto a massa seca da parte aérea, apresentaram uma redução significativa em relação ao tratamento controle. No entanto, o estresse hídrico ao qual foram submetidas pode ter contribuído para o aparecimento de alterações morfológicas como mudanças na coloração dos espinhos e cladódios.

REFERÊNCIAS

Abud, H. F., Pereira, D. S., Gonçalves, N. R., Pereira, M. S., Bezerra, A. M. E. Armazenamento de sementes de xique-xique. *Revista Brasileira de Sementes*, v.34, n.3, p.473 - 479, 2012.

Antony, J.J.J., Keng, C. L., Rathinam, X., Sinniah, U. R., Subramaniam, S. Preliminary study on cryopreservation of *Dendrobium* Bobby Messina protocorm-like bodies by vitrification. *African Journal of Biotechnology*. v. 9, n.42, p. 7063-7070, 2010.

Balen, B., Tkalec, M., Rogić, T., Šimac, M., Štefanić, P. P., Rončević, S., Svedružić, L. P., Kršnik-Rasol, M. Effects of iso-osmotic NaCl and mannitol on growth, proline content, and antioxidant defense in *Mammillaria gracilis* Pfeiff. *in vitro*-grown cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. v. 49, n.4, p.421-432, 2013.

Bárbara, E. P. S., Silva, S. A., Souza, M. M. O. R., Gurgel, Z. E. R., Marchi, M. N. G., Bellintani, M. C. Germinação e criopreservação de sementes de cactos nativos da Bahia. *Gaia Scientia*. v.9, n. 2, p.91-96, 2015.

Barroso, G. M., Peixoto, A. L., Ichaso, C. L. F., Guimarães, E. F., Costa, C. G. Sistemática de angiospermas do Brasil. v.1. 2 ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 309p.

Baskin, J. M., Baskin, C. C., Xiaojie, L. Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. *Plant Species Biology*. v.15, p.139-152, 2000.

Bello-Bello, J. J., García-García, G. G., Iglesias-Andreu, L. Conservación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) bajo condiciones de lento crecimiento *in vitro in vitro* conservation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) under slow growth conditions. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. v.38, n.2, p.165 - 171, 2015.

Benson, E. E. Cryopreservation of Phytodiversity: A Critical Appraisal of Theory & Practice. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 27, p.141–219, 2008.

Carvalho, J. M. F. C., e Vidal, M. S. Crioconservação no Melhoramento Vegetal. Campina Grande: Embrapa, 2003, 22p.

Cejas, I., Vives, K., Laudat, T., González-Olmedo, J., Engelmann, F., Martínez-Montero, M. E., Lorenzo, J. C. Effects of cryopreservation of *Phaseolus vulgaris* L. seeds on early stages of germination. *Plant Cell Rep*, v. 31, n. 11, p. 2065-2073, 2012.

Cejas, I., Méndez, R., Villalobos, A., Palau, F., Aragón, C., Engelmann, F., Carputo, D., Aversano, R., Martínez, M. E., Lorenzo, J. C. Phenotypic and Molecular Characterization of *Phaseolus vulgaris* Plants from Non-Cryopreserved and Cryopreserved Seeds. *American Journal of Plant Sciences*, v.4, p. 844-849, 2013.

- Chetverikova, E.P. Consequences of Plant Tissue Cryopreservation (Phenotype and Genome). *Biophysics*, v. 56, n. 2, p.309–315, 2011.
- Civatti, L. M., Marchi, M. N. G., Bellintani, M. C. Conservação de sementes de cactos com potencial ornamental armazenadas sob diferentes condições de umidade. *Gaia Scientia*, v. 9, n.2, p. 17-26, 2015. a
- Civatti, L. M., Marchi, M. N. G., Bellintani, M. C. Cryopreservation of cacti seeds of three ornamental species endemic to the state of Bahia, Brazil. *Seed Sci. & Technol.*, v. 43, p.284-290, 2015. b
- Dettke, G. A., e Milaneze-Gutierrez, M. A. Anatomia caulinar de espécies epífitas de Cactaceae, subfamília Cactoideae. *Hoehnea*. v. 35, n.4, p.583-595, 2008.
- Engelmann, F. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm - a review. *Euphytica*. v. 57, p.227-243, 1991.
- Engelmann, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant*. v. 47, n.1, p. 5-16, 2010.
- Engelmann, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant*. v.40, n. 4, p.427–433, 2004.
- Escobar, H. A. A., Villalobos, V. M. A., Villegas, A. M. *Opuntia* micropropagation by axillary proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. v. 7, p. 269-277, 1986.
- Estrada-Luna,, A. A., Martínez-Hernández, J. J., Torres-Torres, M. E., Chablé'-Moreno, F. *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*. v.117 p.378–385, 2008.
- Ferrari, E. A. P., Colombo, R. C., Faria, R. T., Takane, R. J. Cryopreservation of seeds of *Encholirium spectabile* Martius ex Schultes f. by the vitrification method. *Revista Ciência Agronômica*, v. 47, n. 1, p. 172-177, 2016.
- Ferreira, A. G. e Borgethi, F. Germinação do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323p.
- Flores, J., Jurado, E., Jiménez-Bremont, J. F. Breaking seed dormancy in specially protected *Turbinicarpus lophophoroides* and *Turbinicarpus pseudopectinatus* (Cactaceae). *Plant Species Biology*. v.23, p. 43-46, 2008.
- Flores, R., Uliana, S. C., Pimentel, N., Garlet, T. M. B. Sucrose and sorbitol on the *in vitro* conservation of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). *Journal of Biotechnology and Biodiversity*. v.4, n.3, p. 192-199, 2013.

- Fonseca, A. G., Matuda, J. J., Almeida, J. O., Nunes, U. R., Machado, E. L. M. Qualidade fisiológica de sementes de *Pinus elliotti* Engelm. submetidas a diferentes métodos de armazenamento. *Cerne*. v. 18, n. 3, p. 457-463, 2012.
- Freitas, C., Carvalho, V., Nievola, C. C. Effect of sucrose concentrations on *in vitro* growth and subsequent acclimatization of the native bromeliad *Vriesea inlata* (Wawra) Wawra. *Revista Biotemas*. v.28, n.3, p. 37-42, 2015.
- Jaganathan, G.K., Wu, G.R., Song, X.Y., Liu, B.L. Cryopreservation of dormant *Prunus armeniaca* L. seeds. *Seed Sci. & Technol.*, v.43, 1-11, 2015.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., Donoghue, M. J. *Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 612p.
- George, E. F., Hall, M. A., Klerk, G. *Plant Propagation by Tissue Culture. The Background*. 3ed. v.1. Dordrecht: Springer, 2008. 504p.
- Goettsch, B. et al. High proportion of cactus species threatened with extinction. *Nature Plants*. n. 15142, p. 1-7, 2015.
- Harding, K. The methylation status of DNA derived from potato plants recovered from slow growth. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. v.37, p.31-38, 1994.
- Higa, T. C., Paulilo, M. T. S., Benson, E. E., Pedrotti, E., Viana, A. M. Developing seed cryobank strategies for *Tabebuia heptaphylla* (Bignoniaceae), a hardwood tree of the brazilian south atlantic forest. *CryoLetters*. v.32, n.4, p.329-338, 2011.
- Kaviani, B., Abadi, D.H., Torkashvand, A.M., Hoor, S.S. Cryopreservation of seeds of lily [*Lilium Iedebourii* (Baker) Bioss]: Use of sucrose and dehydration. *African Journal of Biotechnology*. v.8, p. 3809-3810, 2009.
- Kerbauy, G. B. *Fisiologia Vegetal*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2004. 452 p.
- Lemos, E. E. P., Ferreira M. S., Alencar, L. M. C., Neto, C. E. R., Albuquerque, M. M. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v. 37, n. 10, p. 1359-1364, 2002.
- Lima- Brito, A., Albuquerque, M. M. S., Alvim, B. F.M., Resende, S. V., Bellintani, M. C. Santana, J. R. F. Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. *Ciência Rural*, v.41, n.8, 2011.
- Lipavská, H. e Vreugdenhil, D. Uptake of mannitol from the media by *in vitro* grown plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. v. 45, p.103-107, 1996.
- Lüthy, J. M., Lüthy, J. *The Cacti of CITES. Appendix I*. Switzerland: Bundesamt für Veterinärwesen. 2001, p. 47.

- Machado, M. C., Zappi, D. C., Taylor, N. P., Borba, E. L. Taxonomy and conservation of the *Discocactus* Pfeiff. (Cactaceae) species occurring in the state of Bahia, Brazil. *Bradleya*. v.23, p.41-56, 2005.
- Malda, G., Suza, H., Backhaus, R. *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae*. v.81, p. 71-87, 1999.
- Mahajan, S., Tuteja, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.444, p.139–158, 2005.
- Marchi, M.N.G. Viana, C. M., Civatti, L. M., Bellintani, M. C. Santana, J. R. F. et al. Seed cryopreservation of the native cacti *Discocactus zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* and *Stephanocereus luetzelburgii* from Bahia, Brazil. *African Journal of Biotechnology*. v.12, n.21, p.3250-3254, 2013.
- Michalak, M., Plitta, B. P., Tylkowski, T., Chmielarz, P., Suszka, J. Desiccation tolerance and cryopreservation of seeds of black poplar (*Populus nigra* L.), a disappearing tree species in Europe. *Eur J Forest Res.*, v. 134, p.53–60, 2015.
- Murashige, T., Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473–497, 1962.
- Nadel, B. L., Altman, A., Ziv, M. Regulation of somatic embryogenesis in celery cell suspensions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. v. 18, p.181-189, 1989.
- Nascimento, J.P.B., Vieira, D.C.M., Meiado, M. V. *Ex situ* seed conservation of brazilian cacti. *Gaia Scientia*.v. 9, n.2, p. 111-116, 2015.
- Pádua, J. G., Schwingel, L. C., Mundim, R. C., Salomão, A. N., Roverijósé, S. C. B. Germinação de sementes de *passiflora setacea* e dormência induzida pelo armazenamento. *Revista Brasileira de Sementes*, v.33, n. 1 p. 080 - 085, 2011.
- Pammenter, N. W., Berjak, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation tolerance mechanisms. *Seed Science Research*. v.9, p. 13-37, 1999.
- Perez-Molphe-Balch, E., Perez-Reyes, M. E., Rosa-Carrillo, M. L. In Vitro Conservation of *Turbinicarpus* (Cactaceae) Under Slow Growth Conditions. *Haseltonia*. v. 17, p.51-57, 2012.
- Perullo, N., Determann, R. O., Cruse-Sanders, J. M., G. S. Seed cryopreservation and micropropagation of the critically endangered species swamp pink (*Helonias bullata* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. v. 51, n. 3, p 284-293, 2015.
- Pilatti, F. K., Aguiar, T., Simões, T., Benson, E. E., Viana, A. M. In vitro and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant*. v. 47, p.82–98, 2011.

Ray, A. e Bhattacharya, S. Cryopreservation of *in vitro* grown nodal segments of *Rauvolfia serpentina* by PVS2 vitrification. *CryoLetters*, v. 29, n. 4, 321-328, 2008.

R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2013. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em 21 nov. 2013.

Resende, S. V. Micropropagação e conservação *in vitro* de *Melocactus glaucescens* Buining & Brederoo e *Melocactus paucispinus* G. Heimen & R. Paul (Cactaceae), espécies endêmicas da Bahia e ameaçadas de extinção. 2010. 140 f. Tese de doutorado (Doutorado em Botânica). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana 2010.

Salazar, A. Maschinski, J. Powell, D. *Ex-situ* Seed Conservation of Endangered Key Tree Cactus (*Pilosocereus robinii*). *J. Biodivers Endanger Species*. v.1, n.3, 2013.

Sakai, A. Kobayashi, S., Oiyama, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports*. v. 9, p. 30-33, 1990.

Santos, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. v. 12, p. 70-84, 2000.

Santos, M. C., Lédo, A. S., Lédo, C. A. S., Souza, F. V. D., Junior, J. F. S. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. *Revista Ciência Agronômica*, v. 42, n. 3, p. 735-741, 2011.

Santos, P. A. A., Paiva, R., Silva, L. C., Souza, A. C., Santana, M. C., Silva, D. P. C. Cryopreservation of the mangaba tree (*Hancornia speciosa* Gomes): a protocol for long-term storage. *Acta Scientiarum Agronomy*, v. 37, n. 3, p. 289-296, 2015

Sarasan, V. Conservation *in vitro* of threatened plants – progress in the past decade. *In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant*, v.42, p.206–214, 2006.

Sarkar, D., Chakrabarti, S. K., Naik, P. S. Slow-growth conservation of potato microplants: efficacy of ancymidol for long-term storage *in vitro*. *Euphytica*. v.117, p.133–142, 2001.

Schuppler, U., He, P., John, P. C. L. Munns, R. Effect of Water Stress on Cell Division and Cell-DivisionCycle 2-Like Cell-Cycle Kinase Activity in Wheat Leaves. *Plant Physiology*, v. 117, p. 667–678, 1998.

Silva, R. C., Camillo, J., Luis, Z. G., Scherwinski-Pereira, J. E. Potencial germinativo e morfoanatomia foliar de plântulas de pinhão-manso originadas de germoplasma criopreservado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.46, n.8, p.836-844, 2011.b

- Silva, M. W., Barbosa, L. G., Silva, J. E. S. B., Guirra, K. S., Gama, D. R. S., Oliveira, G. M., Dantas, B. F. Characterization of seed germination of *Zephyranthes sylvatica* (Mart.) Baker (Amarilidacea). *Journal of Seed Science*, v.36, n.2, p.178-185, 2014.
- Silva, S. R., Zappi, D., Taylor, N., Machado, M. Plano Nacional para Conservação das Cactáceas. Série Espécies Ameaçadas n° 24. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Diversidade, ICMBIO. 111p. 2011.a
- Srinivasan, S. Techniques to prevent cryopreservation damage in agriculture-a review. *International Journal of Universal Pharmacy and Life Sciences*, v.2, p. 41-47, 2012.
- Song-Quan, S., Berjak, P., Pammenter, N., Ntuli, T. M., Jia-Rui, F. Seeds recalcitrance: a current assessment. *Acta Botanica Sinica*. v.45, n.6, p.638-646, 2003.
- Steinitz, B. Sugar Alcohols Display Nonosmotic Roles in Regulating Morphogenesis and Metabolism in Plants that do not Produce Polyols as Primary Photosynthetic Products. *Journal of Plant Physiology*, v. 155. p. 1-8, 1999.
- Taylor, N., Zappi, D. Cacti: of Eastern Brazil. Richmond, Surrey: Royal Botanic Gardens, Kew, 2004. 499 p.
- Thompson, M. R., Douglas, T. J., Obata-Sasamoto, H., Thorpe, T. A. Mannitol metabolism in cultured plant cells. *Physiol Plant*. v.67, p.365-369, 1986.
- Trip, P., Krotkov G., Nelson, C. D. Metabolism of mannitol in higher plants. *Amer. Jour. Bot.* v.51, n. 8, p. 828-835, 1964.
- Tweddle, J. C., Dickie, J. B., Baskin, C. C., Baskin, J. M. Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. *Journal of Ecology*. v. 91, p. 294–304, 2003.
- Valledor, L., Hasbún, R., Meijón, M., Rodríguez, J. L., Santamaría, E., Viejo, M., Berdasco, M., Feito, I., Fraga, M. F., Cañal, M. J., Rodríguez, R. Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. v. 91, p.75–86, 2007.
- Veiga-Barbosa, L., González-Benito, M.E., Assis, J.G.A., Pérez-García, F. Germination and cryopreservation of several cactus species from NE Brazil. *Seed Science and Technology*, v.38, p.218-224, 2010.
- Vendrame, W. A., Carvalho, V. S., Dias, J.M.M. In vitro germination and seedling development of cryopreserved *Dendrobium* hybrid mature seeds. *Scientia Horticulturae*. v.114, p. 188–193, 2007.
- Vineesh, P.S., Skaria, R., Mukunthakumar, S., Padmesh, P., Decruse, S.W. Seed germination and cryostorage of *Musa acuminata* subsp. *Burmannica* from Western Ghats. *South African Journal of Botany*. v.100, p. 158–163,2015.

Vivian, R., Silva, A.A., Gimenes Jr. M., Fagan, E.B., Ruiz, S.T., Labonia, V. Dormência em sementes de plantas daninhas como mecanismo de sobrevivência – breve revisão. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v. 26, n. 3, p. 695-706, 2008.

Walters, C., Berjak, P., Pammenter, N., Kennedy, K., Raven, P. Preservation of Recalcitrant Seeds. *Science*. v. 339, p. 915-916, 2013.

Yun-peng, D. Wen-yuan, Li., Ming-fang, Z., Heng-bin, H., Gui-xia, J. The establishment of a slow-growth conservation system *in vitro* for two wild lily species. *African Journal of Biotechnology*. v.11, n.8, p. 1981-1990, 2012.

CAPÍTULO 03

MULTIPLICAÇÃO *in vitro* E ESTABILIDADE GENÉTICA DE *Stephanocereus luetzelburgii*, ESPÉCIE ENDÊMICA DA BAHIA E COM POTENCIAL ORNAMENTAL

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para a multiplicação *in vitro* bem como analisar o efeito de ciclos de multiplicação na manutenção do potencial morfológico e da estabilidade fenotípica e genotípica de mudas propagadas *in vitro* de *Stephanocereus luetzelburgii*. Para tanto, segmentos longitudinais do cladódio de plantas estabelecidas *in vitro* foram cultivados em meio Murashige e Skoog (1962) suplementado com diferentes concentrações de ácido naftalenoacético (ANA: 0,00; 2,68; 5,37 μM) e cinetina (KIN: 0,00; 11,61; 23,23; 34,84; 46,47 μM) isoladas ou combinadas entre si. Além disso, foi realizada análise histológica a fim de averiguar as desordens morfológicas associadas a brotos hiperídricos. Uma vez estabelecido o melhor tratamento para multiplicação *in vitro*, as plantas foram submetidas a ciclos de multiplicação por quatro gerações sucessivas. Brotos e suas respectivas plantas mãe foram avaliados quanto à estabilidade genética por meio de marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*). Não houve interação significativa entre os reguladores analisados e nenhuma combinação entre os reguladores excedeu o controle na indução de brotos laterais da espécie. Por outro lado, houve interação significativa entre os reguladores e a hiperidricidade. Elevadas concentrações de citocinina associadas às concentrações de auxina testadas aumentaram significativamente a frequência de brotos hiperídricos. Brotos normais apresentaram 100% de sobrevivência após a aclimatização enquanto brotos hiperídricos apresentaram dessecação em condições de baixa umidade e não sobreviveram após a transferência para condição *ex vitro*. A multiplicação de cinco genótipos da espécie ao longo de quatro gerações de cultivo *in vitro* manteve o potencial regenerativo e foi influenciada pelo genótipo. A análise da estabilidade genética via marcadores ISSR demonstrou que os brotos derivados da quarta geração de cultivo apresentavam elevado percentual de similaridade em relação às plantas mãe.

PALAVRAS-CHAVE: aclimatização; cultura de tecidos; hiperidricidade; marcadores moleculares; variação somaclonal.

ABSTRACT

The aim of this study was to establish a protocol for the *in vitro* multiplication and analyze the effect of multiplication cycles in maintaining morphogenetic potential and phenotypic and genotypic stability of plants propagated *in vitro* *Stephanocereus luetzelburgii*. Longitudinal segments of the plant cladodes established *in vitro* were cultured on Murashige and Skoog (1962) medium supplemented with different concentrations of naphthaleneacetic acid (NAA 0.00; 2.68; 5.37 μ M) and kinetin (KIN: 0.00 ; 11.61; 23.23; 34.84; 46.47 μ M) isolated or in combination. In addition, histologic analysis was performed to determine the morphological disorders associated with hiperídricos shoots. Once established the best treatment for *in vitro* propagation, the plants were transplanted for four successive generations. Shoots and their mother plants were evaluated for genetic stability through ISSR markers. There was no significant interaction between regulators analyzed and any combination of regulators exceeded the control in the induction of side shoots in the species. Moreover, there was a significant interaction between regulators and vitrification. High cytokinin concentrations associated with auxin concentrations tested significantly increased the frequency of hiperídricos shoots. Normal shoots showed 100% survival after acclimatization while hiperídricos shoots showed desiccation in low humidity conditions and did not survive after transfer. The multiplication of five genotypes of the species over four generations *in vitro* culture and maintained the regenerative potential was specific genotype. The analysis of genetic stability via ISSR showed that the derived shoots of the fourth generation cultivation had a high percentage of similarity in relation to the mother plant.

KEYWORDS: acclimatization; molecular markers; somaclonal variation; tissue culture; vitrification.

INTRODUÇÃO

A micropropagação é a aplicação mais prática da cultura de tecidos vegetais (Grattapaglia e Machado, 1998) e pode ser utilizada como estratégia para superar as dificuldades associadas à propagação de muitas espécies de cactos que apresentam sementes dormentes ou baixas taxas de germinação, auto-esterilidade, crescimento lento, ou ainda que necessitam de muitos anos para amadurecer (Clayton et al. 1990; Elias et al. 2014). Desta forma, a propagação artificial apresenta um elevado potencial para a produção comercial de culturas econômicas (Sharma et al. 2011) e contribui para reduzir as pressões externas nas populações selvagens de espécies raras e ameaçadas de extinção (Malda et al. 1999). Os protocolos aplicados com fins comerciais devem atender a três requisitos: uniformidade do material multiplicado, relação custo-benefício em comparação com os métodos tradicionais e a falta de mutações substanciais ou alterações epigenéticas permanentes (Lema-Ruminska e Kalus, 2014).

A estabilidade genética é importante durante a propagação *in vitro* (Fan et al. 2013) uma vez que assegura a uniformidade das culturas e garante a manutenção de características morfológicas desejáveis, sobretudo para espécies com potencial ornamental. No entanto, a cultura de tecidos vegetais é mutagênica e causa variações genéticas e epigenéticas (Khattab et al. 2014). A variação somaclonal pode ser definida como a variação encontrada em plantas derivadas da cultura de tecidos vegetais (Larkin e Scowcroft, 1981). Fatores como o método usado para propagação, tipo de tecido ou material vegetal inicial, tipo e a concentração de reguladores vegetais e efeito do estresse e genótipo, podem contribuir para a origem desta variação (Bairu et al. 2011). Além disso, o número e a duração de subculturas também podem ter efeitos indesejáveis quando o objetivo é a estabilidade do material propagado. Segundo

Sahijram et al. (2003) a frequência da variação é elevada à medida que o número de ciclos de multiplicação aumentam. Alguns estudos têm demonstrado que a variação somaclonal aparece após a quinta subcultura numa frequência de 1,3% e aumenta para 3,8% depois do décimo primeiro subcultivo (Rodrigues et al. 1998). A inexistência de um padrão com relação ao número de subculturas que cada espécie pode ser submetida sem comprometer a sua estabilidade genotípica sugere um possível efeito do genótipo na aquisição de variação somaclonal ao longo dos subcultivos (Bairu et al. 2011).

Especialmente no caso de plantas comerciais, é necessário estabelecer um sistema de micropropagação que produza plantas geneticamente iguais e estáveis (Khatab et al. 2014). Assim, faz-se necessário uma avaliação das plantas micropropagadas e de o seu estado clonal para conservar os recursos genéticos vegetais das espécies (Sharma et al. 2011). Neste contexto, a utilização de marcadores morfológicos ou de isoenzimas apresenta algumas limitações como o número limitado, a baixa herdabilidade e a expressão tardia de caracteres fenotípicos (Sharma et al. 2011). Assim, ferramentas moleculares parecem ser mais confiáveis para a avaliação de variações provenientes do cultivo *in vitro* (Leroy et al. 2001).

Marcadores moleculares têm sido utilizados como detector de variação somaclonal nas culturas (Larkin e Scowcroft 1981; Sahijram et al. 2003) inclusive para algumas espécies de cactáceas (Resende et al. 2010; Fan et al. 2013; Hua et al. 2014; Khatab et al 2014; Silva, 2014). O *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) são segmentos de DNA que são flanqueados em ambas as extremidades por sequências microssatélites (SSRs) (Ng e Tan, 2015). Segundo Reddy et al. (2002) o ISSR combina a maioria das vantagens do polimorfismo do comprimento do fragmento amplificado (AFLP) a universalidade do DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD). Algumas

vantagens associadas à utilização deste marcador estão no fato de serem reproduzíveis, simples, rápidos e necessitarem de uma pequena quantidade de DNA (Reddy et al. 2002; Bhatia et al. 2011; Ng e Tan, 2015). Além disso, não é necessária informação prévia sobre a seqüência de DNA, os polimorfismos são produzidos em grande número (Leroy et al. 2001; Ng e Tan, 2015) e são eficientes em distinguir genótipos estreitamente relacionados (Reddy et al. 2002). Conseqüentemente, esse marcador tem sido freqüentemente utilizado para a análise da fidelidade genética de plantas regeneradas *in vitro* (Khattab et al. 2014; Silva, 2014; Fan et al. 2013; Bhatia et al. 2009).

Além da estabilidade genética a manutenção do potencial morfogênético das culturas é outro fator que pode limitar a eficiência de um sistema de propagação artificial. A perda do potencial morfogênético à medida que o número de subculturas aumentam é comum (Chaturvedi e Jain, 1994) e causa desvantagem na utilização da cultura de tecidos para a produção *in vitro* de plantas (Rubluo et al. 2002). Até o momento um único trabalho avaliou a manutenção do potencial morfogênético de cactos ao longo do tempo (Rublo et al. 2002) o que evidencia a necessidade de estudos neste aspecto.

Stephanocereus luetzelburgii é uma espécie de cacto endêmica da Bahia, solitário, muitas vezes não ereto, mas \pm inclinado para o oeste, inconfundível com seu caule em forma de garrafa (Taylor e Zappi, 2004) e que apresenta potencial ornamental. Estudos com relação à propagação desta espécie se restringem apenas a criopreservação de sementes (Marchi et al. 2013).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para a multiplicação *in vitro* bem como analisar o efeito de ciclos de multiplicação na

manutenção do potencial morfogênético e da estabilidade fenotípica e genotípica de mudas propagadas *in vitro* de *Stephanocereus luetzelburgii*.

MATERIAL E MÉTODOS

Multiplicação in vitro

Para indução da multiplicação *in vitro* de *Stephanocereus luetzelburgii* foram utilizadas plantas oriundas da coleção *in vitro* desta espécie localizada no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal da Bahia (LCTV – UFBA). As plantas foram estabelecidas *in vitro* através da germinação de sementes e cultivadas em meio MS (Murashigue e Skoog, 1962) com metade das concentrações salinas (MS/2), suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose e 6,5 g L⁻¹ de agar. Após a remoção do ápice das plantas, segmentos longitudinais do cladódio, com aproximadamente 5-6 mm de comprimento, foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS suplementado com diferentes concentrações de ácido naftalenoacético (ANA: 0,00; 2,68; 5,37 µM) e cinetina (KIN: 0,00; 11,61; 23,23; 34,84; 46,47 µM) isoladas ou combinadas entre si. Os meios nutritivos foram suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose e gelificados com 6,5 g L⁻¹ de agar e, depois de ajustado o pH para 5,6 - 5,8, foram autoclavados por 15 minutos a 121°C. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 5 x 3 (concentrações de cinetina x concentrações de ANA) com cinco repetições de seis plantas cada. Ao final de três meses de cultivo *in vitro* foram analisadas as variáveis número de brotos/explante e percentual de brotos hiperídricos (%).

Uma vez estabelecido o melhor tratamento para multiplicação (meio MS isento de regulador vegetal) os brotos e suas respectivas plantas mãe foram selecionados e foi

dados início a um ciclo multiplicação que consistiu em propagar todos os brotos obtidos a cada geração, levando-se em consideração a planta mãe inicial. Para tanto, o ápice de cada broto foi mantido em um meio nutritivo para regeneração (Resende, 2010) e a região basal foi utilizada para a multiplicação propriamente dita. Foram selecionadas cinco plantas (P1, P2, P3, P4 e P5) derivadas do experimento de multiplicação. O primeiro experimento de multiplicação durou 90 dias e os demais 120 dias. Por conta do tempo de cultivo inferior, os brotos da F1 apresentaram um tamanho reduzido e passaram por uma fase de alongamento, cuja duração foi de 30 dias. Ao final de cada ciclo de multiplicação o número de brotos/explante foi contabilizado.

Condições de cultura

As unidades experimentais foram mantidas em sala de crescimento a $25 \pm 3^\circ\text{C}$ sob luz branca fluorescente ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e 16h de fotoperíodo.

Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro Wilk e foram analisados por meio do Modelo Linear Generalizado (GLM). Quando verificado efeito significativo ($p < 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste Tukey, a 5%. As análises foram realizadas no Programa R (R Core Team, 2013).

Aclimatização

Brotos multiplicados *in vitro*, normais e hiperídricos, derivados de diferentes tratamentos, foram utilizados para a aclimatização. Para tanto, os brotos foram retirados do explante, lavados em água corrente e semeados em copos plásticos de 50 mL contendo areia e terra vegetal (1:1). Não foi realizada a etapa previa de enraizamento

em virtude de ser desnecessária para a aclimatização desta espécie (Marchi, 2012). Em seguida, foram transferidos para casa de vegetação onde permaneceram por pelo menos 30 dias. Foram utilizados 20 brotos por tratamento. Ao final deste período foi analisado o percentual de sobrevivência.

Análise histológica

Brotos normais e hiperídricos derivados da multiplicação *in vitro* foram utilizados para análise histológica. As amostras foram fixadas em FAA₇₀ (formaldeído, ácido acético e etanol 70%, 1:1:18, v/v) (Johansen, 1940) por no mínimo 24 horas, a fim de estabilizar os componentes celulares e paralisar tanto os processos vitais quanto a autólise (Kraus e Arduin, 1997). Após a fixação, as amostras foram emblocadas em resina histológica sintética (Leica historesin). Para tanto, as amostras foram submetidas à desidratação em série etílica crescente (álcool 70, 80, 90 e 100%) por uma hora na primeira concentração e duas horas nas seguintes; pré-infiltração em álcool 100% e resina pura (1:1) por duas horas e posterior infiltração em resina ativada por no mínimo 24 horas em ambiente refrigerado. Todas as etapas seguiram as instruções do fabricante. Para a obtenção dos cortes histológicos, as amostras foram montadas em histomoldes de polietileno 6x9mm contendo resina de inclusão (resina ativada + endurecedor) e, imediatamente levadas à estufa a 50 °C para endurecimento. As amostras incluídas em resina foram seccionadas em micrótomo rotativo (Thermo scientific – HM 325) obtendo-se secções transversais de 5 µm de espessura. Em seguida, as lâminas foram coradas com azul de toluidina 0,05% (O'Brien et al. 1965) por 5 minutos e lavadas em água corrente. As lâminas foram montadas em meio permanente com resina sintética Entellan®. A visualização e os registros fotográficos ocorreram em microscópio óptico

Axio Scope A1 com câmera digital Cannon acoplada utilizando software AxioVision Release versão 4.8.2.

Extração de DNA

Para extração de DNA foi utilizado segmentos do cladódio de plantas derivadas de ápices regenerados de aproximadamente 5 cm. Após a retirada dos espinhos, foram feitos cortes longitudinais delgados para reduzir a utilização de tecidos parenquimáticos dotados de elevadas concentrações de carboidratos. O DNA total foi extraído usando o protocolo CTAB (*cetyl trimethyl ammonium bromide*) adaptado de Doyle e Doyle (1987) para microtubos. Em virtude da elevada mucilagem presente no tecido macerado, o DNA foi purificado utilizando acetato de amônia (Patrocínio, E., comunicação pessoal). Para tanto, foi adicionado a 50 µL do DNA extraído 550 µL de tampão TE por 1h a temperatura ambiente e, posteriormente, 200 µL de acetato de amônio a 7,5 M em gelo por 15 min. Após a centrifugação por 10 min a 8000 rpm, foi retirado o sobrenadante e, ao mesmo foi adicionado 800 µL de etanol absoluto gelado. As amostras foram incubadas por uma hora a -20°C. Posteriormente, foram centrifugadas por 10 min a 12000 rpm, a parte líquida foi escoada e o DNA foi submetido a lavagem com etanol 70% para eliminar os resíduos de sais presentes. Após a extração e purificação, a quantidade e qualidade de DNA foram analisadas por meio de espectrofotômetro L-Quant[®] e em gel de agarose a 1%. As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C.

Amplificação por ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)

As reações de amplificação do marcador ISSR foram realizadas em volume de 20 µl contendo tampão de reação 1X; 2,5 mM de MgCl₂; 7,5 pmol de primer; 0,2 mM

de dNTPs; 1U de Taq polimerase (Phoneutria®), água ultrapura e 1 µL de DNA genômico (10-15 ng). Um controle negativo foi adicionado a fim de verificar a ausência de contaminação. Foram testados 20 *primers* ISSR descritos por Wolfe et al. (1998) em uma subamostra composta por três indivíduos da coleção escolhidos aleatoriamente. Destes foram selecionados cinco *primers* com base no potencial para reprodutibilidade e clareza das bandas (Tabela 1). A amplificação dos fragmentos iniciou-se com um ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 1 min. e 30 seg., seguido de 35 ciclos que consistiram de três etapas: desnaturação a 94°C por 40 seg., anelamento dos *primers* a 44° (*primer* 844), 46° (*primer* JONHN e 899) e 47° (*primers* MAO e OMAR) por 40 segundos e extensão a 72°C por 1 min. 30 seg. Por fim, foi realizado um ciclo final de 94°C por 45 seg., 44°C por 45 seg., e 72°C por 7 min. Após a amplificação, os produtos de ISSR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% em tampão tris-EDTA (TAE) 1X. As amostras foram coradas com GelRed® e os géis foram fotodocumentados com programa Wise Capture II versão 1.0.0.0 em transluminador de luz UV.

Tabela 01: *Primers* de ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) utilizados para análise da estabilidade genética ao longo de ciclos de multiplicação *in vitro* de *Stephanocereus luetzelburgii*.

<i>Primer</i>	Sequência	Referência
MAO	(CTC)4-RC	Wolfe et al. (1998)
OMAR	(GAG)4-RC	Wolfe et al. (1998)
JONH	(AG)7-YC	Wolfe et al. (1998)
899	(CA)6-RG	Wolfe et al. (1998)
844	(CT)8-RC	Wolfe et al. (1998)

Análise dos dados

O perfil genético dos indivíduos utilizados foi determinado através da análise comparativa dos géis de cada *primer*. Para tanto, este perfil foi convertido em uma matriz presença e ausência de bandas (0 e 1). A análise fenética foi realizada no programa Past (Hammer et al. 2001) e a variação genética entre os indivíduos foi estimada através do coeficiente de similaridade de Jaccard (Jaccard, 1912). Posteriormente foi calculado o valor de similaridade média, máxima e mínima e o percentual de brotos com variação somaclonal entre a planta mãe e os regenerantes da última geração de cultivo de cada genótipo analisado.

RESULTADOS

Multiplicação in vitro

A diferenciação dos brotos axilares de *Stephanocereus luetzelburgii* iniciou-se após a terceira semana de cultivo (Figura 01 A). Todos os brotos foram obtidos via organogênese direta através da ativação das aréolas, meristemas laterais típicos das cactáceas (Figura 01 A) e cada aréola originou apenas um broto. As diferentes concentrações e combinações de reguladores vegetais não foram significativas para aumentar o percentual de brotos/explante (Tabela 02). O tratamento controle apresentou 2,09 brotos/explante e não diferiu significativamente dos demais (Tabela 02).

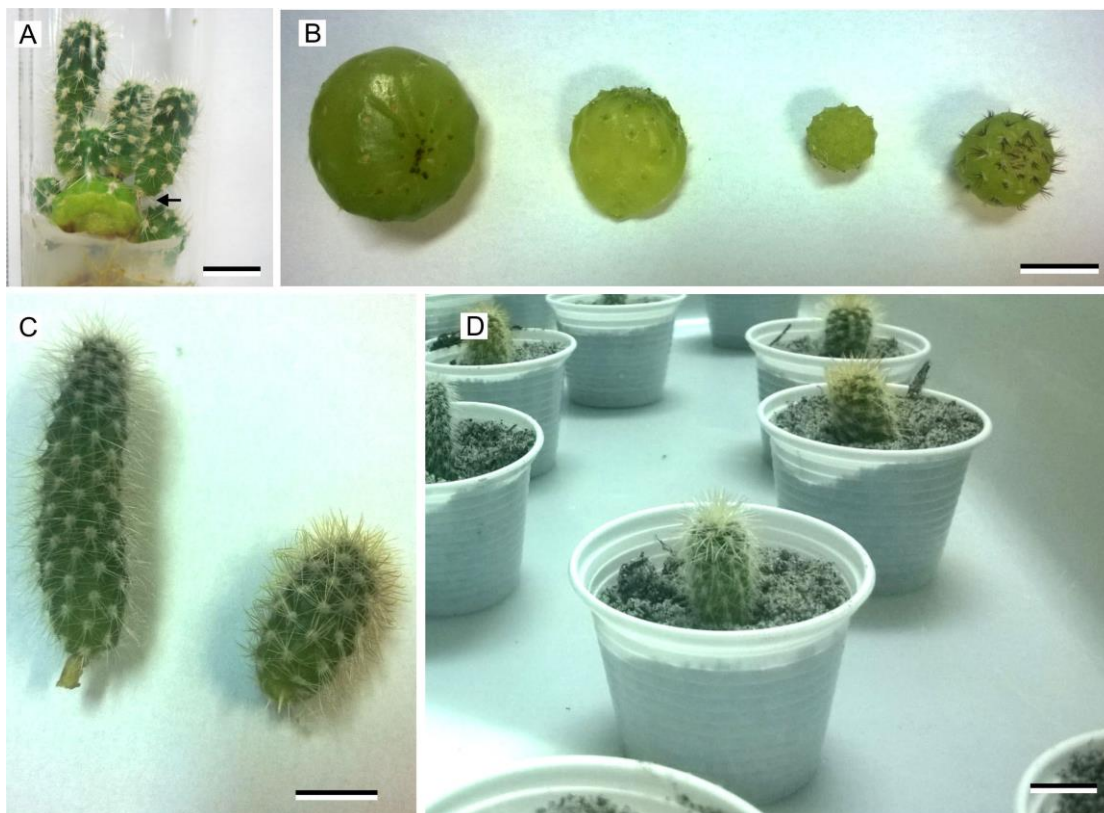


Figura 01. Multiplicação *in vitro* de *Stephanocereus luetzelburgii*. Organogênese direta de brotos axilares mediante a ativação das aréolas (A). Aspectos morfológicos de brotos hiperídricos (B) e normais (C). Aclimatização de brotos em substrato areia e terra vegetal (D). Barras: 1 cm.

Para a variável hiperidricidade (Tabela 02) houve interação significativa entre os fatores ($p=0,0007927$). De modo geral, o aumento das concentrações de cinetina associadas à presença de ANA favoreceu a ocorrência de brotos hiperídricos em *S. luetzelburgii* (Tabela 02, Figura 01 B) cujo percentual máximo obtido foi 70% (Tabela 02).

Os brotos normais após a transferência para condição *ex vitro* apresentaram 100% de sobrevivência. Todos os brotos hiperídricos aclimatizados independente do

tamanho (Figura 01 B), não sobreviveram por mais de 30 dias em condições *ex vitro*. Os brotos menores não resistiram logo após a primeira semana de transferência.

Tabela 02: Efeito de diferentes concentrações de cinetina (KIN) e de ácido naftalenoacético (ANA) no número de brotos/explante e brotos hiperídricos (%) de *Stephanocereus luetzelburgii*.

KIN (μM)	ANA (μM)			Média geral
	0,00	2,68	5,37	
Brotos/Explante				
0,00	2,09aA	2,73 aA	1,63 aA	2,15
11,61	2,24aA	2,16 aA	2,23 aA	2,21
23,23	1,80aA	2,30 aA	2,13 aA	2,07
34,84	2,13aA	2,83 aA	2,73 aA	2,56
46,47	2,56 aA	2,93 aA	2,30 aA	2,60
Média Geral	2,16	2,59	2,20	
Brotos hiperídricos (%)				Média Geral
0,00	13aA	14bA	10bA	12
11,61	0aB	53aA	55aA	36
23,23	0aB	41abA	65aA	35
34,84	8aB	70aA	45aA	41
46,47	3aB	35abA	29abA	22
Média Geral	10	47	68	

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($p > 0,05$).

A análise anatômica revelou que brotos normais e hiperídricos apresentam células globosas com paredes finas e espaços intercelulares, sobretudo nas células parenquimáticas (Figura 02). Foi possível observar no broto normal lise celular em algumas células parenquimáticas (Figura 02 A).

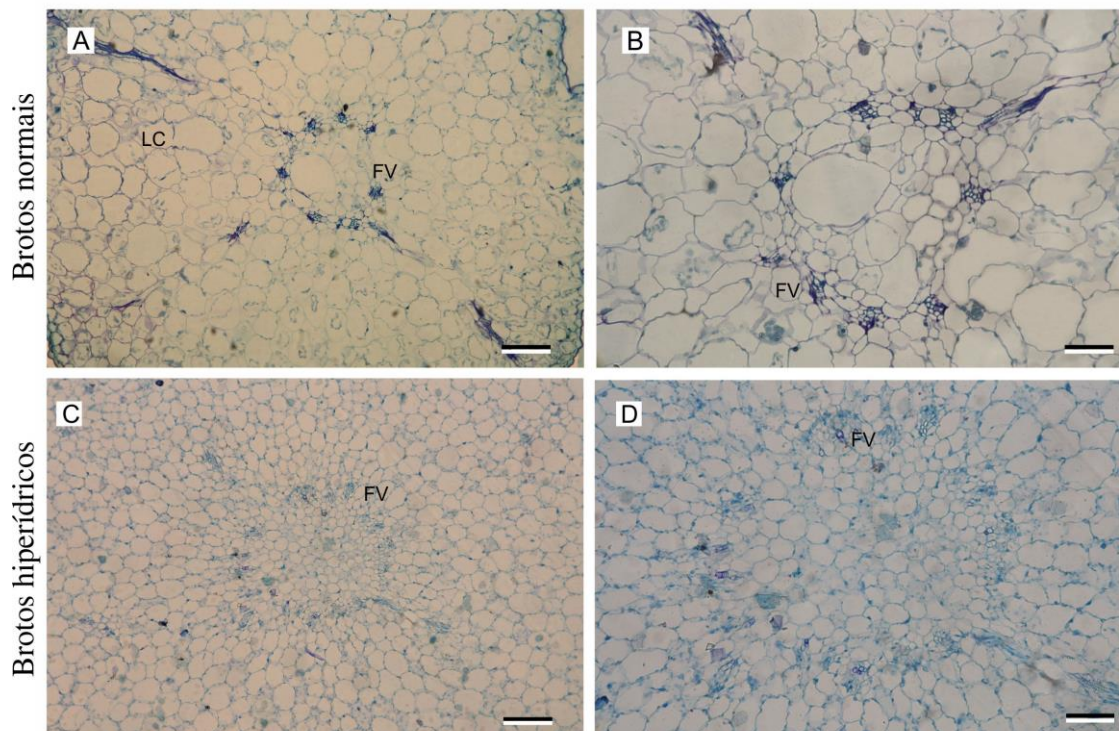


Figura 02. Análise histológica de brotos normais (A e B) e hiperídricos (C e D) derivados da multiplicação *in vitro*. Lise celular (LC) e feixes vasculares (FV) Barras: A: 200 μm ; B: 100 μm ; C: 200 μm e D: 50 μm .

Os brotos hiperídricos apresentaram feixes vasculares menos definidos, mais desordenados e apresentaram menos elementos de xilema que os normais (Figura 02 C e D). A análise histológica em brotos normais apresentou ainda plexos vasculares (Figura 03 A) que irão vascularizar as gemas laterais, com provável origem nas células do periciclo. Em detalhe é possível analisar anatomicamente as aréolas dos cactos (Figura 03 B), compostas por células pequenas, isodiamétricas e com conteúdo citoplasmático denso, características típicas de células meristemáticas, que irão dar origem aos espinhos (Figura 03 B) e aos brotos, por organogênese direta (Figura 01 A).

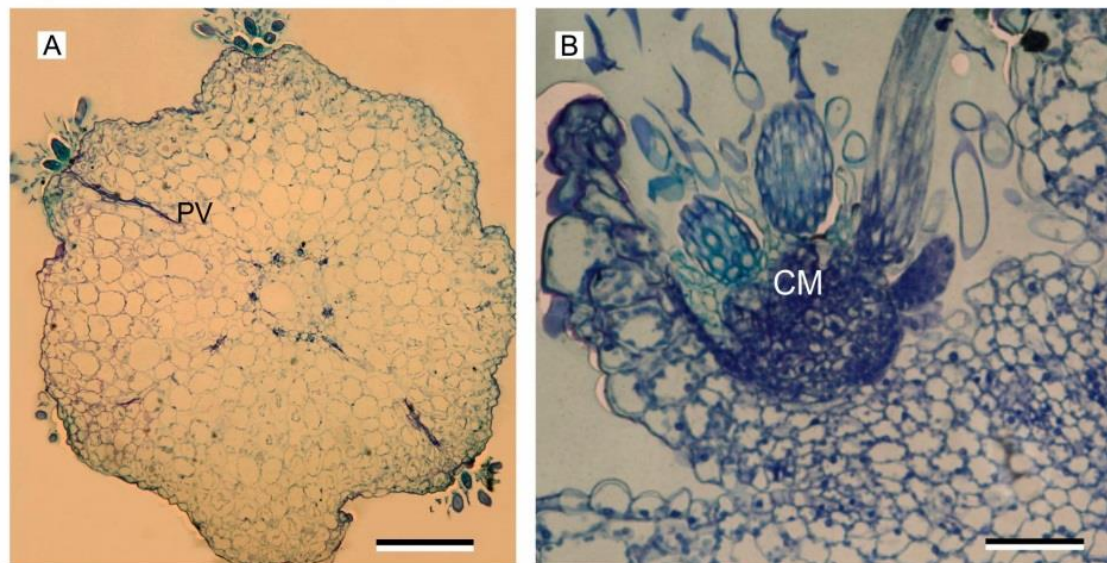


Figura 03. Formação de plexos vasculares em seção transversal do cladódio de brotos normais (A) e aréolas com espinhos em desenvolvimento formadas por células meristemáticas (B). Plexos vasculares (PV) e células meristemáticas (CM). Barras: A: 500 μm ; B: 100 μm .

A eficiência da multiplicação ao longo das gerações de cultivo foi genótipo específica. Todos os genótipos analisados aumentaram progressivamente em número, exceto o P1 (Tabela 03). Isso pode ser evidenciado pelo aumento do número de brotos/explante do primeiro para o último ciclo de subcultura. Enquanto na primeira subcultura o número máximo de brotos/explante foi 2,93 (Tabela 02) na última geração os genótipos 2, 3, 4 e 5 apresentaram 3,69, 3,40, 5 e 5,6 brotos/explante, respectivamente (Tabela 03). Por outro lado, a planta mãe 1 apresentou uma redução desta variável. Na quarta geração houve apenas 1,33 brotos/explante formados, valor inferior ao obtido no primeiro subcultivo.

Além do aumento no potencial regenerativo, o aumento dos subcultivos foi inversamente proporcional ao tempo necessário para início da diferenciação das plantas. A partir do terceiro subcultivo observou-se que a diferenciação em brotos axilares foi abreviada de três para duas semanas após a inoculação dos explantes.

A única variação morfológica verificada foi à presença de brotos hiperídricos.

Tabela 03. Número de brotos/explante *Stephanocereus luetzelburgii* em cinco genótipos (P1, P2, P3, P4 e P5) multiplicados ao longo de quatro gerações de cultivo (F1, F2, F3 e F4).

Genótipos analisados	Gerações			
	F1	F2	F3	F4
P1	1,0	1,33	1,25	1,33
P2	3,50	3,43	3,70	3,69
P3	3,37	3,89	3,12	3,40
P4	2,0	2,8	4,60	5,0
P5	2,77	2,33	4,95	5,60

Estabilidade genética via marcadores ISSR

Vinte *primers* ISSR foram testados em reações de PCR com o DNA genômico da planta mãe (PM1, PM2, PM3, PM4 e PM5), selecionada no experimento de multiplicação, e seus respectivos clones. Destes, cinco primers (Tabela 1) obtiveram padrão de amplificação distinto e reproduzível e, portanto, foram utilizados para a

análise posterior de 42 indivíduos após quatro subculturas que ocorreram ao longo de três anos.

Um total de 26 *loci* apresentaram bandas não ambíguas, que variaram de 320 a 1450 pares de bases (pb) de tamanho. O número de bandas/primer variou de 3 (OMAR) a 8 (MAO), com uma média de 5,2 bandas/*primer*. Dos cinco genótipos analisados dois apresentaram variação em relação a planta mãe. Quatro clones apresentaram bandas polimórficas, um do genótipo 5 (clone 5.1) e três do genótipo 3 (clones 3.6, 3.7 e 3.8). A menor similaridade encontrada neste trabalho, 92%, encontrada no genótipo 5 (Tabela 03) está relacionada à presença de duas bandas polimórficas obtida nos *primers* OMAR (610pb) e 899 (650pb). Os clones 3.6, 3.7, e 7.8 apresentaram uma banda polimórfica cada, todas para o primer 899 (1450 pb).

Tabela 03. Similaridade máxima e mínima entre a planta mãe e regenerantes (S), similaridade média (SM) e porcentagem de variação somaclonal em brotos (VSB) de *Stephanocereus luetzelburgii* derivados da quarta geração de cultivo *in vitro* utilizando o marcador molecular ISSR.

Parâmetros avaliados	Genótipos				
	P1	P2	P3	P4	P5
Maior S(%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Menor S(%)	100,0	100,0	96,0	100,0	92,0
SM (%)	100,0	100,0	98,1	100,0	98,4
VSB (%)	0	0	33,33	0	11,11

O coeficiente de similaridade de Jaccard (Jaccard, 1912) variou de 92-100% entre a planta mãe e os regenerantes (Tabela 03). O maior percentual de brotos com variação somaclonal ocorreu no genótipo 3, 33% (Tabela 03).

DISCUSSÃO

Multiplicação in vitro

Resultados similares ao início da diferenciação de brotos foram obtidos para *Hylocereus costaricensis* (Viñas et al. 2012), *H. undatus* (Fan et al. 2013) e *Opuntia ficus indica* (Angulo-Bejarano e Paredes Lopez, 2011). No entanto, para pitaya (*H. costaricensis*) a emergência de múltiplos brotos iniciou-se após 10 dias de cultura na melhor concentração de regulador testada. Para esta última espécie os resultados demonstraram ainda que produção de dois ou três brotos por aréola, apesar de aumentar significativamente a produção, não foi satisfatória uma vez que os mesmos apresentavam morfologia anormal e necrose no ápice (Viñas et al. 2012). Segundo Hua et al. (2014) uma elevada produção de brotos nem sempre é satisfatória e pode levar a variação somaclonal.

A síntese de hormônios endógenos durante o cultivo *in vitro* (Hubstenberger et al. 1992) pode justificar a similaridade do tratamento controle para aqueles suplementados com reguladores para *S. luetzelburgii* (Tabela 02). Valores equivalentes para a variável número de brotos/explante foram obtidos para *Selenicereus megalanthus*, *Hyloreceus polyrhizus*, (Román et al. 2014; Hua et al. 2014) e *Cereus hildmannianus* (Langer e Mergener, 2013). No entanto, *Pilosocereus robinii* (Khattab et al. 2014) e *Opuntia ficus indica* (El Finiti et al. 2013) obtiveram 30 e 17,26 brotos/explante em

concentrações ótimas de reguladores. Esses resultados salientam a necessidade em otimizar o número de brotos obtidos para esta espécie.

É possível que um balanço preciso de auxinas e citocininas ainda possibilite o aumento do potencial regenerativo para esta espécie. Para outros representantes da família os reguladores adicionados ao meio nutritivo foram efetivos na indução da organogênese. Para pitaya o número de brotos/explante aumentou significativamente à medida que houve incremento de diferentes tipos de citocinina como 6-benzilaminopurina (BAP), zeatina (ZT) e thidiazuron (TDZ) no meio nutritivo (Hua et al. 2014), além disso, a combinação de dois tipos de citocinina (cinetina e BAP) também potencializaram a produção de brotos nesta espécie (Román et al. 2014). Para *Opuntia ficus indica* não houve interação significativa entre auxinas e citocininas e apenas 5 mg L⁻¹ de BAP apresentou os melhores resultados (El Finiti et al. 2013). Zoghlami et al. (2012) ratificaram ainda que para esta espécie meios suplementados com BAP são mais eficientes que os suplementados com auxinas.

Baixos níveis de auxina em combinação com moderados a elevados níveis de citocinina também se mostraram eficientes na propagação de outras espécies de cactáceas (Cayton et al. 1990; Fan et al. 2013; Alves et al. 2013; Román et al. 2014). O tipo de citocinina também pode influenciar os resultados. Para *Pilosocereus robinii* entre os diferentes tipos de citocinina testadas, BAP, KIN e 2iP, o regulador mais eficiente na indução de brotos axilares foi a cinetina (Khattab et al. 2014). Por outro lado, para *Hylocereus undatus* quando as mesmas três classes de citocininas foram testadas a mais significativa foi o BAP (Fan et al. 2013).

A hiperidricidade, anteriormente chamada vitrificação, é considerada uma desordem fisiológica, bioquímica e morfológica decorrente do acúmulo anormal de

água no interior das células e tecidos (Vasconcelos et al. 2012). As plantas hiperídricas têm uma aparência vítrea, seus órgãos são de coloração translúcida, em alguns casos menos verdes, e facilmente quebráveis (Kevers et al. 2004; Park et al. 2004). A perda da coloração verde característica do cladódio de brotos normais (Figura 02 C) pode ser atribuída à diminuição do teor de clorofila (Park et al. 2004).

A hiperidricidade é consequência das condições de cultivo *in vitro*, que resultam, em última análise, em estresse oxidativo (Vasconcelos et al. 2012) como, por exemplo a composição química do meio de cultura (Palma et al. 2011). A ocorrência de brotos hiperídricos já foi relatada durante a micropropagação de algumas espécies de cactáceas (Giusti et al. 2002; Pérez-Molphe-Balch et al. 2002; Pérez-Molphe-Balch e Dávila-Figueroa, 2002; Santos-Días et al. 2003; Silva, 2014) e, geralmente, está associada a elevadas concentrações de reguladores vegetais, especialmente citocininas (Quiala et al. 2009; Khattab et al. 2014). O aumento da concentração de citocinina também levou a um aumento proporcional na hiperidricidade em *Aloe polyphylla* (Ivanova e Staden, 2011).

Os reguladores vegetais não são os únicos fatores que contribuem para a hiperidricidade. Isso pode ser evidenciado pelo fato de brotos derivados do tratamento controle (Tabela 02) também apresentarem esta desordem morfológica (13%). Neste caso, outros fatores relacionados ao cultivo *in vitro* como a atmosfera dos frascos, que pode resultar em acúmulo de vapor de água, gás carbônico, etileno e um elevado índice de umidade relativa, concentração e tipo de agente gelificante no meio de cultivo, temperatura e luminosidade, também favorecem a hiperidricidade (Park et al. 2004; Palma et al. 2011; Ivanova e Staden, 2011; Vasconcelos et al. 2012).

As alterações morfológicas em plantas hiperídricas levam a importantes alterações fisiológicas, como desordens na taxa fotossintética, inibição da síntese de celulose e lignina e distúrbios nas concentrações e atividades de enzimas e fitormônios (Palma et al. 2011). Essas alterações podem resultar em redução na eficiência de vias metabólicas (Vasconcelos et al. 2012) e acarretar sérios problemas de desenvolvimento e adaptação da planta (Palma et al. 2011). Brotos hiperídricos apresentam menor formação de raízes, ou não enraízam e, em geral, não sobrevivem à aclimatização e, quando sobrevivem, originam plantas malformadas (Vasconcelos et al. 2012).

O sucesso no transplântio de brotos normais (Figura 2 C) também foi obtido para *Opuntia ficus indica* (Angulo-Bejarano e Paredes-Lopez, 2011; El Finiti et al. 2013), *Selenicereus megalanthus*, *Hylocereus polyrhizus* (Román et al. 2014; Hua et al. 2014), *H. undatus* (Fan et al. 2013) e *Pilosocereus robinii* (Khattab et al. 2014). A sobrevivência e o desenvolvimento normais de plantas regeneradas *in vitro* depende de um grande número de fatores tais como sistema radicular, vigor das plantas, duração e condições de aclimatização, dentre outras (El Finiti et al. 2013). Segundo Lema-Ruminska e Kulus (2014) o sucesso da transferência *ex vitro* de cactos e outras plantas CAM (metabolismo ácido das crassuláceas) pode ser atribuído ao fato de apresentarem uma cutícula fortemente desenvolvida e uma habilidade para reidratação rápida. Além disso, o próprio metabolismo CAM, a presença de um caule suculento anatomicamente constituído de parênquima aquífero e estruturas secretoras de mucilagem (Malda et al. 1999; Arruda et al. 2005) também podem contribuir para as elevadas taxas de sobrevivência obtidas.

De acordo com a análise anatômica tanto brotos normais quanto hiperídricos apresentam características típicas de plantas suculentas e que estão sob condição de

potencial hídrico elevado, como o ambiente *in vitro* (Figura 02). A lise celular observada em algumas células parenquimáticas (Figura 2A) pode ter sido ocasionada pela concentração excessiva de etileno.

O etileno é produzido durante a cultura *in vitro* de todos os tipos de células, tecidos e órgãos (George et al. 2008). Sua produção *in vitro* pode estar associada a produtos químicos adicionados ao meio nutritivo (George et al. 2008), condições de estresse (Taiz e Zeiger, 2004) e concentrações elevadas de auxina (Taiz e Zeiger, 2004; George et al. 2008). O aumento na produção do etileno pode ser resultado de um aumento na transcrição do mRNA da ACC sintase, enzima que catalisa a conversão de um precursor imediato deste hormônio (Taiz e Zeiger, 2004). O etileno interfere em diversas respostas morfogênicas *in vitro* como crescimento de calos, produção de brotos e raízes e embriogênese somática (Biddington, 1992). Além disso, seu acúmulo pode desencadear a morte de células localizadas entre a endoderme e epiderme resultante do aumento do conteúdo de enzimas, como celulase e a endotransglicosilase do xiloglucan (XET) que digerem as paredes celulares (Kerbaui, 2004).

Segundo Kevers et al. (2004) os feixes vasculares de plantas hiperídricas são poucos e não têm a disposição típica de uma sessão normal. Isso pode ter prejudicado a condução de água após a sua transferência para a condição *ex vitro*, causando dessecação dos brotos e, conseqüentemente, comprometido a sobrevivência das plantas. Além disso, a maioria dos estômatos de plantas hiperídricas não parece ter um mecanismo de abertura e fechamento característico (Kevers et al. 2004). Isso pode ser atribuído ao fato de seus estômatos apresentarem-se anormais e essas deformações podem resultar de mudanças estruturais nas células guarda, seguido por mudanças na composição da parede celular desta estrutura (Picoli et al. 2001). Desta forma, segundo Kevers et al.

(2004), problemas de funcionamento estomático, podem ser a principal causa de perda de água rápida e morte durante a aclimatização sob baixa umidade relativa (Kevers et al. 2004).

Outras características anatômicas relacionadas à hiperidricidade estão associadas à hipertrofia do córtex e da medula nos caules, células parenquimáticas hipertrofiadas e grandes espaços intercelulares (Kevers et al. 2004; Vasconcelos et al. 2012). Essas características apesar de estarem associadas a plantas hiperídricas em outras espécies, em *S. luetzelbrugii* foram encontradas em ambos os tipos de brotos, provavelmente por se tratar de uma planta suculenta cultivada em ambiente de elevado potencial hídrico.

A existência de plexos vasculares na secção transversal do cladódio das plantas (Figura 03 A) pode indicar um investimento para uma zona de regeneração. A estrutura celular das aréolas dos cactos corroboram os obtidos para *Mammillaria san-angelensis* cuja análise histológica desta estrutura revelou células de tamanho reduzido e em divisão ativa, seguida da formação brotos laterais (Rublo et al. 2002). No entanto, diferentemente deste trabalho, a ativação das aréolas em *M. san-angelensis* ocorreu apenas após a suplementação dos meios nutritivos com auxinas.

Segundo Bennici et al. (1997) o genótipo influencia a organogênese *in vitro* e para *Pfaffia glomerata* as respostas morfogênicas *in vitro* foram genótipo-dependentes (Flores et al. 2009). Culturas mantidas por um longo período *in vitro* muitas vezes perdem a sua capacidade de regeneração (Rublo et al., 2002) e isto pode estar relacionado a uma mudança na exigência do regulador vegetal (Chaturvedi e Jain, 1994). Os dados obtidos neste trabalho corroboram os encontrados para *M. san-angelensis*, onde o potencial morfogênético foi mantido pelos tecidos em culturas estabelecidas por sete anos, seja nos meios suplementados com auxinas ou isentos de

reguladores (Rublo et al. 2002). O aumento do tempo de cultura *in vitro* pode aumentar os níveis de citocinina endógena na porção basal do explante (Zaffari et al. 2000) e pode justificar o aumento no potencial regenerativo ao longo do tempo

A única variação morfológica encontrada neste trabalho foi a hiperidricidade de brotos. No entanto, essa desordem morfológica foi aleatória e parece ter sido causada pelo estresse em virtude do maior número de brotos/explante em um espaço reduzido e não necessariamente pelas subculturas realizadas até então. Uma evidência disso é que durante o ensaio de multiplicação (Tabela 01) o tratamento controle apresentou brotos hiperídricos.

Estabilidade genética via marcadores ISSR

O polimorfismo associado a marcadores ISSR pode resultar de mudança na seqüência do local de ligação do *primer* (mutações de ponto, por exemplo) ou mudanças que alteram o tamanho e previnem o sucesso da amplificação do DNA alvo, como inserções, deleções e inversões (Bhatia et al. 2009). O deslizamento da DNA polimerase durante a replicação do DNA (Leory et al. 2001) também pode causar variações genéticas durante o cultivo *in vitro*.

De acordo com o coeficiente de similaridade de Jacard os brotos e suas respectivas plantas mãe apresentam um elevado grau de fidelidade genética. Similarmente marcadores ISSR foram utilizados para analisar a estabilidade genética de brotos de *Hylocereus undatus* e suas respectivas plantas mãe após 15 ciclos de subcultura (Fan et al. 2013). Segundo os autores, padrões ISSR idênticos foram obtidos confirmando que o método estabelecido foi geneticamente confiável para a micropropagação e conservação de germoplasma nesta espécie. A utilização de

marcadores RAPD demonstrou que a cactácea *Opuntia ficus indica* também apresentou elevada taxa de similaridade, que variou de 91-100%, após cinco anos de cultura *in vitro* (Zoghلامي et al. 2012). A fidelidade genética de mudas de *Hylocereus* sp., cultivadas por 11 ciclos de subcultura, analisadas por meio do marcador *Start Codon Targeted* (SCoT), foi de 100% (Hua et al. 2015). Alterações cromossômicas também não foram detectadas durante o cultivo *in vitro* de *Mammillaria san-angelensis* subcultivadas durante sete anos (Palomino et al. 1999).

A maioria das variações somaclonais ocorrem em plantas regeneradas a partir de culturas que tenham sido submetidas a uma fase de diferenciação (Mohamed, 2007). Segundo Shenoy e Vasil (1992) meristemas organizados são geralmente imunes a mudanças epigenéticas ou a alterações genéticas permanentes (mutação) que ocorrem durante a divisão celular e a diferenciação *in vivo* e *in vitro*. Além disso, os tecidos meristemáticos mantêm estável o nível de ploidia em detrimento de células diferenciadas que podem sofrer endoreduplicação cromossômica e dar origem a subpopulações com níveis maiores de conteúdo de DNA (Palomino et al. 2009). Desta forma, a diferenciação de brotos axilares via organogênese direta através de meristemas laterais (aréolas) pode justificar a manutenção da estabilidade entre as plantas mãe e clones da quarta geração de cultivo. Por outro lado, a proliferação de brotos adventícios a partir de calos (organogênese indireta) ou a embriogênese somática podem oferecer mais riscos de variação somaclonal *in vitro* (Malda et al. 1999).

A utilização de meios nutritivos isentos de reguladores vegetais também pode ter contribuído para a elevada similaridade entre planta mãe e regenerantes da quarta geração. A análise da estabilidade genética de *Pilosocereus robinii* através de marcadores ISSR revelou que os explantes regenerados em meios suplementados com

TDZ apresentaram 13 bandas novas que apareceram com oito *primers* ISSR (Khattab et al. 2014).

Não foi verificada uma relação direta entre as variações morfológicas e os polimorfismos encontrados através de marcadores ISSR. Similarmente, não foi observada relação entre a variação morfológica entre os regenerantes e as alterações genéticas por meio de marcador ISSR em *Melocactus glaucescens* (Silva, 2014), *Picrorhiza kurroa* (Rawat et al. 2013) e *Ceropegia santapauli* (Chavan et al. 2014). Para *Cereus peruvianus*, os polimorfismos encontrados para marcadores RAPD também não refletiram o agrupamento informal de somaclones com fenótipos de brotos atípicos e típicos estabelecidos pelos autores (Resende et al. 2010). Na cultura de tecidos as mudanças genéticas ocorrem principalmente em regiões não codificantes que praticamente não afetam a expressão do gene, e, portanto o fenótipo e, mesmo se as mudanças ocorrem nas regiões de codificação, a probabilidade de mutação simultânea de dois alelos numa planta diplóide é extremamente baixo e tem pouco efeito sobre características fenotípicas (Rawat et al. 2013).

Segundo Silva (2014) outro fator que pode estar relacionado à variação somaclonal é a existência de genótipos mais suscetíveis às alterações genéticas. Similarmente ao utilizar marcadores RAPD para a cactácea *Opuntia ficus-indica* foi detectado que algumas cultivares propagadas *in vitro* apresentavam uma maior taxa de variação em relação a outras mais estáveis (Zoghلامي et al. 2012) No entanto, segundo Chinmayee et al. (2012) a ocorrência de variabilidade genética é aleatória e pode acontecer de forma independente inclusive entre os clones de um mesmo explante. Para a cactácea *Mammillaria san-angelensis* as alterações somaclonais detectadas foram induzidas de uma forma aparentemente aleatória (Palomino et al. 2009).

CONCLUSÕES

A multiplicação *in vitro* de *Stephanocereus luetzelburgii* é uma estratégia para maximizar a multiplicação desta espécie e pode ocorrer em meio MS isento de regulador vegetal, produzindo cerca de 2,09 brotos/explante. As associações entre citocininas e auxinas induziram a formação de brotos hiperídricos, que por sua foram incapazes de sobreviver *ex vitro*, provavelmente devido a alterações histológicas nos tecidos vasculares. A aclimatização e enraizamento de brotos normais ocorreram simultaneamente em condições *ex vitro* e apresentou 100% de sobrevivência. A multiplicação de cinco genótipos da espécie ao longo de quatro gerações sucessivas manteve o potencial morfogenético e a estabilidade genotípica demonstrando que o protocolo aplicado foi eficiente.

REFERÊNCIAS

- Alves, F. A. L., Soares, W. S.; Fernandes, Y. T. D., Rêgo, M. M. Efeito de benziladenina na regeneração de duas variedades de palma forrageira (*Opuntia* spp.). Scientia Plena. v.9, n.6, p.1-8, 2013.
- Angulo-Bejarano, P. I. e Paredes-López, O. Development of a regeneration protocol through indirect organogenesis in prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill). Scientia Horticulturae. v.128, n.3, p. 283–288, 2011.
- Arruda, E. Melo-de-Pinna, G. F., Alves, M. Anatomia dos órgãos vegetativos de Cactaceae da caatinga pernambucana. Revista Brasileira Botânica, v.28, n.3, p.589-601, 2005.
- Bairu, M. W., Aremu, A. O., Staden, J. V. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. Plant Growth Regulation, v.63, p. 147–17, 2011.
- Bennici, A., Grifoni, T., Schiff, S., Bovelli, R. Studies on callus growth and morphogenesis in several species and lines of *Amaranthus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v.49, p.29–33, 1997.

Biddington. N.L. The influence of ethylene in plant tissue culture. Horticulture Research. Plant Growth Regulation. v.11, p. 173-187, 1992.

Bhatia, R., Singh, K. P., Sharma, T. R., Jhang, T. Evaluation of the genetic fidelity of in vitro-propagated gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) using DNA-based markers. Plant Cell Tissue Organ Culture, v. 104, n.1, p. 131–135, 2011.

Bhatia, R., Singh, K. P., Jhang, T., Sharma, T. R. Assessment of clonal fidelity of micropropagated gerbera plants by ISSR markers. Scientia Horticulturae, v.119, p. 208-211, 2009.

Chaturvedi, H.C. e Jain, M. Restoration of regeneration potentiality in prolonged culture purpurea. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. v. 38, p. 73-75, 1994.

Chavan. J. J., Gaikwad, N. B., Umdale, S. D., Kshirsagar, P. R., Bhat, K. V., Yada, S. R. Efficiency of direct and indirect shoot organogenesis, molecular profiling, secondary metabolite production and antioxidant activity of micropropagated *Ceropegia santapau*. Plant Growth Regulators. v. 72, p. 1-15, 2014.

Chinmayee, S. P., Adeshkumar, S. S., Monca, R. S. Random Amplified Polimorphic DNA (RAPD) detection of somaclonal variant in commercially micropropagated banana (*Musa* spp. cultivar Grand Naine). American Journal of Biochemistry and Molecular Biology. v.2, n. 4, p. 235-240, 2012.

Clayton, P. W., Hubstenberger, J. F., Phillips, G. C. Micropropagation of Members of the Cactaceae Subtribe Cactinae. Journal of the American Society for Horticultural Science. v.115, n.2, p.337-343, 1990.

Doyle, J.J. e Doyle, J.L. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue. Phytochem. Bull. v.19, p.11-15, 1987.

Elias, H. Taha, R. M., Hasbullah, N. A., Mohamed, N. Manan, A. A., Mahmud, N., Mohajer, S. The effects of plant growth regulators on shoot formation, regeneration and coloured callus production in *Echinocereus cinerascens* in vitro. Plant Cell Tissue Organ Culture, v. 120, p.729-739, 2015.

El Finti, A., El Boullani, R., Aabd, A. N., Msanda, F., Serghini, M. A. El Mousadik, A. *In Vitro* Propagation of Three Moroccan Prickly Pear Cactus *Opuntia* and Plant Establishment in Soil. Notulae Scientia Biologicae. v.5, n.1, p.39-44, 2013.

Fan, Q., Zheng, S., Yan, F., Zhang, B., Qiao, G., Wen, X. Efficient regeneration of dragon fruit (*Hylocereus undatus*) and an assessment of the genetic fidelity of *in vitro*-derived plants using ISSR markers. Journal of Horticultural Science & Biotechnology v.88, n. 5, p.631–637, 2013.

Flores, R., Nicoloso, F.T., Maldaner, J., Garlet, T.M.B. Benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) na propagação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. v.11, n.3, p.292-299, 2009.

George, E. F., Hall, M. A., Klerk, G. Plant Propagation by Tissue Culture. The Background. 3ed. v.1. Dordrecht: Springer, 2008. 504p.

Grattapaglia, D., Machado, M. A., Micropropagação. In: Torres, A. C., Caldas, L. S., Buso, J. A. Cultura de Tecidos e Transformação Genética de plantas. vol.1. Brasília: Embrapa-SPI, 1998, cap.9, p.183-260.

Hammer, O., Haper, D.A.T., Ryan, P.D. PAST: Palaeontological Statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica v. 4, n. 1, p. 9, 2001.

Hua, Q., Chen, P., Liu, W., Ma, Y., Liang, R., Wang, L., Wang, Z., Hu, G., Qin, Y. A protocol for rapid *in vitro* propagation of genetically diverse pitaya. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 120, 741-745. 2015.

Hubstenberger, J. F., Clayton, P. W., Phillips, G. C. Micropropagation of Cacti. 1992. In: Bayay, Y. P. S. Biotechnology in Agriculture and Forestry, v. 20. Berlin: Springer, Cap. 4, p.49- 68.

Ivanova, M. e Staden, J. V. Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v.104, n.1, p.12-21, 2010.

Johansen, D. A. Plant microtechnique. New York: Mc Graw Hill Book. 1940, 523 p.

Kerbauy, G. B. Fisiologia Vegetal. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2004. 452 p.

Kevers, C., Franck, T., Strasser, R. J., Dommès, J. Gaspar, T. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 77, p. 181–191, 2004.

Khattab, S., El Sherif, F., El-Garhy, H. A., Ahmedc, S., Ibrahimc, A. 2014. Genetic and phytochemical analysis of the *in vitro* regenerated *Pilosocereus robinii* by ISSR, SDS–PAGE and HPLC. Gene. v.533, n.1, p.313–321, 2014.

Kraus, J. E. e Arduin, M. Manual Básico de Métodos em Morfologia Vegetal. Rio de Janeiro: EDUR. 1997. 198p.

Langer, D. F. e Mergener, R.A. Cultivo *in vitro* de *Cereus hildmannianus* K. Shum. Unoesc & Ciência – ACBS. v.4, n.1, p.7-14, 2013.

Larkin, P.J. e Scowcroft W.R., Somaclonal Variation - a Novel Source of Variability from Cell Cultures for Plant Improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, v.60, p.197-214, 1981.

Lema-Rumińska, J.e Kulus, D. Micropropagation of Cacti - a Review. *Haseltonia*. n.19, 46–63, 2014.

Leroy, X. J., Leon, K., Hily, J. M., Chaumeil, P., Branchard, M. Detection of *in vitro* culture-induced instability through inter-simple sequence repeats analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, v.102, p.885-891, 2001.

Malda, G., Suzán, H.; Backhaus, R. *In vitro* cultura as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae*, v.81, p.71-87, 1999.

Marchi, M.N.G. Micropropagação e conservação de *Discocactus zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* e *Stephanocereus luetzelburgii*, cactos nativos da Chapada Diamantina, Bahia. 2012, 109f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2012).

Marchi, M.N.G., Civatti, L.M., Viana, C.M., Assis, J.G.A., Bellintani, M.C., Santana, J.R.F. Seed cryopreservation of the native cacti *Discocactus zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* and *Stephanocereus luetzelburgii* from Bahia, Brazil. *African Journal of Biotechnology*. v.12, n.21, p.3250-3254, 2013.

Mohamed, A. E. Somaclonal Variation in Micro-propagated Strawberry Detected at the Molecular Level. *International Journal of Agriculture & Biology*. v.9, n.5, 2007.

Murashige, T., Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, v.15, n.3, 473–497, 1962.

Ng, W.L. e Tan, S.G. Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Are We Doing It Right? *ASM Sci. J.*, v.9, n.1, p.48–57, 2015.

O'Brien, T. P., Feder, N., Mccully, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *O Protoplasma*. v.59, n.2, p.368-373, 1965.

Palma, D., Schuelter, A. R., Stefanello, S., Fortes, A. M. T. Aspectos morfofisiológicos e controle da hiperhidricidade na cultura de tecidos vegetais. *Revista Brasileira de Agrociência*, v.17, n.2, p.174-184, 2011.

Palomino, G., Dolezel, J., Cid, R., Brunner, I., Méndez, I., Rubluo, A. Nuclear genome stability of *Mammillaria san-angelensis* (Cactaceae) regenerants induced by auxins in long-term *in vitro* culture. *Plant Science*. v. 141, p. 191–200, 1999.

Park, S.W., Jeon, J.H., Kimb, H.S., Park, Y.M., Aswath, C., Joung, H. Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, v.99, p. 199–205, 2004.

Pérez-Molphe-Balch E. e Dávila-Figueroa C. A. *In vitro* propagation of *Pelecyphora aselliformis* Ehrenberg and *P. strobiliformis* Werdermann (Cactaceae). *In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant*, v.38, p.73–78, 2002.

Pérez-Molphe-Balch, E., Pérez-Reyes, M. E., Dávila-Figueroa, C. A., Villalobos-Amador, E. *In vitro* propagation of three species of columnar cacti from the Sonoran Desert. *Hortscience*, v.37, n.4, p.693–696, 2002.

Picoli, E. A. T., Otoni, W. C., Figueira, M. L., Carolino, S. M. B., Almeida, R. S., Silva, E. A. M., Carvalho, C. R., Fontes, E. P. B. Hyperhydricity in *in vitro* eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). *Plant Science*, v. 160, p. 857–868, 2001.

Quiala, E., Matos, J., Montalvo, G., Feria, M., Chávez, M., Capote, A., Pérez, N., Barbón, R., Kowalski, B. *In vitro* propagation of *Pilosocereus robinii* (Lemaire) Byles et Rowley, endemic and endangered cactus. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, v.11, p.18-25, 2009.

Rawat, J. M., Rawat, B., Mehrotra, S., Chandra, A., Nautiyal, S. ISSR and RAPD based evaluation of genetic fidelity and active ingredient analysis of regenerated plants of *Picrorhiza kurroa*. *Acta Physiology of Plant*, v.35, p.1797-1805, 2013.

R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2013. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em 21 nov. 2013.

Reddy, M. P., Sarla N., Siddiq, E.A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*. v.128, p. 9–17, 2002.

Resende, G. A., Claudete, A. M., Machado, M. F. P. S. Somaclonal variation in *Cereus peruvianus* Mill. (Cactaceae): its potential to generate new varieties and broaden the species's genetic basis. *Journal of Basic & Applied Genetics*, v. 21, n.1, p. 33-42, 2010.

Resende, S. V. Micropropagação e conservação *in vitro* de *Melocactus glaucescens* Buining & Brederoo e *Melocactus paucispinus* G. Heimen & R. Paul (Cactaceae), espécies endêmicas da Bahia e ameaçadas de extinção. 2010. 140 f. Tese de doutorado (Doutorado em Botânica). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana 2010.

Rodrigues, P. H. V., Tulmann Neto, A., Cassieri Neto, P., Mendes, B. M. J. Influence of the number of subcultures on somaclonal variation in micropropagated Nanico (*Musa* spp., AAA group). *Acta Horticulturae*, v.490, p.469–473, 1998.

- Román, R. S. S., Caetano, C. M., Ramírez, H. Osorio, J. G. M. 2014. Multiplicación de *Selenicereus megalanthus* (pitahaya amarilla) e *Hylocereus polyrhizus* (pitahaya roja) vía organogénesis somática. *Acta Agronomica*. v.63, n.2, p.272-281, 2014.
- Rubluo, A., Marín-Hernández, T., Duvala, K., Vargas, A., Márquez-Guzmán, J. Auxin induced morphogenetic responses in long-term in vitro subcultured *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada (Cactaceae). *Scientia Horticulturae*. v. 95, p. 341–349, 2002.
- Sahijram, L., Soneji, J. R., Bollamma, K. T. Analyzing somaclonal variation in micropropagated Bananas (*Musa Spp.*). *In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant*, v.39, p.551–556, 2003.
- Santos-Díaz, M. S., Méndez-Ontiveros, R., Arredondo-Gómez, A., Santos-Díaz, M. L. *In vitro* organogenesis of *Pelecypora aselliformis* Erhenberg (Cactaceae). *In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant*, v.39, p.480–484, 2003.
- Sharma, S., Pamidimarria, D.V.N. S., Ananda, K.G. V., Reddy, M. P. Assessment of genetic stability in micropropagules of *Jatropha curcas* genotypes by RAPD and AFLP analysis. *Industrial Crops and Products*. v. 34, p. 1003– 1009, 2011.
- Shenoy, V. B. e Vasil, I.K. Biochemical and molecular analysis of plants derived from embryogenic tissue cultures of napier (*Pennisetum purpureum* K. Schum) grass. *Theor Appl Genet*. v.83, p.947-955, 1992.
- Silva, G. T. Diversidade e estabilidade genética no cultivo *in vitro* de *Melocactus paucispinus* G. Heimen & R. J. Paul e *Melocactus glaucescens* Buining & Brederoo (Cactaceae). 2014. 98f. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biodiversidade (Mestrado em Genética e Biodiversidade). Universidade Federal da Bahia. Salvador (2014).
- Taiz, L. e Zeiger, E. *Fisiologia Vegetal*. 3ed, Porto alegre: Artmed, 2004. 719 p.
- Taylor, N. e Zappi, D. *Cacti: of Eastern Brazil*. Richmond, Surrey: Royal Botanic Gardens, Kew, 2004. 499 p.
- Vasconcelos, A. G. V., Tomas, L. F., Camara, T. R., Willadino, L. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. *Ciência Rural*, v.42, n.5, 2012.
- Viñas, C. M., Fernández-Brenes, M., Azofeifa, A., Jiménez, V. M. *In vitro* propagation of purple pitahaya (*Hylocereus costaricensis* [F.A.C. Weber] Britton & Rose) cv. Cebra. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. v.48, n.5, p.469–477, 2012.
- Wolfe, A.D., Xiang, Q.Y., Kephant, S.R. Assessing hybridization in natural population of *Penstemon* (Scropulariaceae) using hypervariable Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) band. *Molecular Ecology*, v.7, p.1107-1125, 1998.

Zaffari, G. R., Kerbaui, G. B., Kraus, J. E., Romano, E. C. Hormonal and histological studies related to *in vitro* banana bud formation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.63, p. 187–192, 2000.

Zoghlami, N., Bouamama, B., Khammassi, M., Ghorbel, A. Genetic stability of long-term micropropagated *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. plantlets as assessed by molecular tools: Perspectives for *in vitro* conservation. *Industrial Crops and Products*. v. 36. p.59-64, 2012.

CAPÍTULO 04

INDUCTION OF CALOGENESIS IN *Stephanocereus luetzelburgii* (CACTACEAE):
MORPHO-ANATOMICAL CHARACTERIZATION AND PROTEOMICS
ANALYSIS

ABSTRACT

The aim of this study was to establish the ideal conditions for induction and control of calogenesis in *Stephanocereus luetzelburgii*, a cactus native to Chapada Diamantina, Bahia state, Brazil, and the changes in histological aspects and proteomic changes in different types of callus. Plants grown *in vitro* were cut into different types of explants and cultured on Murashige and Skoog (1962) medium supplemented with different types and concentrations of plant growth regulators. Afterward, two strains of callus were selected for proteomics analysis: induced with plant growth regulators (type I) and without (type II). Histological analysis was also performed. The longitudinal explant showed significant interaction between the factors 2.4D and kinetin. In general, the 2.4D applied concentrations had a positive effect on callus induction in the species. The apical explants showed less satisfactory results for calogenesis induction, but the calluses induced in the explants showed embryogenic potential. Histological analysis of calluses derived from apical explants induced with 100 μM of picloram showed cluster of cells with meristematic characteristics, which indicates potential for organogenesis or somatic embryogenesis provided they are subject to adequate chemical stimuli. The most representative categories of proteins up and down-regulated for callus type I were related to metabolic processes. In addition, various proteins which are markers of morphogenetic pathways in other plant species were differentially expressed, suggesting that both types of callus analyzed, especially type I, have the potential for *in vitro* regeneration.

KEYWORDS: conservation; micropropagation; non-model plants; plant growth regulators; shotgun proteomics.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi estabelecer as condições ideais para a indução e controle da calogênese *in vitro* em *Stephanocereu luetzelburgii*, um nativo do cacto a Chapada Diamantina, Bahia, Brasil, e as mudanças associadas a aspectos histológicos e ao nível de expressão protéica em diferentes tipos de calos. Plantas estabelecidas *in vitro* foram seccionadas em diferentes tipos de explantes e cultivadas em meio Murashige e Skoog (1962) suplementado com diferentes tipos e concentrações de reguladores vegetais. Para análise proteômica foram utilizadas duas linhagens de calos: induzidos com reguladores vegetais (tipo I) e induzidos no tratamento controle (tipo II). Além disso, foi realizada a análise histológica dos calos. No explante longitudinal houve interação significativa entre os fatores 2,4D e cinetina. De modo geral as concentrações de 2,4D aplicadas favoreceram a indução da calogênese. Por outro lado, o explante apical apresentou resultados menos satisfatórios, mas os calos induzidos neste tipo de explante apresentaram potencial embriogênico. De acordo com a análise histológica, os calos derivados do explante apical e induzidos com 100 μ M de picloram possuem grupos de células com características meristemáticas, o que indica potencial para organogênese ou embriogênese somática, desde que sejam submetidos a estímulos químicos adequados. As principais classes de proteínas diferencialmente expressas no calo Tipo I estão relacionadas a processos metabólicos e podem estar relacionadas aos tratamentos utilizados na etapa de indução. Além disso, proteínas marcadoras de vias morfogênicas *in vitro* para outras espécies foram diferencialmente expressas nas linhagens analisadas, o que sugere que ambos os tipos de calos, especialmente o Tipo I, tem o potencial para a regeneração *in vitro*.

PALAVRAS-CHAVE: conservação; micropropagação; plantas não-modelo; reguladores vegetais; *shotgun proteomics*.

INTRODUCTION

Cacti are perennial dicotyledonous plants with specialized features for survival in arid and other weather conditions (Al-Ramamneh et al. 2006). In Brazil, the semi-arid region occupies a vast area of between 750,000 to 850,000 km² where rainfall is both scarce and irregular, with a high annual evaporation of more than 2,000 mm as well as shallow soils with low water holding capacity (Silva et al. 2014). *Stephanocereus luetzelburgii* is a species of solitary cactus often not erect but inclined \pm westwards, unmistakable for its bottle-shaped stem (Taylor and Zappi, 2004) with great ornamental potential. This species is endemic to the state of Bahia and has been affected by habitat modification that limits the occurrence of this species (Taylor and Zappi, 2004).

Due to high diversity and value, which is mainly ornamental, natural populations of cacti have been dramatically affected by illegal collection and habitat destruction or fragmentation (Dávila-Figueroa et al. 2005; Rojas-Aréchiga and Vázquez-Yanes, 2000). Consequently, all of the members of Cactaceae are included in Appendix II of CITES (Hunt, 1999). Since the beginning of the 2000s scientists have warned the urgent need for propagation studies of Cactaceae, as they are an alternative for the conservation of this family (Rojas-Aréchiga and Vázquez-Yanes, 2000). However, conventional methods of propagation are inadequate for the multiplication of numerous species of cacti that, due to CAM physiology, have slow growth and low seed number, germination and shoots production rates (Khalafalla et al. 2007; Estrada-Luna et al. 2008; Elias et al. 2015).

Tissue culture technology has often been successfully utilized in the propagation of plants with poor and uncertain responses to conventional methods of propagation and to preserve endangered species, including native plants, or achieve their commercial

production (Sudharsan et al. 2003; Hua et al. 2014; Elias et al. 2015). An efficient micropropagation system offers a useful alternative for rapid shoot production of healthy and pathogen-free plants in a relatively short time using minimal space (Sudharsan et al. 2003; Hua et al. 2014; Elias et al. 2015).

Callogenesis is for many species a prerequisite step to control the following *in vitro* propagation phases, especially somatic embryogenesis (Gueye et al. 2009). Although literature offers successful protocols for the micropropagation of cacti, induction and mostly regeneration via an intermediary callus phase continue to be a significant limitations (Nunez et al. 2014). During the process of *in vitro* regeneration, selection of callus strains with organogenic or embryogenic competence is a key step for callus conversion into plants. Few studies within the Cactaceae family present morphological characteristics related to the morphogenetic potential of callus (Angulo-Bejarano and Paredes-López, 2011; Nunez et al. 2014; Roman et al. 2014; Teodora, 2014) and among those with this type of data there is no pattern, indicating that is a genotype-specific response.

Callus induction involves extensive cellular reprogramming which is expected to result in complex changes at the level of gene expression and differential protein expression (Tan et al. 2013). The specific composition of proteins present in cells in defined environmental conditions reflects the true biochemical outcome of genetic information and indicates the biochemical pathways that may be involved (Rodziewicz et al. 2014). The study of proteome changes could be critical for understanding the rules with which cells work and adapt towards various stimuli (Rodziewicz et al. 2014).

According to Yin et al. (2008) the detailed proteomic data regarding different gene expression patterns regulated by hormones during callus differentiation increase

our knowledge about the crosslink underlying plant hormone regulation in callus regeneration. In Cactaceae only a few studies in proteomics have been conducted (Balén et al. 2006a; 2007b; López-Urrutia et al. 2014; Rogié et al. 2015). This work is the first study to analyzing calogenesis using nano ESI-HDMS^E technology in cacti.

Thus, the identification and relative quantification of proteins that are expressed during calogenesis *in vitro* could lead to understanding the biochemical events related to induction of cellular dedifferentiation caused by different kinds of stimuli, as well as marker proteins that indicate the preferred morphogenetic route of a specific callus strain. Furthermore, the identification of differentially expressed proteins may contribute to a better understanding of the regulatory networks determining callus differentiation, so that protocols of *in vitro* plant regeneration through the indirect route could be improved. The aim of this study was to establish the ideal conditions for induction and control of calogenesis in *S. luetzelburgii*, a cactus native to Chapada Diamantina, Bahia state, Brazil, and the changes in histological aspects and proteomic changes in different types of callus.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Shoots derived from *in vitro* multiplication of *Stephanocereus luetzelburgii* were cultured in MS culture medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with 3% sucrose and 2 g L⁻¹ Phytigel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (henceforth called as basal medium). The culture media were adjusted to pH 5.6- 5.8 and autoclaved at 121 °C for 15 min. All cultures were maintained in growth chamber with a light

intensity of $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provided by white light at $25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ under a 16h photoperiod. Inducted shoots were subcultured every thirty days in the basic medium and maintained under the same culture conditions.

Effect of type of explant and plant growth regulators

Two experiments for callus induction were performed to establish the best callus induction protocol. First, longitudinal segments of the cladodes approximately 5 mm in length were inoculated in 15 ml of MS medium supplemented with different concentrations of 2,4 - dichlorophenoxyacetic (2,4D: 0; 9; 18; 27; 36 μM) (Sigma-Aldrich) and kinetin (KIN: 0; 4.65; 9.29 μM) (Sigma-Aldrich), applied individually or in combinations in a factorial design with two factors. Cultures were maintained for 90 days under the same conditions described in the previous section.

In the second experiment, apical segments of the cladodes approximately 2.0 mm in length were inoculated in Petri dishes (90 x 15 mm) containing 20 ml of basal medium supplemented with three different types of auxins: naphthaleneacetic acid (NAA) (Sigma-Aldrich), picloram or 2,4D at five concentrations (0; 5; 10; 20; 40; 100 μM). Each picloram test using different concentrations was repeated twice. The cultures were maintained at $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ in the dark for 30 days.

All experiments were carried out was completely randomized with five replicates of six samples each. The data were submitted to the Shapiro-Wilk normality test and were analyzed using the Generalized Linear Model (GLM). When verified significant effect ($p < 0.05$), the data were analyzed by the Tukey test at 5% for mean comparison. Was used statistical program R (R Development Core Team, 2008).

Histomorphological analyses

For histological analysis calluses derived from apical explants induced with 100 μM of picloram were selected. Samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde and 0.05 M sodium cacodylate for at least 48 hours and then washed twice in the same fixation buffer (0.05 M) for 30 minutes, subsequently being subjected to dehydration in ascending alcohol series (alcohol 30, 50, 70, 90 and 100). After dehydration, the material was infiltrated in absolute historesin-ethanol solution (1: 1) for 12 hours, followed by pure historesin (Leica Microsystems) for 24 hours. After the embedment, the samples in resin were cut on a rotary microtome (Leica RM2235), yielding 5 μm cross-sections which were then stained with Toluidine Blue. Histological sections were observed under an Axioplan light microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with an AxioCam MRC5 digital camera (Carl Zeiss), and the images were analyzed using AxioVisionLE version 4.8 software (Carl Zeiss).

Proteomic analysis of callus

For total protein extraction, approximately 500 mg of freshly brown callus derived from the apical explant induced with 100 μM picloram (Type I) and translucent callus derived from TCL (Silva et al. 2003) explant induced without growth regulators (Type II) were extracted with urea/thiourea buffer according to Heringer et al. (2015). Three biological replicates were extracted for each sample of Type I and Type II callus. The total protein concentration was assessed using a 2-D Quant Kit (GE Healthcare). Then, the 3 biological replicates of each treatment were used to compose one pooled sample, totaling 100 μg of protein concentration (Luge et al., 2014; Heringer et al., 2015).

Protein aliquots of 100 μg were desalted on Vivaspin 500 membranes (GE Healthcare, UK) and digested by adding 20 μL of trypsin solution (50 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) (V5111,

Promega, Madison, WI, USA) according to Heringer et al. (2015). Then, 100 μL of the supernatant was picked up and transferred to Total Recovery Vials (Waters) for further shotgun proteomics analysis.

Tryptic peptides were analyzed by ESI-LC-MS/MS in a nanoAcquity UPLC connected to a SynaptG2-Si HDMS mass spectrometry (Waters, Manchester, UK). The peptide mixture was first loaded into a nanoAcquity UPLC 5 μm C18 trap column (180 μm x 20 mm), then into a nanoAcquity HSS T3 1.8 μm analytical reversed phase column (100 μm x 100 mm). Runs consisted of three replicates per pooled sample, using a gradient from 7% to 40% acetonitrile (0.1% v/v formic acid) (JT Baker, Phillipsburg, USA) at 600 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$. The chromatography step was performed by injecting 1 μL of digested samples to normalize them before the relative quantification of proteins. For all measurements, the mass spectrometry was operated in positive and resolution mode (V mode) with ion mobility; transfer collision energy ramped from 19v to 45v in high-energy mode; cone and capillary voltage of 30v and 2,800v, respectively; and source temperature of 70 $^{\circ}\text{C}$. In TOF parameters, the scan time was set to 0.5s, in continuum mode, and a mass range of 50 to 2,000 Da. The lock mass channel was sampled every 30 s. The mass spectrometer was calibrated with a MS/MS spectrum of [Glu1]-Fibrinopeptide B human (Glu-Fib) solution (100 $\text{fmol}\cdot\text{uL}^{-1}$). Multiplexed data-independent (DIA) scanning with added specificity and selectivity of a non-linear 'T-wave' ion mobility (HDMSE) device (Giles et al. 2011) were performed with a Synapt G2-Si HDMS mass spectrometer.

For proper spectra processing and database searching conditions, Progenesis QI for Proteomics Software V.2.0 (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK) were used. The analysis used the following parameters: 1 missed cleavage; minimum fragment ion per

peptide equal to 1; minimum fragment ion per protein equal to 3; minimum peptide per protein equal to 1; fixed modifications of carbamidomethyl (C) and variable modifications of oxidation (M) and phosphoryl (STY); and a default false discovery rate (FDR) value at a 4% maximum; score greater than 5; and maximum of 10 ppm of mass errors. The program compared sequences of Caryophyllales proteins from UniProtKB database (<http://www.uniprot.org/>). Thus, we obtained parameters such as the score, peptide count and unique peptides. For co-expressed proteins quantitative analysis, proteins with a coefficient of variation greater than 0.5 and false positives were excluded. Proteins were considered differentially expressed when the changes were at least 2.0 fold. Redundant proteins, generated due to the use of a less specific database (Caryophyllales), were excluded manually. Functional classification of the proteins identified was performed using the program Blast2go (www.blast2go.com) and UniProtKB database information.

RESULTS

Effect of explant type and plant growth regulators

There was a significant interaction ($p= 0.006075$) between the factors 2.4D and kinetin in *in vitro* callus induction of *Stephanocereus leutzburgii*. In general, the 2.4D applied concentrations had a positive effect on callus induction in the species (Table 01). In the control treatment, as well as in nutrient media supplemented only with kinetin 4.64 and 9.29 μM , the percentage of callus formation were significantly lower than the other treatments in which the 2.4D was added to the medium (17.17 and 6% respectively). The nutrient medium supplemented only with 18.10 μM of 2.4D had the highest percentage of callus (80%). In this case, concentrations above 18.10 μM

resulted in lower percentage of callus in the explants. There was a significant interaction between the highest concentration of 2.4D and kinetin concentrations. In this case, the highest concentration of kinetin significantly increased callus induction from 37 to 77%.

Table 01: Effect of different concentrations of 2.4D and kinetin in the callus induction (%) in longitudinal explants *Stephanocereus luetzelburgii*.

2.4D (μM)	Kinetin (μM)			Mean
	0,00	4,65	9,29	
Callus induction (%)				
0,00	17cA	17bA	6cA	13
9,05	53bA	70aA	60bA	61
18,10	80abA	70aA	47bA	65
27,15	50bA	70aA	47bA	55
36,02	37bB	57aB	77abA	57
Mean	47	57	47	-

Means followed by the same letter, lower case in the columns and uppercase in the lines, do not differ significantly by Tukey test ($p > 0.05$).

Auxin NAA and 2.4D did not show satisfactory results for the apical explant and only picloram in two concentrations (20 and 100 μM) showed callus induction (Table 02). This explant showed less satisfactory results than longitudinal explants. At low auxin concentrations (5 and 10 μM) this explant maintained its apical growth and did not express cellular dedifferentiation signals.

Table 02: Effect of different concentrations of picloram, NAA and 2.4D in callus induction (%) in apical explants *Stephanocereus luetzelburgii*.

Plant growth regulator concentration (μM)	Callus induction (%)		
	Picloram	NAA	2,4D
0	-	-	-
5	-	-	-
10	-	-	-
20	20a	-	-
40	-	-	-
100	36a	-	-

Means followed by the same letter in columns do not differ significantly by Tukey test ($p > 0.05$).

Histomorphological analyses

The treatments showed callus formation with different color patterns and textures (Figure 01 A,B, C and D). In the presence of light longitudinal explants treated with 2.4D and kinetin presented mostly chlorophyllated calluses (Figure 01 A). However, higher concentrations of 2.4D produced a darker color in calluses (Figure 01 B). In the absence of light, apical explants induced with 20 or 100 μM of picloram showed brown colored calluses (Figure 01 C and D). Regarding texture, in both light conditions compact and friable callus were obtained and no pattern emerged among treatments.

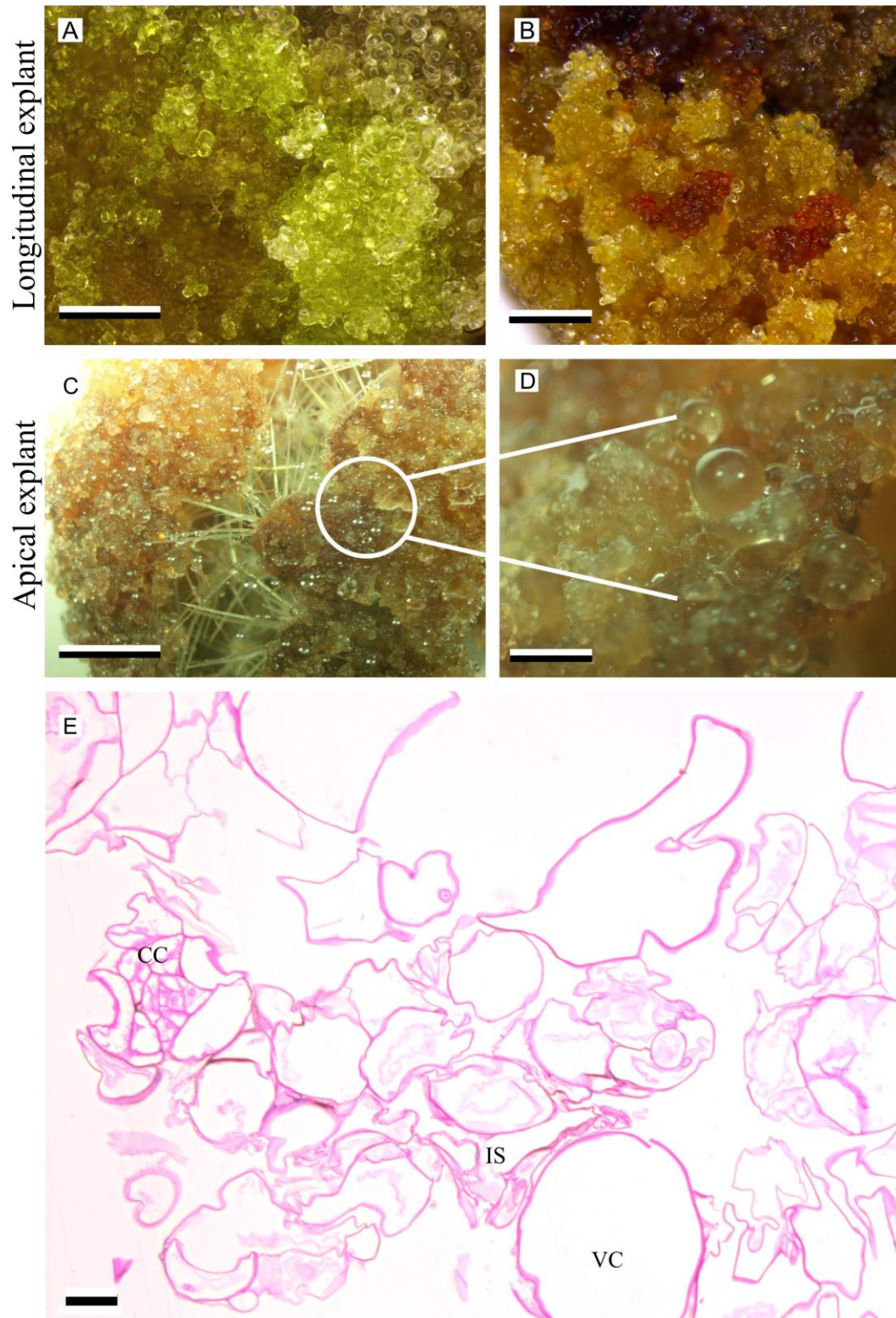


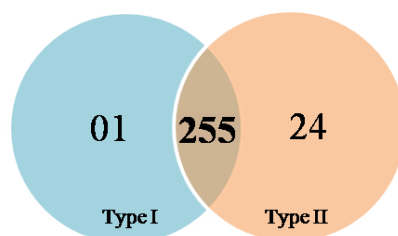
Figure 01. Histomorphological profile of callus from *Stephanocereus luetzelburgii*. Longitudinal explants cultured in light on basal medium supplemented with 2,4D 27 μM (A) and 2,4D 36 μM + KIN 4.65 μM (B). Apical explants cultured in dark in basal medium supplemented with picloram 100 μM (C, D) (Type I callus). Section of histological Type I callus (H): cluster of meristematic cells (cc), vacuolated cells (vc) and intercellular spaces (is). Bars: (A- C): 0.5 mm; (D): 0.2 mm; (E): 50 μm .

The cellular structure of calluses induced in the apical explants with 100 μ M of picloram (Figure 1 C and D) was heterogeneous with large vacuolated cells and with frequent intercellular spaces (Figure 01H). The presence of cell clusters in intense division, small, with dense cytoplasm and nucleus and prominent nucleoli was observed (Figure 01H).

Protein expression profiles of type I and type II callus and functional categories of the differentially expressed proteins with emphasis in in vitro morphogenesis

A total of 280 proteins were identified in type I and type II callus of *Stephanocereus luetzelburgii* derived from *in vitro* tissue culture. One of these, being unique to type I callus and 24 unique to type II (Figure 02 A and Supplementary table 01), that were analyzed separately to matched proteins. A total of 255 matched proteins was obtained and subdivided into three groups: 81 up-regulated, 54 down-regulated and 120 unchanged for type I callus in relation to type II.

A



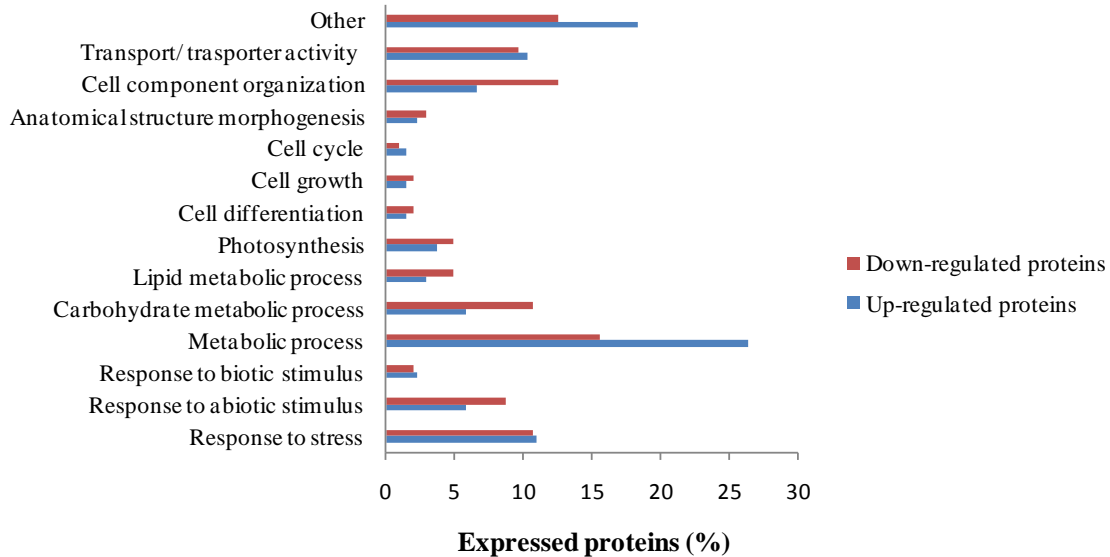
B

Figure 02. Venn diagram displaying the numbers of unique and co-expressed proteins (A). Functional classification of differentially expressed proteins in *Stephanocereus luetzelburgii*. Up-regulated and down-regulated proteins in type I callus. Classification is based on the BAST2GO and UniProtKB database.

For the analysis of functional classification, up and down-regulated proteins were subjected to Blast2GO (www.blast2go.com) program and UniProtKB database information. Functional classification generated 14 different categories (Supplementary table 02 and 03): response to stress, response to abiotic stimulus, response to biotic stimulus, metabolic process, carbohydrate metabolic process, lipid metabolic process, photosynthesis, cell differentiation, cell growth, cell cycle, anatomical structure morphogenesis, cellular component organization, transport / transporter activity and other, which did not fit in the above categories. Since each protein may be responsible for several biological processes, they could be grouped in more than one functional

category. The most representative categories of proteins up and down-regulated for callus type I were related to metabolic processes (Figure 02 B).

Therefore, the differences in the proteome of callus type I and type II will be discussed with emphasis on relevance to morphogenesis *in vitro*, whether for somatic embryogenesis or shoot development, in correlation to the other species available in literature (Table 03).

Table 03: Differentially expressed proteins in callus type I compared to callus type II of *Stephanocereus luetzelburgii* related to *in vitro* morphogenesis.

Accession	Peptide count	Confidence score	Max fold change	Description
UP				
Q94IA8	1	5,206	271,65	Transketolase
Q9AXD1	5	28,4672	176,49	Glutamine synthetase
P37223	6	46,5517	119,38	NADP-dependent malic enzyme Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
A0A076E907	16	163,8161	47,05	(Fragment)
Q5QJY8	8	56,9824	32,04	Alcohol dehydrogenase
O50036	10	59,0471	20,77	Heat shock 70 protein
P02398	2	10,3108	20,21	50S ribosomal protein L12, chloroplastic
I3NVX2	25	166,4147	14,73	V-type ATPase subunit A
T2A7L5	1	5,8576	13,56	Ribosomal protein S16 (Fragment)
Q5EVL8	2	10,4502	11,86	Spermidine synthase (Fragment)
Q9XFW8	1	5,0298	11,02	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C-2
C7E3U4	16	164,3645	9,37	(Fragment)
B5M1Y7	7	55,1395	8,97	Glutathione peroxidase
B0LN88	2	10,4429	3,69	Ribosomal protein S12 (Fragment)
Q8GUB5	17	132,6658	3,10	Vacuolar ATPase subunit B
I6PD11	3	15,5249	3,05	Glutamate synthase
O22664	37	308,075	2,51	Cytosolic heat shock 70 protein
Q0PVD1	2	11,8083	2,50	Glutathione S-transferase
G5DWZ5	1	5,189	2,40	40S ribosomal protein S11-1 (Fragment)
Q8GUB4	4	26,2507	2,34	Vacuolar ATPase subunit G
DOWN				
N0DR69	1	5,3261	109,29	ABA responsive element binding factor
P29356	12	85,4416	85,15	Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme
P82277	2	15,3091	52,26	30S ribosomal protein 2, chloroplastic

J7FB51	4	21,9498	6,38	Ribosomal protein L5
E5LLE0	9	52,7575	5,91	Heat shock protein Hsp18.3
P93262	7	49,5928	4,95	Phosphoglucomutase, cytoplasmic
W8E425	1	5,1713	4,75	Late embryogenesis abundant protein (Fragment)
P17878	22	197,2137	4,22	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic
W0FHL5	32	277,8355	3,86	Catalase
Q05832	9	50,4024	3,79	Heat shock protein 18.3 kDa class I

DISCUSSION

Effect of type of explant and plant growth regulators

Auxin and cytokinin have been the most extensively used and studied plant hormones in the context of callus formation and subsequent organ regeneration, but surprisingly little is known about how they induce callus at the molecular level (Ikeuchi et al. 2013). In addition to the effect of growth regulators, various factors regulate *in vitro* calogenesis induction such as the genotype, the culture medium composition, physiological status of the explant donor, explant position, and size of the explants (Karimi et al. 2010). The reason why certain *in vitro* regenerative events are more easily induced in some tissues than in others is still not satisfactorily elucidated, but it is admitted that the different morphogenetic expressions reflect the nature and degree of differentiation of these tissues (Stein et al. 2010).

There was a significant interaction between the factors 2.4D and kinetin at the highest auxin concentration tested (Table 01). These data are similar with those for *Cereus hildmannianus* (Karimi et al. 2010) and *Schlumbergera truncata* (Al-Ramamneh et al. 2006), where the interaction between auxin and cytokinin favored callus induction. However *Hylocereus costaricensis* (Viñas et al. 2012) and *Pilosocereus robinii* (Khattab et al 2014) only cytokinin was sufficient for induction. In *Echinocereus cinerascens* the addition of plant hormones (NAA and 6-Benzylaminopurine) in MS

medium, either singly or in combination, plays an important role in the production of callus (Elias et al. 2015). Among different auxins, 2,4D has been the most used in callus induction in cactus species (Ângulo-Bejarano & Paredes López 2011; Karimi et al. 2010; Nunez et al. 2014; Román et al. 2014; Teodora, 2012) and this regulator was effective for *Selenicereus megalanthus* (Nunez et al. 2014) and *Echinocactus mihanovichii* (Teodora, 2012). However, for *Selenicereus megalanthus* the callus did not have the capacity to regenerate new plant organs, unlike callus induced with Thidiazuron (TDZ).

The thin cell layer (TCL) system consists of explants of a small size excised from different plant organs and depending on the genetic state and epigenetic requirements, and in conjunction with strictly controlled growth conditions, may lead to the *in vitro* induction of specific morphogenic programs (Silva et al. 2003). TCLs have been successfully used in the micropropagation of many ornamental plant species whose previous *in vitro* regeneration was not successful using conventional methods (Silva et al. 2003). In the present study calluses derived from such explants induced without growth regulators were used for proteomic comparison with calluses with embryogenic potential induced with 100 µM of picloram. Also without the use of plant growth regulators, callus induction in tamarillo (Correia et al. 2012) and *Vanilla planifolia* (Tan et al. 2013) was promoted by wounding of the explants. *In vitro* callus induction is not obtained only with the addition of plant growth regulators, according to Ikeuchi et al. (2013) plants can form callus in response to stress, such as injury. Calogenesis induction without the use of plant growth regulators has many advantages. In addition to reducing costs related to the use of regulators, it lowers the risk of somaclonal variation, which is relevant especially when callus obtained will be used for

conservation or breeding programs, where the maintenance of genetic fidelity is essential.

The explant type apical stem did not show satisfactory results for callus induction in *S. luetzelburgii* (Table 02). The shoot apical is an endogenous auxin producer that guarantees the apical growth of plants, and therefore, it seems that the lower auxin concentrations were not sufficient to cause hormone imbalance, hinder apical growth and favor the formation of callus in this species.

Histomorphological analyses

Morphologically, cactus callus have a pattern of coloration that varies depending on the species, and the type and concentrations of regulators analyzed, such as pink (Elias et al. 2014; Teodora 2012), from purple to green (Nunez et al. 2014), white, with or without chlorophyll pigmentation (Roman et al. 2014), or from green to yellow (Angulo-Bejarano & Paredes-López, 2011). The brown color of callus can be attributed to oxidation of phenolic compounds (Angulo-Bejarano & Paredes-López, 2011) and is an indicative of stress (Yin et al. 2008). Oxidized callus offers a starting point for the investigation of ROS (reactive oxygen species) as indicators of cell stress and as signaling molecules for different metabolic processes: germination, mitosis, cell elongation, senescence, cell death, lignification of tissues forming phloem and xylem elements, regulation of gene expression associated with biotic and abiotic stress, and activation of plant defense system (Azoefifa, 2009; Román et al. 2014). In the presence of light callus exhibited green color, which can be attributed to exposure to constant light (Werner et al. 2009). In addition to the physical conditions, plant growth regulators and age may also interfere in the coloring of callus. In *Echinocereus cinerascens* more explants produced green callus when cultured in media with hormones applied singly

compared to explants cultured in hormone combinations, and it was noted that callus color varied with age (Elias et al. 2015).

There is no pattern with respect to callus texture that determines their potential for *in vitro* regeneration. For the cactus *Selenicereus megalanthus* (Nunez et al. 2014), sugar cane (Silveira et al. 2013), and the grass *Cynodon dactylon* (Chaudhury and Qu, 2000), compact callus are capable of regenerating and/or are embryogenic, while for *Nelumbo nucifera* (Arunyanart and Chaitrayagun, 2005) and *Myracrodruon urundeuva* (Vasconcelos et al. 2012) a friable texture is required.

Within the Cactaceae family only a single work reports a pattern of color and texture in *in vitro* regeneration. According to Nunez et al. (2014), for *S. megalanthus* only compact and green-purplish callus are capable of regenerating. Thus, it is evident that the pattern is genotype-specific oriented and that each species can respond in different ways, which makes detailed studies about a particular organism necessary.

Intense division into clusters of cells is a typical feature of meristematic cells (Gueye et al. 2009; Werner et al. 2010). According to Stein et al. (2010) this characteristic suggests intense RNA synthesis and metabolic activity. The level of structural organization of meristematic centers can distinguish embryogenic callus (EC) from non-embryogenic callus (NEC) (Silveira et al. 2013). According to the authors, NEC have dispersed and disorganized meristematic centers and are not capable of regenerating. It was not found in the analyzed callus any kind of structural organization or distribution pattern in the clusters of meristematic cells.

Protein expression profiles of type I and type II callus and functional categories of the differentially expressed proteins with emphasis in in vitro morphogenesis

This is the first detailed study on the differential expression of proteins derived from *in vitro* culture of cacti since only a few studies have analyzed the glycosylation pattern of tissues cultured *in vitro* (Balén et al. 2006a; 2007b), expression patterns of proteins involved in seed maturation (López-Urrutia et al. 2014) and analyzed the effect of NaCl and mannitol on proteomes of callus and tumor tissues (Rogíe et al. 2015).

The relatively low number of identified proteins may be a result from the absence of a specific database for this species. This is because several peptides identified by MS/MS have no counterparts in the databases, which undermines protein identification (Capriotti et al. 2013). However, the number of identified proteins in our study is still higher than others with two-dimensional electrophoresis of non-model species (Correia et al. 2012; Palama et al. 2010). Some strategies for improving the number of identified proteins in non-model plants are reducing sample complexity and/or eliminating the highest abundant proteins, and using different protein databases (Capriotti et al. 2013). Furthermore, the use of mass spectrometers with high resolution and high mass accuracy allows the improvement of the number of identified peptides and can increase the possibility of correct protein identification (Capriotti et al. 2015). In general, in the present work, the number of unique peptides per protein was low (data not shown), as already observed for other non-model plant species such as *Punica granatum* (Capriotti et al. 2013).

Although both callus types may have the potential for morphogenesis *in vitro*, based on the histological results, the comparison was made because auxin is the most widely used plant growth regulator for the *in vitro* morphogenesis and some studies have demonstrated its role in differential expression of proteins (Pan et al. 2010; Yin et al. 2008). The largest functional group of proteins up and down-regulated in type I callus are related to metabolic processes, 27 and 15% respectively (Figure 02 B).

Similarly, it was reported that proteins associated with metabolism and energy form the largest classes in callus of maize (Varhaníková et al. 2014), *Cyclamen persicum* (Lyngved et al. 2008) and *Cyphomandra betacea* (Correia et al. 2012). According to Marsoni et al. (2008), the largest class of proteins that they found differentially expressed in EC with respect to NEC comprises homologues of enzymes involved in energy state and metabolism, which corroborates the relevance of this category of proteins in *in vitro* plant morphogenesis.

The high abundance of proteins involved in carbohydrate metabolism, more specifically involved in the glycolysis pathway, is probably responsible for the active mobilization and utilization of exogenous sucrose supplied by tissue culture media (Winkelmann et al. 2006; Palama et al. 2010). It is possible that glycolytic metabolism and carbohydrate synthesis are involved in callus initiation and that enhanced glycolysis is probably involved in cellular division, differentiation in the callus (Tan et al. 2013) and somatic embryogenesis (Varhaníková et al. 2014). It is probable that embryogenic cells need more energy for their metabolic changes (Lyngved et al. 2008). Since embryogenesis is a developmental process connected with biosynthesis of many compounds, cell division and cell elongation, glycolysis is important for energy supply and formation of several metabolic intermediates associated with the biosynthesis of fatty acids, aromatic compounds and amino acids (Rode et al. 2011).

Some differentially expressed proteins associated to metabolic processes are capable of triggering morphogenesis in *in vitro* plants, especially somatic embryogenesis in other species. Transketolase was the first most abundant differentially expressed protein in this category, 271.65-fold more abundant in type I than in type II callus (Table 03). This protein has already been reported as more abundant in embryogenic than in non-embryogenic cultures (Marsoni et al. 2008) and as unique in

embryogenic callus of *Cyclamen persicum* (Lyngved et al. 2008). Furthermore, according to Marsoni et al. (2008) the overexpression of the transketolase could be correlated to the active proliferation of SE (somatic embryogenesis), which needs biosynthetic intermediates and NADPH. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is an enzyme of the glycolysis pathway which catalyzes key steps in energy metabolism and in partitioning reducing power in the form of NADPH to the cytosol (Zhang et al. 2009). This study (Table 03) found differential expression for three GAPDH (Table 01): two up-regulated (A0A076E907 and C7E3U4) and one down-regulated (P17878). GAPDH showed a significant increase in expression in EC of grape and *Vanilla planifolia* (Palama et al. 2010; Zhang et al. 2009), were found in higher amount in somatic rather than zygotic embryos (Winkelmann et al. 2006), and was unique in EC of *Cyclamen persicum* (Lyngved et al. 2008). Vacuolar ATP synthase subunit B2, ATP synthase subunit beta and ATPase alpha F1 were highly up-regulated in ES compared to NES of *Cyclamen persicum*, and ATPase alpha F1 was the most abundant unique embryo-specific protein for this species (Lyngved et al. 2008). According to the authors, it is probable that the embryogenic cells need more energy for their metabolic changes, and in the present study three ATPases (I3NVX2, Q8GUB4, Q8GUB5) were up-regulated in type I callus (Table 03). The NADP dependant malic enzyme was the third most differentially expressed protein in type I callus, 119.38-fold up-regulated in comparison to type II callus (Table 03). Similar results have been obtained in *Vanilla planifolia* (Palama et al. 2010), which suggests that the initiation of organogenesis in callus is correlated to the setting up of the photosynthesis system (Palama et al. 2010). Other proteins up-regulated in type I callus related to metabolic processes, such as alcohol dehydrogenase and glucan endo-1,3- β -glucosidase (Table

03), were related to differentiation of rice callus (Yin et al. 2008) and ECs of *Cyphomandra betacea* (Correia et al. 2012), respectively.

Glutamine synthetase and glutamate synthase are enzymes related to nitrogen metabolism. Glutamine synthetase proteins assimilate or recycle ammonia into glutamine (Zhang et al. 2009) and comprised the second differentially expressed protein group in this study, 176.49-fold more expressed in type I callus (Table 03). Its overexpression may be related to the increase in amino acids required for protein synthesis during the growth and development of plants (Miflin & Habash, 2002). This protein was up-regulated in embryogenic callus of maize (Varhaníková et al. 2014) and is considered to be indispensable in rice callus differentiation (Yin et al. 2008). Furthermore, it was detected exclusively in EC of *Vitis vinifera* (Zhang et al. 2009) and was associated with callus regeneration in *Vanilla planifolia* (Palama et al 2010).

The spermidine synthase metabolism-related protein was up-regulated in type I callus (11.65-fold) (Table 03). The overexpression of this protein was related to somatic embryogenesis in *Citrus sinensis* (Pan et al. 2009) and *Cyphomandra betacea* (Correia et al. 2012). In *Citrus*, the transient increase in spermidine synthase preceded the appearance of embryos in globular stage (Pan et al. 2009). Several studies have shown correlations between increase in polyamine (PAs) levels with cell division and a drop in polyamines during reduction of metabolic activity. Furthermore, the authors suggest the involvement of PAs in the interaction of cell wall components that aids cell wall rigidity and cell-to-cell adhesion (Bais & Ravishankar, 2002), key functions during induction and multiplication of *in vitro* callus. Other studies have also demonstrated that the polyamines spermine and spermidine were active in lower cellular levels of ROS (Khan et al. 1992).

Some down-regulated proteins in callus type I were also related to morphogenetic processes in other species (Table 03). Phosphoglucomutase cytoplasmic, which catalyzes the conversion of glucose-1-phosphate into glucose-6-phosphate, was more abundant in EC in maize (Varhaníková et al. 2014). Fructose-bisphosphate aldolase was expressed in ECs and NECs in *Medicago truncatula* (Almeida et al. 2012), *Cyphomandra betacea* (Correia et al. 2012) and were found in higher amount in somatic embryos of *Cyclamen persicum* (Winkelmann et al. 2006). According to the authors, although this enzyme is involved in the glycolysis pathway (Almeida et al. 2012), it seems to point to housekeeping functions rather than to particular pathways directly related with embryogenic competence acquisition (Correia et al. 2012).

In accordance with Yin et al (2008) plant growth regulators may interfere with the expression of proteins related to carbohydrate and energy synthesis, which may explain the overexpression of several morphogenesis related proteins in type I callus (induced using picloram 100 μ M).

Some conditions during *in vitro* culture such as presence of plant growth regulators (Yin et al. 2008; Pan et al. 2010; Tan et al. 2013) and excising tissue from the parent plant, subjecting to sterilization procedures, cutting into pieces, and introduction in an artificial culture environment (Karimi and Saidi, 2009) are factors that induce stress *in vitro* and can cause changes in the type and relative amount of stress proteins of *in vitro* induced callus. During stress, many enzymes and structural proteins undergo deleterious structural and functional changes and, usually, cause protein dysfunction (Rodziewicz et al. 2014; Wang et al. 2004). The molecular response of plants to stress has been often considered a complex process based mainly on the modulation of transcriptional activity of stress-related genes (Karimi & Saidi, 2009; Zhang et al. 2009). Stress response proteins are frequently reported in dividing cells and tissues

(Correia et al. 2012) and, according to Tan et al. (2013), the abundant expression of proteins related to stress demonstrate their important roles in callus formation, as they may afford protective and other functions during the callus differentiation process. Stress/defense proteins play an important role in plant development to ensure the coordinated growth of tissues (Yin et al. 2007). Therefore, the expression of totipotency in cultured somatic cells may be part of a general stress adaptative process that implies a fine regulation of auxin and stress signaling resulting in the restart of cell division and embryogenic competence acquisition (Correia et al. 2012).

Heat shock proteins (HSP)/chaperones are a large family of proteins playing roles in keeping cellular homeostasis both under optimal growth conditions and under stress (Rodziewicz et al. 2014) such as high temperatures and other stresses (Correia et al. 2012). HSP 70 and cytosolic HSP 70 proteins were overexpressed in type I callus (Table 03). In addition to its general chaperone functions (i.e. preventing aggregation and assisting in the refolding of non-native proteins under stress conditions), HSP 70 might play a broad role by participating in modulating the expression of many downstream genes in signal transduction pathways both during stress and under normal growth conditions, and cytosolic HSP 70 maintains the organellar precursor proteins in an import-competent stage (Wang et al. 2004). In *Cyphomandra betacea* (Correia et al. 2012) and *Vitis vinifera* (Zhang et al. 2009) HSP 70 were expressed at higher levels in ECs than in NECs. In *Cyclamen persicum* they were found to be present in higher relative levels in somatic rather than in zygotic embryos and the authors suggest that their accumulation is involved in triggering somatic embryogenesis (Winkelmann et al. 2006). Furthermore, two HSP 18.3(Q05832; E5LLE0) were down-regulated in type I callus (Table 03). Small heat shock proteins (sHsps) is the most complex group of HSPs in plants (Kotak et al. 2007) and form the first line of defense against protein

aggregation in order to maintain protein homeostasis (Haslbeck & Vierling, 2015). According to some authors these proteins are involved in the protection of practically all cellular compartments (Kotak et al. 2007).

Some enzymes related to oxidative stress showed differential expression in *S. luetzelburgii* callus. Oxygen molecules in different states of oxido-reduction and electronic excitation, as well as compounds of oxygen with hydrogen, chlorine and nitrogen constitute the class of reactive oxygen species (ROS) (Pfeiffer & Hoftberger, 2001). Although an unbalanced generation of these species induces detrimental oxidation of macromolecules including DNA, proteins, and lipids, ROS have important roles as second messengers in plant development (Pfeiffer & Hoftberger, 2001; Bela et al. 2015). According to Pfeiffer & Hoftberger (2001), auxin can induce the production of ROS in suspension cells of *Chenopodium rubrum*, which may explain the overexpression of glutathione peroxidase (GPX) in type I callus (8.97-fold) (Table 03). In addition, the activities of antioxidant enzymes GPXs may regulate development and plant regeneration. The overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx), a member of the GPX family, during shoot organogenesis in plants (Faltin et al. 2010) indicates that GPX is most probably modulated by ROS-dependent developmental and metabolic signals, which can alter differentiation-related events during plant regeneration (Bela et al. 2015). Additionally, some authors have suggested ROS-related proteins to be associated to cell wall elongation (Almeida et al. 2012) and cell division regulation (Takak et al. 2011). Glutathione S-transferase (GST) was also up-regulated in type I callus (Table 03). In *Medicago truncatula*, it showed a constant increase in expression in both strains, embryogenic and non-embryogenic, reflecting explant response to *in vitro* stress, even though a decrease in GST expression occurs after the first embryos are formed (Almeida et al. 2012). In *Cyclamen persicum* it

was found to be present in higher relative levels in somatic rather than in zygotic embryos, and it is also involved in the response to auxin or oxidative stress (Winkelmann et al. 2006). The overexpression of this enzyme in type I callus may be related to the addition of auxin in the induction medium. According to Karami & Saidi (2010), transcripts of GST genes were detected in abundance during auxin induction and in somatic embryos.

Catalase dismutates H_2O_2 to H_2O and O_2 in peroxisomes and is an important player in stress-induced cell apoptosis (Zhang et al. 2009). In *Vitis vinifera*, catalase protein levels were found more than 2 times higher in NEC than in EC (Zhang et al. 2009), and in the present study it was down-regulated in type I callus (Table 03). However, in *Cyclamen persicum* it was up-regulated in ES, and according to the authors it takes part in energy metabolism and amino acid metabolism (Lyngved et al. 2008).

Several strains of ribosomal proteins were expressed differently in the analyzed callus. The overexpression of proteins involved in protein biosynthesis, namely ribosomal proteins, suggests that protein metabolism is a key factor for somatic embryogenesis induction (Correia et al. 2012). However, the ribosomal protein S27 showed similar levels in highly embryogenic and non-embryogenic callus in *Medicago truncatula* (Almeida et al. 2012). Similarly, in both callus types there were differential expression of several ribosomal proteins: four were up-regulated (P02398, G5DWZ5, BOLN88, T2A7L5) while two were down-regulated (P82277, J7FB51) (Table 03).

Some proteins, although not part of the preceding categories according to the BLAST2GO results, have a significant role in *in vitro* morphogenesis of other plant species. Late embryogenesis abundant protein (LEA) was overexpressed in type II callus (4.75-fold) (Table 03). In *Ferocactus peninsulae* var. *townsendianus*, the expression of LEA protein was identified in mature seeds and seedlings subjected, or

not, to a single or multiple hydration-dehydration cycles (López-Urrutia et al. 2014). This protein is involved in protecting plants from damage caused by environmental stresses, especially drought (dehydration), as they play a role in protecting the embryo during desiccation and are formed during the late period of seed development (Zimmerman et al. 1993; Hong-Bo et al. 2005). Despite the expression of LEA proteins being related to the final stage of embryogenesis, one of the genes encoding a LEA protein, the EMB-1 LEA gene, was expressed in somatic and zygotic embryos in the early stages of embryo development (Wurtele et al. 1993). This can explain the expression of LEA protein in both callus analyzed, although somatic embryos have not been found in either. According to Zimmerman (1993), callus cells and particularly proembryogenic masses (PEMs) contained in the callus, already express many genes that will be expressed in at least the globular stage of embryogenesis. Besides being induced by desiccation stress, many of LEA protein genes can be induced by abscisic acid (ABA) (Dure, 1989; Hong-Bo et al. 2005). The ABA responsive element binding factor, a protein associated with stress response and abiotic stimuli, was also overexpressed in type II callus (109.29-fold) (Table 03).

CONCLUSIONS

This is the first study to analyze the *in vitro* callus proteome of a representative of the Cactaceae family and can serve as a basis for more advanced studies in the family, for cultivated and native species. The *in vitro* callus induction of *Stephanocereus luetzelburgii* is mainly associated with the expression of many proteins related to metabolism and stress, being induced by general culture conditions such as the exogenous addition of sucrose to the culture medium and the different stimuli for callus induction. The expression of somatic embryogenesis marker proteins mainly

related to stress response for other species suggests that the callus analyzed, especially type I callus, has potential for *in vitro* regeneration provided the ideal stimuli are offered to induce a specific route of *in vitro* development. New studies regarding *in vitro* morphogenesis are encouraged for representatives of this family since large-scale multiplication can reduce impact on natural populations, especially for native species with ornamental potential.

ACKNOWLEDGEMENT

We would like to thank the ‘Programa Nacional de Cooperação Acadêmica’ – (PROCAD) for supporting the joint research project of different institutions. M.N.G. Marchi was supported with scholarship by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

REFERENCES

- Al-Ramamneh, E. A., Sriskandarajah, S., Serek, M., 2006. Plant regeneration via somatic embryogenesis in *Schlumbergera truncate*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 84, 333–342.
- Angulo-Bejarano, P. I., and Paredes-Lopez, O. 2011. Development of a regeneration protocol through indirect organogenesis in prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill). *Scientia Horticulturae*. 128, 83–288.
- Almeida, A. M., Parreira, J. R., Santos, R., Duque, A. S., Francisco, R., Tomé, D. F. A., Ricardo, C. P., Coelho, A. V., Fevereiro, P., 2012. A proteomics study of the induction of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* using 2DE and MALDI-TOF/TOF. *Physiologia Plantarum*. 146, 236–249.
- Arunyanart, S. and Chaitrayagun, M. 2005. Induction of somatic embryogenesis in lotus (*Nelumbo nucifera* Geartn.). *Scientia Horticulturae*. 105, 411–420.
- Azoeifa, A. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. 2009. *Agronomía Mesoamericana*. 40: 153-175.

Balen, B., Krsnik-Rasol, M., Zamfir, A. D., Milošević, J., Vakhrushev, S. Y., Peter-Katalinić, J. 2006. Glycoproteomic Survey of *Mammillaria gracillis* tissues grown in vitro. *Journal of Proteome Research*. 5, 1658-1666.

Balen, B., Krsnik-Rasol, M., Zamfir, A. D., Zadro, I., Vakhrushev, S. Y., Peter-Katalinić, J. 2007. Assessment of N-Glycan Heterogeneity of Cactus Glycoproteins by One-Dimensional Gel Electrophoresis and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Biomolecular Techniques*. 18, 162–172.

Bela, K., Horváth, E., Gallé, A., Szabados, L., Tari, I., Csiszár, J., 2015. Plant glutathione peroxidases: Emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. *Journal of Plant Physiology*. 176, 192–201.

Capriotti, A.L., Caruso, G., Cavaliere, C., Foglia, P., Piovesana, S., Samperi, R., Laganà, A., 2013. Proteome investigation of the non-model plant pomegranate (*Punica granatum* L.). *Anal Bioanal Chem*. 405, 9301–9309.

Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Piovesana, S., Stampachiacchiere, S., Ventura, S., Chiozzi, R. Z., Lagana, A., 2015. Characterization of quinoa seed proteome combining different protein precipitation techniques: Improvement of knowledge of nonmodel plant proteomics. *J. Sep. Sci.* 38, 1017–1025.

Correia, S., Vinhas, R., Manadas, B., Lourenço, A. S., Veríssimo, P., Canhoto, J. M., 2012. Comparative Proteomic Analysis of Auxin-Induced Embryogenic and Nonembryogenic Tissues of the Solanaceous Tree *Cyphomandra betacea* (Tamarillo). *J. Proteome Res.* 11, 1666–1675.

Chaudhury, A. and Qu, R. 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type bermudagrass: effect of 6-benzaldehyde in callus induction medium. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 60,113 – 20.

Dávila-Figueroa, C. A., Rosa-Carrillo, M. L., Pérez-Molphe-Balch, E., 2005. *In vitro* propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). *In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant.* 41, 540–545.

Elias, H. Taha, R. M., Hasbullah, N. A., Mohamed, N. Manan, A. A., Mahmud, N., Mohajer, S., 2015. The effects of plant growth regulators on shoot formation, regeneration and coloured callus production in *Echinocereus cinerascens* in vitro. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 120, 729-739.

Estrada-Luna, A. A., Martínez-Hernández, J. J., Torres-Torres, M. E., 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.

Giles, K., Williams, J. P., Campuzano, I., 2011. Enhancements in travelling wave ion mobility resolution. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 25, 1559-1566.

Gueye, B., Saïd-Ahmed, H., Morcillo, F., Borgel, A., Sané, D., Hilbert, J.-L., Verdeil, J.-L., Blervacq, A.-S., 2009. Callogenesis and rhizogenesis in date palm leaf segments: are there similarities between the two auxin-induced pathways? *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 98, 47–58.

Haslbeck, M. and Vierling, E. 2015. A First Line of Stress Defense: Small Heat Shock Proteins and Their Function in Protein Homeostasis. *J Mol Biol*. 427, 1537–1548.

Heringer, A. S., Barroso, T., Macedo, A. F., Santa-Catarina, C., Souza, G. H. M. F., Floh, E. I. S., Souza-Filho, G. A., Silveira, V. Label-Free Quantitative Proteomics of Embryogenic and Non-Embryogenic Callus during Sugarcane Somatic Embryogenesis. *Plos One*. 2, 1-23, 2015.

Hua, Q., Chen, P., Liu, W., Ma, Y., Liang, R., Wang, L., Wang, Z., Hu, G., Qin, Y., 2015. A protocol for rapid in vitro propagation of genetically diverse pitaya. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 120, 741-745.

Hunt, D.R. 1999. *Capes Cactaceae Checklist*. Royal Botanic Gardens, Kew, 315 p.

Ikeuchi, M., Sugimoto, K., Iwase, A. 2013. Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. *The Plant Cell*. 25: 3159–3173.

Karami, O., Saidi, A. 2010. The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic Embryogenesis. *Mol Biol Rep*. 37, 2493–2507.

Khattab, S., El Sherif, F., El-Garhy, H. A., Ahmed, S., Ibrahim, A. 2014. Genetic and phytochemical analysis of the in vitro regenerated *Pilosocereus robinii* by ISSR, SDS–PAGE and HPLC. *Gene*. 533, 313–321.

Khalafalla, M. M., Abdellatef, E., Mohameed Ahmed, M. M., Osman, M. G., 2007. Micropropagation of cactus (*Opuntia ficus-indica*) as strategic tool to combat desertification in arid and semi arid regions. *Int. J. Sustain. Crop Prod*. 2, 1-8.

Khan, A. U., Di Mascio, P., Medeiros, M. H. G., Wilson. T., Spermine and spermidine protection of plasmid DNA against single-strand breaks induced by singlet oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89, 11428-11430.

- Kotak, S. Larkindale, J., Lee, U., von Koskull-Döring, P., Vierling, E., 2007. Schar, K. Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 10, 310–316.
- López-Urrutia, E., Martínez-García, M., Monsalvo-Reyes, A., Salazar-Rojas, V., Montoya, R., Campos, J. E., 2014. Differential RNA- and protein-expression profiles of cactus seeds capable of hydration memory. *Seed Science Research* 24, 91–99.
- Luge, T., Kube, M., Freiwald, A., Meierhofer, D., Seemüller, E., Sauer, S., 2014. Transcriptomics assisted proteomic analysis of *Nicotiana occidentalis* infected by *Candidatus* Phytoplasma mali strain AT. *Proteomics*. 14, 1882-1889.
- Lyngved, R., Renaut, J., Hausman, J., Iversen, T., Hvoslef-Eide, A. K., 2008. Embryo-specific Proteins in *Cyclamen persicum* Analyzed with 2-D DIGE. *J Plant Growth Regul.* 27, 353–369.
- Marsoni, M., Bracale, M., Espen, L., Prinsi, B., Negri, A. S., Vannini, C., 2008. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*. *Plant Cell Rep.* 27, 347–356.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.
- Nunez, D. G. C., Escobar, R., Caetano, C. M., Vaca, J. C. V., 2014. Estandarización de un protocolo de regeneración en pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran). *Acta Agronómica*. 63, 31-41.
- Palama, T. L., Menard, P., Fock, I., Choi, Y. H., Bourdon, E., Govinden-Soulange, J., Bahut, M., Payet, B., Verpoorte, R., Kodja, H., 2010. Shoot differentiation from protocorm callus cultures of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae): proteomic and metabolic responses at early stage. *BMC Plant Biology*. 10, 1-18.
- Pan, Z., Zhu, S., Guan, R., Deng, X., 2010. Identification of 2,4-D-responsive proteins in embryogenic callus of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) following osmotic stress. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 103, 145–153.
- Pfeiffer, W., Höftberger, M. 2001. Oxidative burst in *Chenopodium rubrum* suspension cells: Induction by auxin and osmotic changes. *Physiologia Plantarum*. 111, 144–150.
- Rode, C., Gallien, S., Heintz, D., Van Dorsselaer, A., Braun, H., 2011. Winkelmann, T. Enolases: storage compounds in seeds? Evidence from a proteomic comparison of zygotic and somatic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Mol Biol.* 75, 305–319.

- Rogié, T., Horvatié, A., Tkalec, M., Cindrié, M., Balen, B. 2015. Proteomic analysis of *Mammillaria gracilis* Pfeiff. in vitro-grown cultures exposed to iso-osmotic NaCl and mannitol. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 122, 127–146.
- Román, R. S. S., Caetano, C. M., Ramírez, H. 2014. Multiplicación de *Selenicereus megalanthus* (pitahaya amarilla) e *Hylocereus polyrhizus* (pitahaya roja) vía organogénesis somática. *Acta Agronómica.* 63, 272-281.
- Rojas-Aréchiga, M.; Vázquez-Yanes, C., 2000. Cactus seed germination: a review. *Journal of Arid Environments.* 44, 85–104.
- Rodziewicz, P., Swarczewicz, B., Chmielewska, K. Wojakowska, A., Stobiecki, M., 2014. Influence of abiotic stresses on plant proteome and metabolome changes. *Acta Physiol Plant.* 36:1–19.
- Silva, J. A. S. 2003. Thin Cell Layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. *African Journal of Biotechnology.* 2, 683-691.
- Silva, L.M., Fagundes, J. L., Viegas, P. A. A., Muniz, E. N., Rangel, J. H. A., Moreira, A. L., Backes, A. A., 2014. Cactus pear forage production under different plant densities. *Ciência Rural.* 44, 2064-2071.
- Silveira, V. Vita, A. M., Macedo, A. F., Dias, M F. R., Floh, E. I. S., Santa-Catarina, C. 2013. Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 114, 351-364
- Stein, V. C., Paiva, R., Vargas, D. P., Soares, F.P., Alves, E. Nogueira, G. F. 2010. Ultrastructural calli analysis of *Inga vera* willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. *Revista Árvore,* 34, 789-796.
- Sudharsan, C., AboEl-Nil, M., Hussain, J. 2003. Tissue culture technology for the conservation and propagation of certain native plants. *Journal of Arid Environments* 54, 133–147.
- Tan, B. C., Chin, C. F., Liddell, S., Alderson, P., 2013. Proteomic Analysis of Callus Development in *Vanilla planifolia* Andrews. *Plant Mol Biol Rep.* 31, 1220–1229.
- Taylor N, Zappi D. 2004. *Cacti of Eastern Brazil.* Kew: The Royal Botanic Gardens. 499p.
- Teodora, V. I. Investigation on the of 2,4 –dichlorophenoxyacetic acid (2,4-d) on the process of callus from in vitro cultures *Echinocactus* (piff.) *mihanovichii*. 2012. *Analele Universității din Oradea, Fascicula Protecția Mediului.* 19: 305-311.

Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A., 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*. 9, 244-251.

Werner, E. T., Cuzzuol, G. R. F., Pessotti, K. V., Lopes, F. P., Roger, J. A. 2009. Controle da calogênese do pau-brasil *in vitro*. *R. Árvore*. 33, 987-996.

Winkelmann, T., Heintz, D., Van Dorsselaer, A., Serek, M., Braun, H., 2006. Proteomic analyses of somatic and zygotic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. reveal new insights into seed and germination physiology. *Planta*. 224, 508–519.

Yin, L., Lan, Y. Zhu, L., 2008. Analysis of the protein expression profiling during rice callus differentiation under different plant hormone conditions. *Plant Mol Biol*. 68, 597–617.

Yin, L., Tao, Y., Zhao K., Shao, J., Li, X., Liu, G., Liu, S., Zhu, L., 2007. Proteomic and transcriptomic analysis of rice mature seed-derived callus differentiation. *Proteomics*, 7, 755–768.

Varhaníková, M., Uvackova, L., Skultety, L., Pretova, A., Obert, B., Hajduch, M., 2014 Comparative quantitative proteomic analysis of embryogenic and non-embryogenic calli in maize suggests the role of oxylipins in plant totipotency. *Journal of proteomics*. 104, 57-65.

Vasconcelos, J.N.C., Cardoso, N.S.N., Oliveira, L.M., Santana, J.R.F., Fernandez, L.G., Bello Koblitz, M.G., Silva, M.L.C., 2012. Indução, caracterização bioquímica e ultra-estrutural de calos de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). *Rev. Bras. Pl. Med.*, 4, 592-597.

Zhang, J., Mab, H., Chen, S., Ji, M., Perl, A., Kovacs, L., Chen, S., 2009. Stress response proteins' differential expression in embryogenic and non-embryogenic callus of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon-A proteomic approach. *Plant Science*. 177, 103–113.

SUPPLEMENTARY TABLE

Table 01. Unique protein in type I and type II callus of *Stephanocereus luetzelburgii* derived from *in vitro* tissue culture.

Accession	Peptide count	Confidence score	Description
Type I callus			
Q8MFQ7	1	54,6574	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (Fragment)
Type II callus			
G5DXB1	1	5,1072	Importin subunit alpha-1 (Fragment)
Q76K86	1	121,5242	Actin (Fragment)
A0A075J0U4	1	10,9046	Phosphoenolpyruvate carboxylase (Fragment)
I0CC95	1	16,0087	Type II peroxiredoxin
Q20CC1	1	5,104	Fgenesh protein 125
A7KBS1	1	5,5162	NADH dehydrogenase subunit 9 (Fragment)
O81336	1	69,7502	Catalase
Q9MFA4	1	5,219	Orf110a protein
Q40259	2	13,9265	MipD protein
I6PA38	2	16,8598	Maturase K (Fragment)
G5DXN1	1	25,0153	Malic enzyme (Fragment)
D7RVZ8	1	5,0755	Sex-linked protein 9 (Fragment)
U6BS35	1	23,9563	Vacuolar H ⁺ -pyrophosphatase
H6T8B0	1	58,5071	ATP synthase subunit beta (Fragment)
G2XLT5	1	10,6149	Uncharacterized protein
FENR	1	15,6568	Ferredoxin--NADP reductase, chloroplastic
Q1ZY16	1	5,2208	Fgenesh protein 72
Q41367	1	5,0263	24 kDa RNA binding protein (Fragment)
C6FJY8	1	5,292	RNA polymerase B (Fragment)
G0YEL6	1	52,093	Hypothetical chloroplast RF2 (Fragment)
D3WF16	1	5,7341	30S ribosomal protein S14, chloroplastic
G8A3M7	1	74,4215	ATP synthase subunit beta (Fragment)
VATE	1	32,9053	V-type proton ATPase subunit E
S4W8T6	1	16,4554	Alpha tubulin (Fragment)

Table 02. Up-regulated proteins.

Accession	Peptide count	Confidence score	Max fold change	Description
Response to stress				
P02398	2	10.3108	20.21	50S ribosomal protein L12, chloroplastic
P93263	32	222.462	3.56	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-- homocysteine methyltransferase
G5DW21	4	27.7716	9.98	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like protein (Fragment)
O22664	37	308.075	2.51	Cytosolic heat shock 70 protein
B5M1Y7	7	55.1395	8.97	Glutathione peroxidase
O50036	10	59.0471	20.77	Heat shock 70 protein
Q76H85	5	32.1042	6.07	Histone H4
Q93YG1	15	149.3927	19.42	Monodehydroascorbate reductase
G9JWE8	1	5.0713	17.45	Phytochelatin synthase
H9BFL0	11	62.6501	3.95	Putative luminal binding protein 7B4 (Fragment)
Q9LKP3	1	10.2316	20.66	Putative potassium channel protein Mkt1p
C3UMT2	1	10.7356	10.88	Putative uncharacterized protein 09HZ3 (Fragment)
Q9M5K6	1	10.6254	10.82	rRNA N-glycosidase OS=Chenopodium album
I3NVX2	25	166.4147	14.73	V-type ATPase subunit A
Q76LA9	1	5.3694	10.20	WRKY transcription factor 1
Response to abiotic stimulus				
P93263	32	222.462	3.56	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-- homocysteine methyltransferase
O24360	1	5.3459	6.09	CP12
Q76H85	5	32.1042	6.07	Histone H4
Q93YG1	15	149.3927	19.42	Monodehydroascorbate reductase
G9JWE8	1	5.0713	17.45	Phytochelatin synthase
H9BFL0	11	62.6501	3.95	Putative luminal binding protein 7B4 (Fragment)
Q9LKP3	1	10.2316	20.66	Putative potassium channel protein Mkt1p
I3NVX2	25	166.4147	14.73	V-type ATPase subunit A
Response to biotic stimulus				
P02398	2	10.3108	20.21	50S ribosomal protein L12, chloroplastic
G9JWE8	1	5.0713	17.45	Phytochelatin synthase
Q76LA9	1	5.3694	10.20	WRKY transcription factor 1
Protein metabolic process/ metabolic process				
P93263	32	222.462	3.56	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-- homocysteine methyltransferase
H2EP74	7	49.8767	3.93	ADP-ribosylation factor 1
Q5QJY8	8	56.9824	32.04	Alcohol dehydrogenase
Q5PT35	2	11.5554	7.52	Aspartic proteinase 9
S4S7H4	2	11.3336	4.35	Betaine aldehyde dehydrogenase
O81919	8	55.1683	9.22	Calreticulin
P41210	2	16.2298	133.52	Caltractin
Q3LFN3	1	5.0548	128.38	Cysteine proteinase (Fragment)
T1DFB3	1	5.0522	25.55	Cytochrome P450 71A25 (Fragment)
O22664	37	308.075	2.51	Cytosolic heat shock 70 protein

G5DXF7	1	5.1542	29.56	DNA polymerase alpha subunit B family protein (Fragment)
I6PD11	3	15.5249	3.05	Glutamate synthase
Q9AXD1	5	28.4672	176.49	Glutamine synthetase
B5M1Y7	7	55.1395	8.97	Glutathione peroxidase
Q0PVD1	2	11.8083	2.50	Glutathione S-transferase
A0A076E907	16	163.8161	47.05	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Fragment)
C7E3U4	16	164.3645	9.37	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C-2 (Fragment)
R9UE81	1	10.0744	3.26	Glyoxylate aminotransferase (Fragment)
O50036	10	59.0471	20.77	Heat shock 70 protein
Q42434	28	163.5961	2.68	Luminal-binding protein
Q4H1G2	25	166.4654	2.61	Methionine synthase
Q93YG1	15	149.3927	19.42	Monodehydroascorbate reductase
D0QM29	4	26.3072	2.82	NADH dehydrogenase subunit 9 (Fragment)
P37223	6	46.5517	119.38	NADP-dependent malic enzyme
P93268	1	5.8734	2.93	Nt-rab11e homolog (Fragment)
G9JWE8	1	5.0713	17.45	Phytochelatin synthase
I6TMC2	1	5.1137	12.44	Plasma membrane P450 CYP81B2
R4V0U6	1	5.3439	3.06	Putative cytochrome P450
H9BFL0	11	62.6501	3.95	Putative luminal binding protein 7B4 (Fragment)
Q9XGA1	5	31.3414	29.92	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 4
P93254	10	79.9645	17.19	S-adenosylmethionine synthase
Q5EVL8	2	10.4502	11.86	Spermidine synthase (Fragment)
Q94IA8	1	5.206	271.65	Transketolase
Q8GUB4	4	26.2507	2.34	Vacuolar ATPase subunit G
I3NVX2	25	166.4147	14.73	V-type ATPase subunit A
Q76LA9	1	5.3694	10.20	WRKY transcription factor 1

Carbohydrate metabolic process

Q42908	2	10.8729	2.84	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase
Q06SN0	1	11.4548	19.66	Acid chitinase
Q9S9F7	3	16.0041	4.22	Chitinase-B, PLC-B
O24360	1	5.3459	6.09	CP12
Q9XFW8	1	5.0298	11.02	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase
Q93YG1	15	149.3927	19.42	Monodehydroascorbate reductase
P37223	6	46.5517	119.38	NADP-dependent malic enzyme
I3NVX2	25	166.4147	14.73	V-type ATPase subunit A

Lipid metabolic process

Q5PT35	2	11.5554	7.52	Aspartic proteinase 9
P37223	6	46.5517	119.38	NADP-dependent malic enzyme
G5DW63	2	10.8491	2.50	Phosphatidylserine decarboxylase (Fragment)
G9JWE8	1	5.0713	17.45	Phytochelatin synthase

Photosynthesis

O24360	1	5.3459	6.09	CP12 OS=Spinacia oleracea
T1DFB3	1	5.0522	25.55	Cytochrome P450 71A25 (Fragment)

H2BBI3	1	5.4765	31.05	NADH dehydrogenase subunit 4L (Fragment)
P12355	1	10.3846	17.71	Photosystem I reaction center subunit III, chloroplastic
G9JWE8	1	5.0713	17.45	Phytochelatin synthase
Cell differentiation				
Q9LKP3	1	10.2316	20.66	Putative potassium channel protein Mkt1p
C3UMT2	1	10.7356	10.88	Putative uncharacterized protein 09HZ3 (Fragment)
Cell growth				
Q9LKP3	1	10.2316	20.66	Putative potassium channel protein Mkt1p
I3NVX2	25	166.4147	14.73	V-type ATPase subunit A
Cell cycle				
P41210	2	16.2298	133.52	Caltractin
G5DXF7	1	5.1542	29.56	DNA polymerase alpha subunit B family protein (Fragment)
Anatomical structure morphogenesis				
Q9LKP3	1	10.2316	20.66	Putative potassium channel protein Mkt1p
C3UMT2	1	10.7356	10.88	Putative uncharacterized protein 09HZ3 (Fragment)
I3NVX2	25	166.4147	14.73	V-type ATPase subunit A
Cellular component organization				
P41210	2	16.2298	133.52	Caltractin
G5DXF7	1	5.1542	29.56	DNA polymerase alpha subunit B family protein (Fragment)
B5M1Y7	7	55.1395	8.97	Glutathione peroxidase
Q76H85	5	32.1042	6.07	Histone H4
P37223	6	46.5517	119.38	NADP-dependent malic enzyme
G9JWE8	1	5.0713	17.45	Phytochelatin synthase
Q9LKP3	1	10.2316	20.66	Putative potassium channel protein Mkt1p
C3UMT2	1	10.7356	10.88	Putative uncharacterized protein 09HZ3 (Fragment)
I3NVX2	25	166.4147	14.73	V-type ATPase subunit A
Transport/transporter activity				
H2EP74	7	49.8767	3.93	ADP-ribosylation factor 1
O24360	1	5.3459	6.09	CP12
V9PER9	1	5.25	114.17	envelope membrane protein, chloroplastic
P93265	3	15.5385	3.92	H ⁺ -transporting ATPase
T1D1H9	2	15.3775	2.35	Magnesium transporter (Fragment)
H2BBI3	1	5.4765	31.05	NADH dehydrogenase subunit 4L (Fragment)
P93268	1	5.8734	2.93	Nt-rab11e homolog (Fragment)
G9JWE8	1	5.0713	17.45	Phytochelatin synthase
Q9MB82	2	11.0981	3.36	Plasma membrane H ⁺ -ATPase (Fragment)
Q39439	2	11.8202	2.46	Plasma membrane major intrinsic protein 1
Q9LKP3	1	10.2316	20.66	Putative potassium channel protein Mkt1p
Q8GUB5	17	132.6658	3.10	Vacuolar ATPase subunit B
Q8GUB4	4	26.2507	2.34	Vacuolar ATPase subunit G
I3NVX2	25	166.4147	14.73	V-type ATPase subunit A
Other				
G5DWZ5	1	5.189	2.40	40S ribosomal protein S11-1 (Fragment)
O22334	1	5.0626	8.39	ACC synthase

K4NPF7	4	21.4644	7.15	ACD-sHsps-like protein AP2 domain-containing transcription factor (Fragment)
H9BP01	1	5.0313	3.38	
J7LC19	1	5.2093	2.56	Calcium dependent protein kinase 3
Q19T65	1	10.7698	12.07	CYCLOIDEA-like (Fragment)
Q7M1L4 A0A075VN P0	1	5.3748	40.68	Dodecandrin (Fragment)
Q7XBL5	2	10.7645	278.64	FRIGIDA-like protein (Fragment)
Q8WKL9	2	10.2609	30.45	FRUITFULL-like MADS-box (Fragment)
Q8WKL9	6	43.4946	28.41	Maturase K
G5DW09	1	5.4191	7.13	Nucleotidyltransferase family protein (Fragment)
K9J9X6	3	15.6265	41.13	Phenylalanine ammonia-lyase
G5DWJ6	3	20.8853	2.92	Protein TRF-like protein (Fragment)
B2LGI0	1	5.2517	14.89	Putative fructose-2,6-bisphosphatase (Fragment)
E9N1E2	1	5.2824	2.62	Putative oxoglutarate dehydrogenase (Fragment)
E6ZE07	1	10.9458	28.71	Putative uncharacterized protein orf103a
E8ZC96	1	5.0345	3.93	Putative uncharacterized protein orf224b
E6ZE72	1	10.026	2.89	Putative uncharacterized protein orf270
B0LN88	2	10.4429	3.69	Ribosomal protein S12 (Fragment)
T2A7L5	1	5.8576	13.56	Ribosomal protein S16 (Fragment)
Q008N3	2	10.8578	3.25	RNA polymerase I (Fragment)
B5T3F8	1	11.1494	7.39	RNA polymerase subunit (Fragment)
Q8L5T3	2	15.3024	65.97	Rubisco activase
T1YW73	2	15.8064	20.64	Salinity-induced protein
O80394	1	10.4474	42.79	Transcription factor Vp1

Table 03. Down-regulated proteins.

Accession	Peptide count	Confidence score	Max fold change	Description
Response to stress				
N0DR69	1	5.3261	109.29	ABA responsive element binding factor
Q6IVX4	2	19.3684	78.47	Basic chitinase 2-1
W0FHL5	32	277.8355	3.86	Catalase
A1YGW7	2	15.5999	14.15	Drought-induced protein DRI15
Q05832	9	50.4024	3.79	Heat shock protein 18.3 kDa class I
E5LLE0	9	52.7575	5.91	Heat shock protein Hsp18.3
O65178	6	57.7234	4.85	Major latex protein homolog
P29409	6	52.3808	2.38	Phosphoglycerate kinase, chloroplastic (Fragment)
Q9AVU8	29	202.8883	2.90	Putative vacuolar ATP Synthase subunit A
C1KEU0	20	127.1437	7.04	Sal k 3 pollen allergen (Fragment) Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta (Fragment)
G5DX89	2	20.8194	27.48	
Response to abiotic stimulus				
N0DR69	1	5.3261	109.29	ABA responsive element binding factor

G5DWR5	2	11.4837	3.69 Chloroplast stem-loop binding protein (Fragment)
G5DXB4	2	10.3351	2.35 Mitotic spindle assembly checkpoint protein (Fragment)
P29409	6	52.3808	2.38 Phosphoglycerate kinase, chloroplastic (Fragment)
Q717V7	6	37.2604	3.51 Phytochrome
P00289	1	5.2664	26.13 Plastocyanin, chloroplastic
Q9AVU8	29	202.8883	2.90 Putative vacuolar ATP Synthase subunit A
C1KEU0	20	127.1437	7.04 Sal k 3 pollen allergen (Fragment)
G5DX89	2	20.8194	27.48 Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta (Fragment)

Response to biotic stimulus

O65178	6	57.7234	4.85 Major latex protein homolog
P29409	6	52.3808	2.38 Phosphoglycerate kinase, chloroplastic (Fragment)

Protein metabolic process/metabolic process

C4TGA6	1	5.0783	3.80 4,5-DOPA dioxygenase
O65162	4	32.0651	98.27 Caffeoyl-CoA O-methyltransferase
W0FHL5	32	277.8355	3.86 Catalase
Q9FVE4	4	27.7318	26.91 Dehydroascorbate reductase
B5MGN9	5	32.4758	2.61 Glucosyltransferase
P17878	22	197.2137	4.22 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic
G1DE54	7	46.0537	14.84 Malic enzyme
G5DXB4	2	10.3351	2.35 Mitotic spindle assembly checkpoint protein (Fragment)
P16097	10	70.779	3.99 Phosphoenolpyruvate carboxylase 2
P29409	6	52.3808	2.38 Phosphoglycerate kinase, chloroplastic (Fragment)
Q717V7	6	37.2604	3.51 Phytochrome
P00289	1	5.2664	26.13 Plastocyanin, chloroplastic
E3VW74	25	173.0785	3.75 Pollen allergen MetE (Fragment)
Q9AVU8	29	202.8883	2.90 Putative vacuolar ATP Synthase subunit A
C1KEU0	20	127.1437	7.04 Sal k 3 pollen allergen (Fragment)
G5DX89	2	20.8194	27.48 Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta (Fragment)

Carbohydrate metabolic process

Q6IVX4	2	19.3684	78.47 Basic chitinase 2-1
P29356	12	85.4416	85.15 Fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme
P17878	22	197.2137	4.22 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic
G1DE54	7	46.0537	14.84 Malic enzyme
P93262	7	49.5928	4.95 Phosphoglucomutase, cytoplasmic
P29409	6	52.3808	2.38 Phosphoglycerate kinase, chloroplastic (Fragment)
P00289	1	5.2664	26.13 Plastocyanin, chloroplastic
Q41386	4	35.7038	4.07 Pullulanase OS=Spinacia oleracea
Q9AVU8	29	202.8883	2.90 Putative vacuolar ATP Synthase subunit A
G5DX89	2	20.8194	27.48 Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta (Fragment)
T1E154	2	11.1276	3.58 Transaldolase (Fragment)

Lipid metabolic process

P82277	2	15.3091	52.26	30S ribosomal protein 2, chloroplastic
B2LP40	1	5.519	6.16	Acetyl-CoA carboxylase D (Fragment)
G1DE54	7	46.0537	14.84	Malic enzyme
P29409	6	52.3808	2.38	Phosphoglycerate kinase, chloroplastic
Q41386	4	35.7038	4.07	Pullulanase
Photosynthesis				
P82277	2	15.3091	52.26	30S ribosomal protein 2, chloroplastic
G5DWR5	2	11.4837	3.69	Chloroplast stem-loop binding protein (Fragment)
P16097	10	70.779	3.99	Phosphoenolpyruvate carboxylase 2
P29409	6	52.3808	2.38	Phosphoglycerate kinase, chloroplastic (Fragment)
V9PEV8	3	21.2905	4.58	Photosystem II CP47 chlorophyll apoprotein
Cell differentiation				
G5DWR5	2	11.4837	3.69	Chloroplast stem-loop binding protein (Fragment)
P00289	1	5.2664	26.13	Plastocyanin, chloroplastic
Cell growth				
P00289	1	5.2664	26.13	Plastocyanin, chloroplastic
Q9AVU8	29	202.8883	2.90	Putative vacuolar ATP Synthase subunit A
Cell cycle				
G5DXB4	2	10.3351	2.35	Mitotic spindle assembly checkpoint protein (Fragment)
Anatomical structure morphogenesis				
G5DWR5	2	11.4837	3.69	Chloroplast stem-loop binding protein (Fragment)
P00289	1	5.2664	26.13	Plastocyanin, chloroplastic
Q9AVU8	29	202.8883	2.90	Putative vacuolar ATP Synthase subunit A
Cellular component organization				
G5DWR5	2	11.4837	3.69	Chloroplast stem-loop binding protein (Fragment)
Q9FVE4	4	27.7318	26.91	Dehydroascorbate reductase
Q9AXQ7	3	23.1988	4.12	Eukaryotic translation initiation factor 5A
H9BNZ7	4	33.9202	3.10	Eukaryotic translation initiation factor 5A4
G1DE54	7	46.0537	14.84	Malic enzyme
G5DXB4	2	10.3351	2.35	Mitotic spindle assembly checkpoint protein (Fragment)
P29409	6	52.3808	2.38	Phosphoglycerate kinase, chloroplastic (Fragment)
P00289	1	5.2664	26.13	Plastocyanin, chloroplastic
P93690	1	10.255	5.20	Preprotein translocase subunit SECY, chloroplastic
Q41386	4	35.7038	4.07	Pullulanase
Q9AVU8	29	202.8883	2.90	Putative vacuolar ATP Synthase subunit A
G5DX89	2	20.8194	27.48	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta (Fragment)
G5DXD0	3	16.1368	3.10	Tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein (Fragment)
Transport/transporter activity				
P82277	2	15.3091	52.26	30S ribosomal protein 2, chloroplastic
H8XXL8	7	63.8723	5.51	Bobbit
P29409	6	52.3808	2.38	Phosphoglycerate kinase, chloroplastic (Fragment)
W8GLE8	5	32.4664	6.77	Plasma membrane ATPase 4
P00289	1	5.2664	26.13	Plastocyanin, chloroplastic

P93690	1	10.255	5.20	Preprotein translocase subunit SECY, chloroplastic
K4GMP7	4	26.6274	3.17	Putative potassium transporter KUP5 (Fragment)
Q9AVU8	29	202.8883	2.90	Putative vacuolar ATP Synthase subunit A
Q8VXT2	1	5.3151	3.05	V-ATPase subunit c (Fragment)
Q9FEH7	2	10.9434	2.40	V-type H(+)-ATPase subunit E (Fragment)
Other				
Q9M642	1	11.2732	148.24	22kDa storage protein (Fragment)
J7LKB6	3	15.7544	2.89	Calcium dependent protein kinase 2
P04353	10	86.5719	5.59	Calmodulin FtsJ-like methyltransferase family protein
G5DVX5	4	25.9008	5.76	(Fragment)
W8E425	1	5.1713	4.75	Late embryogenesis abundant protein (Fragment)
O02983	2	10.5453	17.75	ORF2280 gene homolog (Fragment)
Q5U689	5	27.6556	10.32	Orf670 protein
P08973	27	177.7041	4.44	Protein Ycf2 Putative calcium dependent protein kinase
B2LGJ0	9	58.7357	3.03	(Fragment)
Q8RW11	1	12.486	101.70	Putative glycine rich protein
Q0PEL6	9	46.9984	40.61	Putative integrase
E6ZDX4	3	15.8233	3.39	Putative uncharacterized protein orf102e
J7FB51	4	21.9498	6.38	Ribosomal protein L5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Para a indução da organogênese direta de brotos *Discocactus zehntneri* subsp *boomianus*, sugere-se a utilização de explantes transversais em meio MS isento de regulador vegetal;
- A indução de calo com potencial morfogênético em *D. zehntneri* ocorreu no explante tipo TCL (*thin cell layer*) em meio MS suplementado com picloram cultivado no escuro. Para tanto, a utilização de meios nutritivos suplementados com a menor concentração de regulador são mais indicados;
- O protocolo de vitrificação aplicado para a conservação de brotos de *D. zehntneri* não foi eficiente para manutenção da integridade dos tecidos após a exposição ao nitrogênio líquido (-196°C);
- A manutenção da qualidade fisiológica tanto para sementes armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) quanto em ultrafreezer (-80°C) asseguram que a conservação *ex situ* de sementes de *D. zehntneri* pode ser uma alternativa para conservação dos recursos genéticos dessa espécie;
- Os agentes osmóticos sacarose e manitol foram eficientes em inibir o crescimento *in vitro* da espécie por um ano sem perda na viabilidade;
- A multiplicação de *Stephanocereus luetzelburgii* pode ocorrer em meio MS isento de regulador vegetal e associações entre citocininas e auxinas induziram a formação de brotos hiperídricos;
- A aclimatização e enraizamento de brotos de *S. luetzelburgii* normais podem ocorrer simultaneamente em condições *ex vitro* apresentando 100% de sobrevivência;

- A multiplicação de cinco genótipos de *S. luetzelburgii* ao longo de quatro gerações sucessivas manteve o potencial morfogenético e a estabilidade genotípica;
- A indução *in vitro* em calos de *S. luetzelburgii* está relacionada à expressão de proteínas relacionadas com o metabolismo e stress, sendo induzida por condições gerais cultura, tais como a adição exógena de sacarose no meio de nutritivo e os diferentes estímulos para a indução de calo;
- A expressão de proteínas marcadoras de embriogênese somática sugere que as linhagens de calo analisadas, especialmente calo do tipo I, tem um potencial para a regeneração *in vitro*, desde que os estímulos específicos sejam oferecidos para induzir uma via específica de desenvolvimento.