

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
CURSO DE AGRONOMIA  
AGR99006 - DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**Joana Dalpiaz Schmidt**

**278979**

***“MICROPROPAGAÇÃO COMO ALTERNATIVA DE PROPAGAÇÃO VEGETATIVA  
DE SEQUOIA E PITAYA”***

PORTO ALEGRE, março de 2021.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA**  
**CURSO DE AGRONOMIA**

**MICROPROPAGAÇÃO COMO ALTERNATIVA DE PROPAGAÇÃO**  
**VEGETATIVA DE SEQUOIA E PITAYA**

**Joana Dalpiaz Schmidt**

**278979**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do Grau de Engenheiro Agrônomo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Supervisor de campo do Estágio: Prof. Dr. Eng. Agr. Ángel Villegas Monter

Orientador Acadêmico do Estágio: Prof. Dr. Eng. Agr. Sérgio Francisco Schwarz

**COMISSÃO DE AVALIAÇÃO**

Professor Pedro Selbach, Depto de Solos, Coordenador

Professor José Antônio Martinelli, Depto de Fitossanidade

Professor Sérgio Tomasini, Depto de Horticultura e Silvicultura

Professor André Brunes, Depto de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia

Professora Renata Pereira da Cruz, Depto de Plantas de Lavoura

Professor Alberto Inda Jr., Depto de Solos

Professor Alexandre Kessler, Depto de Zootecnia

PORTO ALEGRE, março de 2021.

## AGRADECIMENTOS

A todas as professoras e professores dessa Faculdade, por todos os ensinamentos e vivências ao longo do curso, pelo empenho dedicado aos alunos.

Ao meu orientador nesse trabalho, Sérgio, pela disponibilidade e auxílio nessa etapa tão importante da vida acadêmica.

Ao meu orientador de campo Dr. Villegas, por aceitar me orientar e por me receber tão bem, pela incrível oportunidade de aprendizado, e por ser além de professor, ser uma pessoa inspiradora.

Aos colegas de laboratório que tanto enriqueceram minha vivência, Sandra, Rosalba, Vero, Gabo, Grizel e Iris. A Adriana, querida amiga que me recebeu e que tornou minha estadia em Texcoco e no México muito mais fácil e divertida, me emprestando sua casa e família.

À pesquisadora Raquel Paz da Silva, por toda a atenção e ajuda que me deu ao longo dos anos de estágio e na elaboração desse trabalho, e por me oferecer a grande oportunidade de estagiar no Colegio de Postgraduados.

Aos amigos feitos nesse período, que deixaram minha vida mais leve e divertida, por todos os momentos vividos juntos.

Ao amigo Lucas Morais Cardoso, por ter me ajudado a não desistir da faculdade lá no início, pelas tantas risadas e caronas nesses anos de free-way.

Ao meu orientador de Iniciação Científica, professor e grande amigo Roberto Weiler, por toda ajuda, apoio e churrascos.

À Mike, querida companheira de tantos anos que perdi durante esta jornada.

Às minhas irmãs, Renata e Isaura, por todo apoio que me deram, cada uma à sua maneira.

Ao meu pai José Alberto Schmidt, por me mostrar o amor pela agronomia e plantar em mim esse cuidado com as plantas.

À minha mãe Mirta Elena Dalpiaz Schmidt, por todos os sacrifícios feitos para me dar tudo o que preciso, por sonhar comigo os meus sonhos, e por lutar ao meu lado, por mais que as vezes isso significasse procurar plantas ou pegar insetos.

## RESUMO

O estágio curricular obrigatório foi realizado no Colégio de Postgraduados, campus Montecillo, na cidade de Texcoco de Mora, México. O objetivo foi aprimorar conhecimentos adquiridos em propagação de plantas durante a graduação, realizando testes de propagação *in vitro*. Os experimentos desenvolvidos no Laboratório de Propagação In Vitro foram realizados com sequoia (*Sequoia sempervirens*) e pitaya (*Hylocereus undatus*), empregando-se os seguintes métodos: Para *S. sempervirens*, testou-se o efeito de duas citocininas, sob duas concentrações (2 e 4 mg/L), em explantes já estabelecidos *in vitro*. Para *H. undatus*, realizou-se o estabelecimento *in vitro* de gemas, visando testar formas de desinfestação, meio de cultivo e desoxidação. Ambos os estudos corroboram para o aprimoramento de protocolos de micropropagação das espécies utilizadas.

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1</b> Altura média das plântulas, número médio de ramos e tamanho médio - das ramificações a partir de dois tipos de explante de sequoia micropropagadas (Texcoco de Mora, México, 2020).....	<b>15</b>

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b> - Árvore de sequoia.....	<b>9</b>
<b>Figura 2</b> - Explantes propagados, divididos em tratamentos e armazenados em sala de crescimento (Texcoco de Mora, México, 2020).....	<b>13</b>
<b>Figura 3</b> - Ilustração da divisão do explante inicial de sequoia (a) e momento da propagação (b) (Texcoco de Mora, México, 2020).....	<b>13</b>
<b>Figura 4</b> - Marcação da altura do explante no frasco que o acondicionava como avaliação indireta do crescimento semanal (Texcoco de Mora, México, 2020).....	<b>14</b>
<b>Figura 5</b> - Avaliação da massa fresca do conjunto de repetições que compunham um tratamento (a), medição do tamanho final do explante (b) e maceração do material vegetal (Texcoco de Mora, México, 2020).....	<b>14</b>
<b>Figura 6</b> - Cladódio de pitaya jovem (a) e cladódio de pitaya mais desenvolvido, com raízes aéreas (b) (Cazones de Herrera, México, 2020).....	<b>16</b>
<b>Figura 7</b> - Segmentos dos cladódios de pitaya após o corte dos espinhos (a) e desinfestação em hipoclorito (b) (Texcoco de Mora, México, 2020).....	<b>17</b>
<b>Figura 8</b> - Gemas de pitaya no dia do estabelecimento, em sala de crescimento (Texcoco de Mora, México, 2020).....	<b>17</b>
<b>Figura 9</b> - Explantes de pitaya com: expressiva oxidação (a), reduzida oxidação (b), apresentando contaminação fúngica (c). Ilustração dos subcultivos de explantes de pitaya não contaminados em meios com e sem carvão ativado (d) (Texcoco de Mora, México, 2020).....	<b>18</b>
<b>Figura 10</b> - Tricomias na gema de pitaya, vistos em estereoscópio (Texcoco de Mora, México, 2020).....	<b>19</b>
<b>Figura 11</b> - Anelamento realizado em ramo de lichia para realização de alporquia (a), alporquia finalizada (b), enxertia de garfagem (c) e de borbulhia em plantas cítricas (d) (Cazones de Herrera, México, 2020).....	<b>20</b>

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>7</b>
<b>2. CARACTERIZAÇÃO DA INSTITUIÇÃO DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO.....</b>	<b>7</b>
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>8</b>
<b>3.1 Micropropagação.....</b>	<b>8</b>
<b>3.2 Propagação de Sequoia.....</b>	<b>9</b>
<b>3.3 Propagação de Pitaya.....</b>	<b>10</b>
<b>4. ATIVIDADES REALIZADAS.....</b>	<b>12</b>
<b>4.1 Teste de concentrações de citocininas no subcultivo de sequoia.....</b>	<b>12</b>
<b>4.1.1 Material e Métodos.....</b>	<b>12</b>
<b>4.1.2 Resultados obtidos.....</b>	<b>15</b>
<b>4.2 Estabelecimento de cultivo de gemas de pitaya <i>in vitro</i>.....</b>	<b>15</b>
<b>4.2.1 Material e Métodos.....</b>	<b>15</b>
<b>4.2.2 Resultados obtidos.....</b>	<b>19</b>
<b>4.3 Outras atividades.....</b>	<b>19</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>5.1 Sequoia.....</b>	<b>21</b>
<b>5.2 Pitaya.....</b>	<b>21</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>22</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>23</b>
<b>8. APÊNDICES.....</b>	<b>26</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A multiplicação de plantas *in vitro* é uma técnica que vem se mostrando de extrema importância para a propagação vegetativa de plantas que apresentam dificuldades na sua reprodução natural. Seja pela inviabilidade de sementes ou pelo reduzido número de plantas existentes, a micropropagação oferece uma alternativa para multiplicar plantas ameaçadas.

A propagação por organogênese utiliza-se de pequenas porções de tecidos vegetais para regenerar uma planta a partir da diferenciação de células de calo celular, através da utilização de hormônios adicionados ao meio de cultivo. A indução da formação da parte aérea anteriormente ao sistema radicular; mostra-se o meio mais fácil de regeneração de plantas pela organogênese (FIOR, 2014).

Para o emprego dessa técnica, recomenda-se a utilização de explantes retirados de órgãos recentemente formados, uma vez que esses apresentam maior potencial de gerar o crescimento e a organogênese *in vitro*, como é o caso do cultivo de gemas. A realização deste trabalho de pesquisa justifica-se no interesse agrônomo sobre as espécies, além de possuir um viés de conservação.

A árvore de sequoia apresenta características de alto valor industrial e interesse agrônomo, como sua resistência a ataques de patógenos e doenças, tolerância a condições climáticas adversas, crescimento vigoroso e alta qualidade da madeira, tendo ainda usos ornamentais, na produção de compensado e para fins de reflorestamento (Arnaud et al., 1993; Sul e Korban, 2005), reforçando a necessidade de sua preservação e perpetuação da espécie.

O termo genérico ‘pitaya’ ou ‘pitahaya’ inclui várias espécies diferentes, porém apenas algumas são encontradas no mercado: pitaya amarela [*Selenicereus megalanthus* (Schum.) Britt & Rose], uma fruta com casca amarela e polpa branca, ou a pitaya vermelha, fruta com casca rosa e polpa branca (*Hylocereus polyrhizus*) ou rosa (*H. costaricensis*), dependendo da espécie. Entretanto, a pitaya apresenta enorme diversidade genética, e com frequência surgem no mercado novas cultivares, ressaltando a necessidade de conservação de seu germoplasma.

A pesquisa foi desenvolvida no Colegio de Postgraduados (Colpos), localizado em Texcoco de Mora, cidade vizinha à Cidade do México, no período de 08 de janeiro a 06 de março de 2020, com uma carga horária total de 300 horas. O supervisor de campo foi o pesquisador e professor da instituição Dr. Ángel Villegas Monter.

O estágio objetivou proporcionar vivência em laboratório de cultivo de tecidos, aprimorando os conhecimentos obtidos na faculdade e em iniciação científica, principalmente com o estabelecimento e melhoramento de protocolos de propagação.



## **2. CARACTERIZAÇÃO DA INSTITUIÇÃO DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO**

O estágio foi realizado no Colégio de Postgraduados, escola de pós-graduação em agricultura na cidade de Texcoco de Mora, no Estado do México, distante 25 km a nordeste da capital, a Cidade do México. A cidade, fundada em 1551 pelos espanhóis, já foi a segunda mais importante do país, tornando-se com o tempo mais rural, e atualmente é uma cidade universitária. Parte do município era coberta pelo lago Texcoco, que, desde o período colonial, vem sendo drenado.

Fundada em 1959 como parte da então Escuela Nacional para la Agricultura, hoje Universidad Autónoma Chapingo, dedicada exclusivamente à formação de profissionais de todas as áreas da Agronomia, destaca-se como uma instituição líder em ciências agrícolas e agroalimentares no México e na América Latina. Atualmente, conta com 7 campi em diferentes regiões do país e oferta aos estudantes 38 cursos de pós-graduação, em nível de mestrado e doutorado, em todas as áreas da pesquisa agropecuária.

As atividades de pesquisa concentraram-se no Laboratório de Fruticultura e Micropropagação, no prédio de Genética do campus Montecillo, onde realizam-se pesquisas relacionadas ao melhoramento de frutíferas, manejo de pragas e doenças, biologia celular, interações entre microrganismos e plantas, além da micropropagação de diversas espécies de interesse agrícola.

Realizou-se um treinamento em propagação vegetativa de plantas na cidade de Cazonas de Herrera, no estado de Veracruz, no Viveiro Cazonas, onde se produz mudas de cítricos, um dos poucos viveiros certificados no estado. A pequena cidade, localizada na costa leste do país, caracteriza-se pelas plantações de cítricos e enfrenta, no momento, sérios problemas fitossanitários causados pela ocorrência simultânea de algumas moléstias, como sorose, exocorte, huanglongbing e tristeza, causando perdas aos produtores, ocasionando até mesmo erradicação total de alguns pomares.

## **3. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **3.1 Micropropagação**

A micropropagação é uma ferramenta da biotecnologia vegetal em que fragmentos de plantas são induzidos à multiplicação em ambiente controlado (*in vitro*). É um método de propagação artificial e sob total assepsia do meio de cultivo, que se baseia na totipotencialidade. A totipotência é a capacidade de reverter a diferenciação celular, e apenas células vegetais a apresentam. Quando células diferenciadas são removidas da planta e colocadas em cultura de tecidos, sendo fornecidos os nutrientes e hormônios apropriados, é

possível regenerar uma planta completa (FIOR, 2014).

No início dos anos 1960, quando a totipotência das células vegetais foi descrita e a regeneração de um grande número de plantas a partir de pequenos pedaços de tecidos somáticos pôde ser alcançada, a cultura de tecidos foi projetada como um método alternativo potencial para a propagação clonal rápida de plantas (MURASHIGE, 1974).

Além da multiplicação de plantas de interesse agrônômico, entre as principais aplicações da micropropagação estão a hibridação interespecífica, o resgate de embriões, a propagação de plantas ameaçadas de extinção, a obtenção de mudas em menor tempo com facilidade de manuseio e transporte e a eliminação de viroses (SILVA, 2016).

No Brasil, estudos pioneiros com cultura de tecidos foram desenvolvidos durante a década de 1950 pelo Instituto Biológico de São Paulo. Atualmente, a cultura de tecidos, além da pesquisa, apresenta também fins comerciais, como a produção em massa de mudas por empresas especializadas na produção das mesmas. As biofábricas no Brasil dedicam-se principalmente à propagação de espécies ornamentais e frutíferas, e existem atualmente 111 registros ativos no RENASEM (Registro Nacional de Sementes e Mudanças).

### 3.2. Propagação de sequoia

A sequoia (*Sequoia sempervirens*), árvore gigantesca de crescimento lento (Figura 1), encontra-se atualmente em risco de extinção e tem recebido, desde 2006, um status de conservação vulnerável pela União Internacional para a Conservação da Natureza, devido, principalmente, à reprodução dificultada da mesma. Distribuiu-se de forma nativa ao longo das áreas dos EUA que costeiam o Oceano Pacífico, desde o sudeste do Oregon, estendendo-se até o norte da Califórnia (SAWYER et al., 2000).

**Figura 1:** Árvore de sequoia.



Autor: Roberto Luis Weiler

Além de possuir reduzida capacidade de enraizamento, dormência e baixa germinação de sementes (abaixo de 10%), apresenta também baixa viabilidade de plântulas (DONNET, 1984; BOURGKARD e FAVRE, 1989). Devido ao comportamento recalcitrante que as sementes de sequoia exibem (BOULAY, 1979), o armazenamento de sementes em um banco de germoplasma é uma opção ineficaz para a preservação desta espécie. Neste sentido, técnicas de micropropagação têm sido amplamente utilizadas na multiplicação e conservação de espécies cuja propagação e armazenagem é dificultada, como na sequoia.

Existem estudos de micropropagação de coníferas utilizando-se diferentes tipos de explantes. Segundo Korban e Sul (2006), explantes para micropropagação devem ser derivados de tecidos somáticos de plantas maduras o suficiente para demonstrar seu valor. Conforme Arnaud et al. (1993), em mesmas condições, explantes derivados da região apical, formados recentemente, exibem melhores respostas, motivando a utilização de meristemas como material vegetativo para a propagação no presente experimento.

De acordo com Vasile et al. (2015), alguns dos fatores exógenos que afetam o desenvolvimento de explantes *in vitro* incluem as características do meio de cultivo, os fitormônios adicionados aos mesmos e as condições em que o cultivo se dá. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar a utilização de dois fitormônios, em duas concentrações diferentes, a fim de verificar seus efeitos na propagação da sequoia.

### **3.3. Propagação de pitaya**

A introdução e domesticação de frutas exóticas como a pitaya pode ser uma solução possível para mercados de exportação inexplorados, notadamente nas regiões semiáridas (EBERT et al., 1993). Todavia, a introdução de cactos como culturas comerciais, seja para fins ornamentais ou produtivos, deve ser acompanhada pelo desenvolvimento de métodos eficientes de propagação em massa, incluindo-se a micropropagação, uma vez que altos níveis de endemismo, baixos números populacionais, baixas densidades individuais e altos níveis de interesse pela horticultura tornam a família dos cactos uma das famílias de plantas mais ameaçadas do mundo (HERNANDEZ e BARCENAS 1995, 1996).

Conforme Wyka et al. (2009), a vantagem da micropropagação na reprodução de cactáceas é evidente, especialmente nas espécies de cactos em que a germinação das sementes é baixa ou onde o crescimento inicial é lento. A micropropagação oferece uma maneira mais rápida do que os métodos convencionais de aumentar o volume de material vegetal destes (MALDA et al., 1999; SANTOS-DIAZ et al., 2006).

Nesse ponto, o cultivo *in vitro* poderia ajudar atendendo à demanda do mercado e,

consequentemente, reduzindo a necessidade de extração de plantas silvestres. Além disso, pode contribuir para a conservação *ex situ* de plantas e populações com o objetivo de reintroduzi-las em seu habitat para restaurar populações extintas ou em perigo crítico (CORTÉS-OLMOS et al., 2018), seja por causa da perda de habitat e/ou do pastoreio excessivo (MALDA et al., 1999).

Embora a maior parte da bibliografia disponível utilize-se de sementes de cactáceas germinadas *in vitro* como material propagativo (CORTÉS-OLMOS et al., 2018; CIVATTI et al., 2017; TORRES-SILVA et al., 2018), principalmente devido ao uso limitado de explantes de tecidos de brotações adultas por conta da contaminação microbiana persistente (RAMIREZ-MALAGON et al., 2007), já existem estudos utilizando-se de outros tecidos vegetais, como botões florais (WYKA et al., 2009), para a micropropagação de cactos. Diversos autores já aplicaram técnicas de cultura de tecidos como uma alternativa para preservação de cactáceas ameaçadas (VYSKOT e JÁRA 1984; RUBLUO et al. 1993, 2002; PEREZ-MOLPHE et al. 1998; GIUSTI et al. 2002; ZAVALA-HURTADO e VALVERDE, 2003), provando que o cultivo *in vitro* é uma técnica eficiente e interessante que deve ser explorada para este fim.

A adição de carvão ativado ao meio de cultivo evita o acúmulo de inibidores fenólicos, mas pode também adsorver reguladores de crescimento e outros componentes do meio, ou ser tóxico a alguns tecidos. Explantes de plantas cujos tecidos são propensos ao escurecimento podem ser imersos em solução de um antioxidante, como a cisteína, imediatamente após a excisão (PAIVA, 2007).

Optou-se, no presente trabalho, pelo cultivo de gemas, que nas cactáceas chamam-se auréolas e possuem dois pontos de crescimento, um que gera os espinhos e outro que dá origem às flores e novos botões. Comparando-se a técnica proposta com a propagação vegetativa por estaquia, amplamente utilizada para propagação da pitaya, destaca-se a quantidade enormemente maior de mudas que se pode obter pela micropropagação, uma vez que cada gema do cladódio dará origem a uma ou mais plantas, enquanto na estaquia cada cladódio origina uma muda.

#### **4. ATIVIDADES REALIZADAS**

Durante o estágio curricular, foram realizadas atividades na área de propagação vegetativa de plantas. As atividades principais no laboratório foram o teste de concentrações fitorreguladores em micropropagação de sequoia, como parte do trabalho de desenvolvimento

de protocolos específicos para a propagação *in vitro* desta espécie, já iniciado no laboratório e em caráter exploratório realizou-se o estabelecimento de meristemas de pitaya *in vitro*.

#### 4.1. Teste de concentrações de citocininas no subcultivo de sequoia

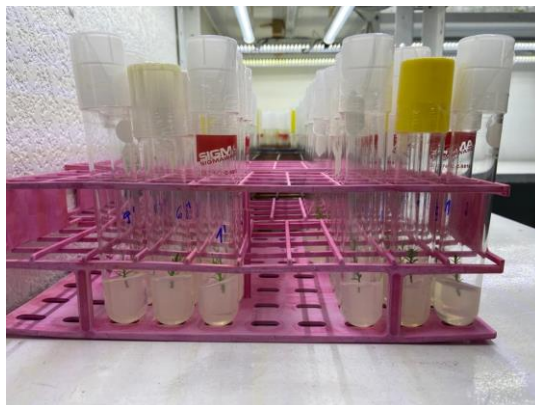
Realizou-se os subcultivos de sequoia já estabelecidas *in vitro* a fim de avaliar o crescimento dos explantes em um mesmo meio de cultivo com duas citocininas distintas, sendo uma sintética (K – 6-Furfurilaminopurina) e uma natural (2iP – Isopenteniladenina) em diferentes concentrações.

##### 4.1.1. Material e métodos

O material vegetativo foi obtido de uma *Sequoia sempervirens* de 20 anos, localizada na Universidad Autónoma Chapingo. Utilizaram-se os brotos terminais dos ramos mais jovens. Os mesmos foram lavados com uma escova em uma solução de água destilada e sabão, sendo em seguida desinfestados durante 15 minutos em uma solução de água destilada e hipoclorito de sódio a 10 %, e enxaguados com água destilada por três vezes. Posteriormente, foram submergidos durante 10 minutos em uma solução de água destilada com peróxido de hidrogênio a 10 %. No momento da propagação, selecionaram-se as gemas axilares, das quais foram retirados os primórdios florais para obtenção dos meristemas.

Os meristemas foram estabelecidos em meio composto por ágar ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) com sacarose ( $20 \text{ g.L}^{-1}$ ) e quando os mesmos iniciaram seu desenvolvimento, foram subcultivados em um meio com pH 5,7 com os compostos do meio de cultivo para sequoia (Apêndice A) e foram mantidos em sala de crescimento (Figura 2) com fotoperíodo de 16 h de luz a  $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

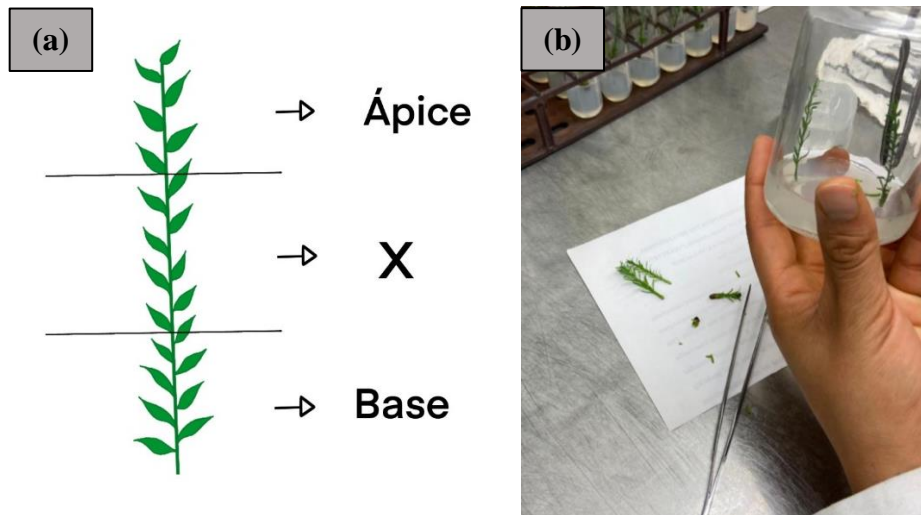
**Figura 2:** Explantes propagados, divididos em tratamentos, armazenados em sala de crescimento (Texcoco de Mora, México, 2020).



Fonte: Autor

Os explantes foram cortados em segmentos de 2,5 a 3,5 cm e foram separados em ápices e bases de acordo com sua posição no explante inicial (Figura 3a), descartando-se a porção mediana, quando havia e em seguida incubados (Figura 3b).

**Figura 3:** Ilustração da divisão do explante inicial de sequoia (a) e momento da propagação (b) (Texcoco de Mora, México, 2020).



Fonte: Autor

O experimento teve duração de 5 semanas, durante as quais estimou-se por medida indireta o crescimento semanal (Figura 4) e contou-se o número de brotes por planta.

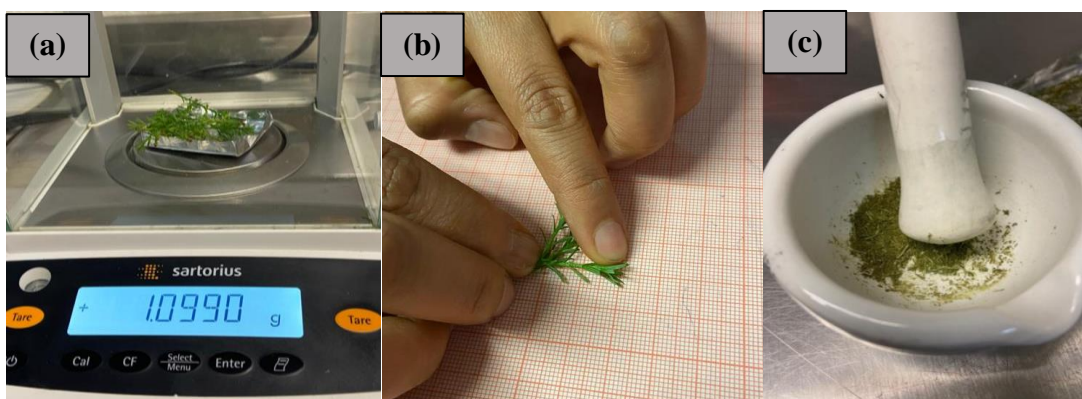
**Figura 4:** Marcação da altura do explante no frasco que o acondicionava como avaliação indireta do crescimento semanal (Texcoco de Mora, México, 2020).



Fonte: Autor

Obteve-se a massa de matéria fresca (Figura 5a) do total de explantes que compunham cada tratamento, tomou-se as medidas de altura das plântulas (Figura 6a), número e tamanho das ramificações com auxílio de papel milimetrado (Figura 6b). Em seguida os mesmos foram secos em estufa de circulação forçada a 60 °C, até atingirem massa constante, obtendo-se a massa de matéria seca. Ambas as medidas foram tomadas de forma coletiva, uma vez que a massa individual de cada planta foi um valor muito baixo, ademais da rápida perda de água pelos tecidos de sequoia após a retirada dos mesmos dos frascos de propagação. Em seguida as amostras foram maceradas (Figura 5b) e acondicionadas em frascos a fim de armazená-las até a análise de nutrientes, a qual ainda não foi finalizada até o final do período de estágio.

**Figura 5:** Avaliação da massa fresca do conjunto de repetições que compunham um tratamento (a), medição do tamanho final do explante (b) e maceração do material vegetal (c) (Texcoco de Mora, México, 2020).



Fonte: Autor

O delineamento experimental utilizado foi em blocos em esquema fatorial 5 x 2, sendo composto por cinco concentrações de citocininas no meio de cultivo: testemunha (sem fitorregulador), meio com adição de 2 mg.L<sup>-1</sup> de 2iP, meio com adição de 4 mg.L<sup>-1</sup> de 2iP, meio com adição de 2 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina e meio com adição de 4 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina e duas origens de explante: basais e apicais. Foram utilizadas 12 plantas por tratamento e um bloco. Os dados foram submetidos a análise de variância e posterior teste Tukey de comparação de médias ao nível de 5 % de significância. O pacote estatístico utilizado foi o RStudio®.

#### 4.1.2. Resultados obtidos

Foram observadas diferença estatística para as variáveis altura das plântulas, número de ramificações e tamanho médio das ramificações para o fator origem do explante (Tabela 1). Os testes de concentrações de citocininas não apresentaram diferença estatística. Os

resultados médios por tratamento e o quadro da análise da variância se encontram nos Apêndice C e D, respectivamente.

**Tabela 1:** Altura média das plântulas, número médio de ramos e tamanho médio das ramificações a partir de dois tipos de explantes de sequoia micropropagadas (Texcoco de Mora, México, 2020).

<b>Explantes</b>	<b>Altura das plântulas (cm)</b>	<b>Nº de ramos</b>	<b>Tamanho das ramificações (cm)</b>
Ápices	6.4a*	2.0a	2.2a
Bases	4.2b	1.0b	1.1b

\* Médias seguidas de letras diferentes na coluna apresentam diferença estatística pelo teste Tukey ( $P > 0,05$ ).

#### **4.2. Estabelecimento de cultivo de gemas de pitaya *in vitro***

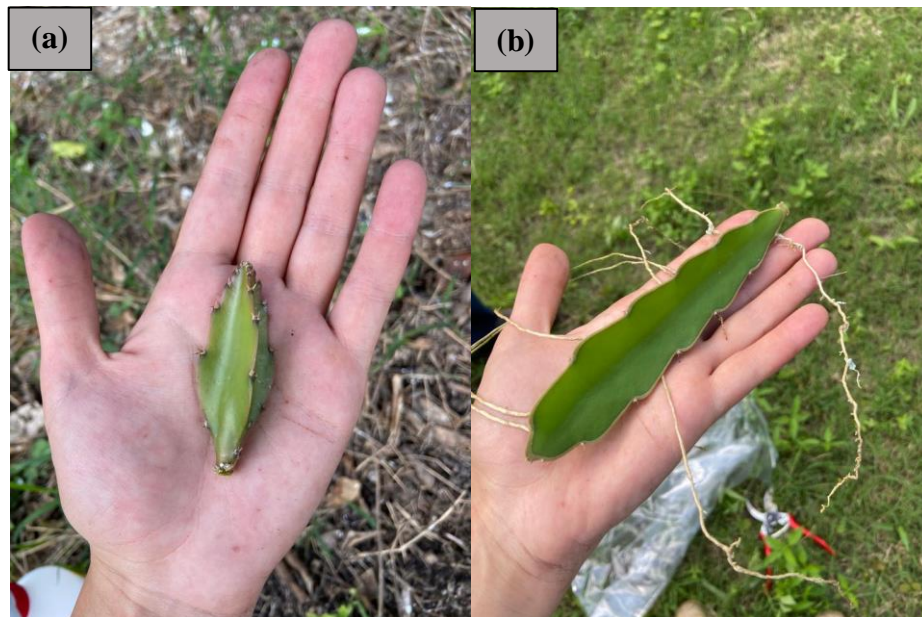
Realizou-se o estabelecimento de gemas de pitaya em meio sem sais, com intuito de colaborar para o desenvolvimento de um protocolo específico para cultura de tecidos utilizando-se meristemas como material propagativo.

##### **4.2.1. Material e métodos**

O material vegetativo foi obtido de duas plantas jovens (Figura 6), de aproximadamente 1 ano, estabelecidas e crescendo em viveiro comercial (Viveiro Cazonas), na cidade de Cazonas de Herrera, no estado de Veracruz, México. Os cladódios terminais de duas plantas foram coletados no dia nove de fevereiro de 2020, ensacados em plástico transparente e transportados em bolsa térmica até o laboratório de fruticultura do Colpos Montecillo, onde foram armazenados em geladeira até o dia seguinte.



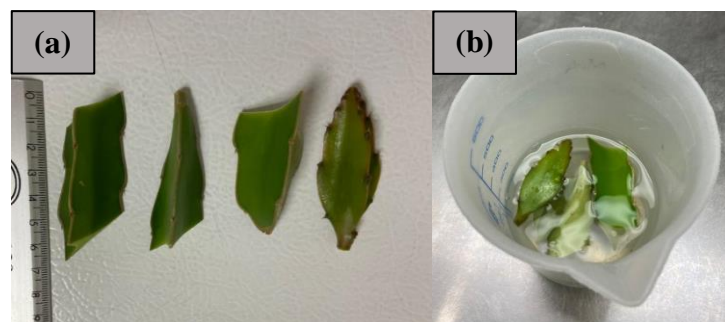
**Figura 6:** Cladódio de pitaya jovem (a) e cladódio de pitaya mais desenvolvido, com raízes aéreas (b) (Cazonos de Herrera, México, 2020).



Fonte: Autor

No laboratório, estes cladódios, tiveram os espinhos cortados com tesoura de poda e então foram lavados com uma escova em uma solução de água destilada e sabão, secos ao ar, e em seguida cortados em segmentos de cerca de 7 cm (Figura 7a). A desinfestação consistiu em três passos consecutivos, realizados em câmara de fluxo laminar: primeiro houve a imersão dos segmentos em solução de álcool 70 % durante 2 minutos (Figura 7b), seguido de imersão em solução de hipoclorito comercial a 25 % durante 15 minutos e, finalmente imerso em água deionizada estéril durante 5 minutos, sendo ambos os passos realizados sob agitação constante.

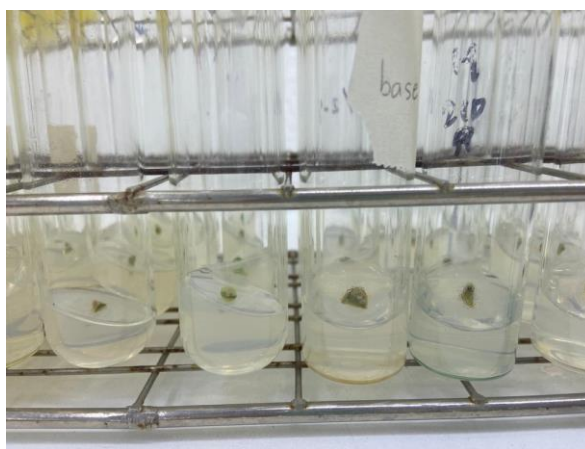
**Figura 7:** Segmentos dos cladódios de pitaya após o corte dos espinhos (a) e desinfestação em hipoclorito (b) (Texcoco de Mora, México, 2020).



Fonte: Autor

O meio de cultivo utilizado para o estabelecimento inicial foi de ágar (4 g.L<sup>-1</sup>) e sacarose (20 g.L<sup>-1</sup>), autoclavado por 20 minutos a 100 °C com 20 bares de pressão. No momento da inoculação no meio de cultivo, tentou-se obter os menores explantes possíveis em formato de triângulo (Figura 8), posicionados de forma vertical no meio, e em seguida armazenando-as em sala de crescimento com temperatura de 22°± 2°C e regime luminoso de 16 horas de luz.

**Figura 8:** Gemas de pitaya no dia do estabelecimento, em sala de crescimento (Texcoco de Mora, México, 2020).

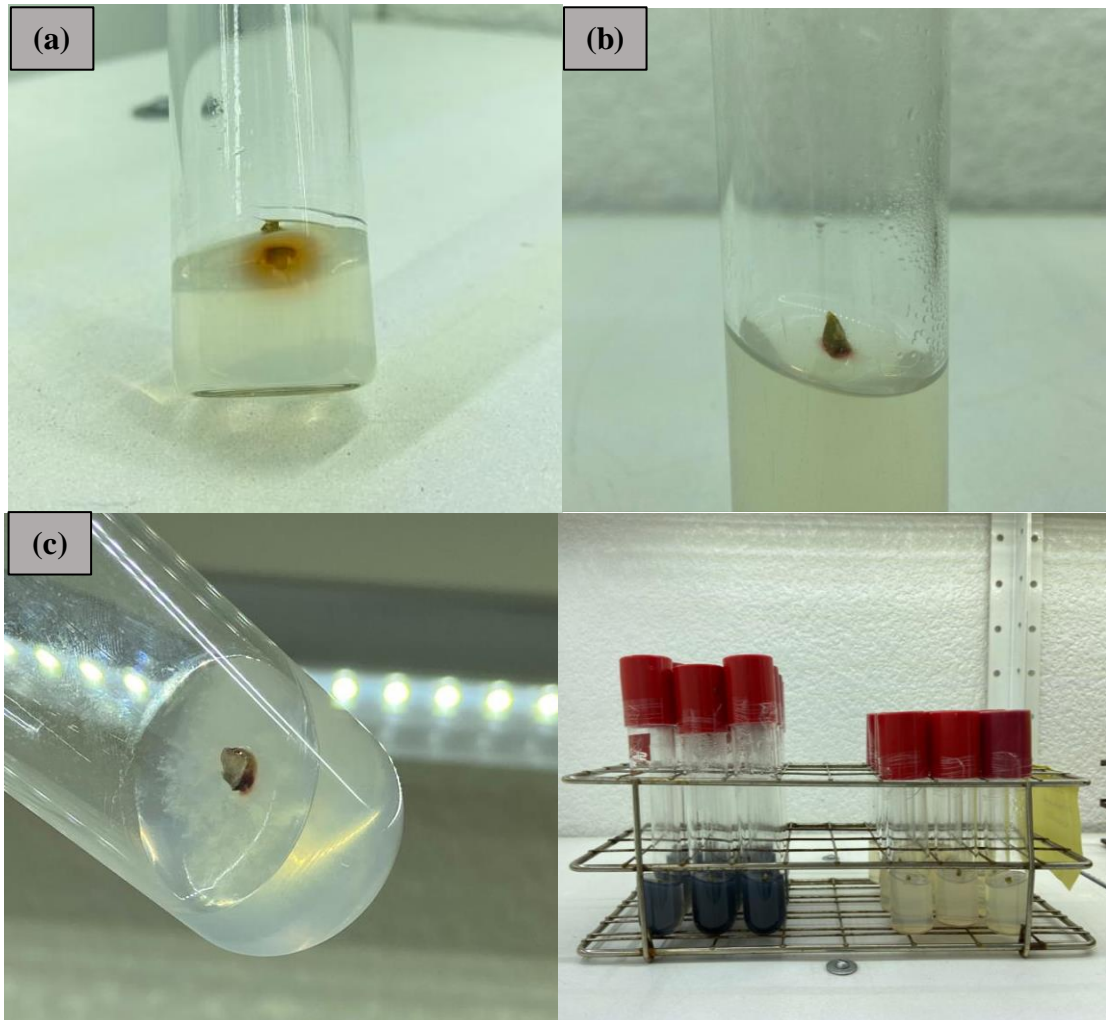


Fonte: Autor

Após três dias, os explantes apresentaram diferentes níveis de oxidação (Figura 9a e 9b) e 65 % dos mesmos apresentaram contaminação fúngica (Figura 9c). Os explantes não contaminados foram transferidos para novos frascos com meio de cultivo Villegas modificado (Apêndice D). No momento da troca de meio, realizou-se finos cortes ao redor dos explantes para retirar o tecido externo, mais oxidado. Objetivando testar a influência de compostos na redução da oxidação, os explantes contaminados foram divididos em dois grupos e receberam os seguintes tratamentos (Figura 9d):

- 1- Sete amostras foram transferidas para o meio Villegas modificado com adição de carvão ativado.
- 2- Sete amostras foram tratadas com cisteína durante 5 minutos e em seguida transferidas para meio Villegas modificado sem carvão ativado.

**Figura 9:** Explantes de pitaya com: expressiva oxidação (a), reduzida oxidação (b), apresentando contaminação fúngica (c). Ilustração dos subcultivos de explantes de pitaya não contaminados em meios com e sem carvão ativado (d) (Cazones de Herrera, México, 2020).



Fonte: Autor

#### 4.2.2. Resultados obtidos

Conforme esperado, os tricomas (Figura 10) foram uma grande fonte de contaminação, uma vez que a desinfestação dos mesmos é dificultada pelo seu tamanho reduzido e sua grande quantidade. Os explantes de menor tamanho apresentaram menor oxidação. Já os que apresentaram fungos eram oriundos de cladódios maiores.

**Figura 10** - Tricomas na gema de pitaya, vistos em estereoscópio (Texcoco de Mora, México, 2020).



Fonte: Autor

Na primeira etapa do experimento (fase de inoculação dos explantes no meio de cultivo), o meio de cultivo e a mucilagem liberada pelo explantes se oxidaram, porém os tecidos quase não apresentaram oxidação, apesar de metade dos explantes terem apresentado algum nível de oxidação. Segundo Ramirez-Malagon et al. (2007), 80% dos explantes falham na cultura *in vitro* devido à oxidação extensa, contaminação e/ou necrose, o que torna os números obtidos aceitáveis.

#### **4.3. Outras atividades**

Acompanhou-se as atividades da disciplina Propagação de Plantas e Manejo de Viveiros ofertada pelo Colpos a alunos de pós-graduação, na qual foram desenvolvidos trabalhos em equipes, discussão de trabalhos, apresentação de seminários, além da participação nas aulas. Cumpriram-se as atividades práticas da disciplina, tais como testes de germinação e armazenagem de sementes de plantas cítricas, preparação de navalha artesanal para enxertia, bem como a preparação de uma navalha comercial até obter-se o fio necessário para a prática. Realizaram-se saídas a campo no estado de Veracruz, com o intuito da visualização de pomares devastados por pragas, permitindo-se compreender a crítica situação fitossanitária que o estado enfrenta.

Visitou-se também um viveiro comercial certificado, além de um mercado de comercialização de plantas ornamentais e frutíferas. Também foram realizadas atividades práticas de propagação vegetativa de plantas, através das técnicas de alporquia em lichia (Figuras 11a e 11b) e enxertia de garfagem (Figura 11c) e de borbulhia (Figura 11d) em plantas cítricas.

**Figura 11:** Anelamento realizado em ramo de lichia para realização de alporquia (a), alporquia finalizada (b), enxertia de garfagem (c) e de borbulhia em plantas cítricas (d) (Cazones de Herrera, México, 2020).



Fonte: Autor

No laboratório de Fruticultura e Micropropagação, preparou-se diferentes meios de cultivo para bactérias e plantas, realizou-se a medição de quantidade e qualidade de extrações de ácidos nucleicos em amostras de tecido de plantas cítricas para PCR (reação da polimerase em cadeia – técnica da biologia molecular utilizada para amplificar um pedaço de DNA),

acompanhou-se ainda a execução de protocolos de PCR. Executou-se o isolamento de fungos e bactérias, bem como a preparação de solução de quelatos para meio de cultivo, esterilização de material geral de laboratório e a preparação de material vegetativo para análise de nutriente.

## **5. DISCUSSÃO**

### **5.1. Sequoia**

Apesar da não ocorrência de diferença estatística entre os tratamentos, contrariando trabalhos já existentes na literatura, os explantes reagiram de forma esperada ao reagirem de maneiras distintas aos reguladores conforme sua origem (Fior, 2014).

Em geral, as citocininas no cultivo de meristemas reduzem a dominância apical e liberam gemas laterais da dormência, conforme ocorrido principalmente com os explantes basais. Os explantes apicais demonstraram prioritariamente crescimento a partir do meristema apical, com desenvolvimento mais ou menos acentuado, porém como já relatado, sem diferença estatística.

Não foram encontrados na literatura pesquisada trabalhos utilizando-se da citocinina natural 2iP na micropropagação de sequoia, feito alcançado no presente experimento.

Os resultados obtidos são preliminares, uma vez que realizou-se o experimento em um único bloco. Devem somar-se aos resultados os dados de quantificação de nutrientes nos tecidos, com intuito de avaliar a influência dos fitorreguladores na absorção dos mesmos.

### **5.2. Pitaya**

O método de assepsia empregado mostrou-se parcialmente eficiente, uma vez que 65% dos explantes apresentaram contaminação fúngica. Observou-se que os explantes contaminados eram oriundos do cladódio maior e mais desenvolvido. Ressalta-se que as plantas doadoras dos cladódios encontravam-se a campo e não passaram por nenhum tipo de preparação prévia anterior a extração das gemas.

Observou-se que na primeira fase o meio de cultivo e a mucilagem liberada pelos tecidos oxidaram-se, porém no momento da transferência para novos frascos, constatou-se que o tecido praticamente não apresentava oxidação, apenas a parte mais externa dos explantes, que ficavam em contato direto com o meio, a apresentaram.

O estudo com carvão ativado e cisteína para redução da oxidação não pode ser concluído, uma vez que, logo após a execução do mesmo, teve início uma greve dos funcionários da instituição, não permitindo a entrada na mesma.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As técnicas de propagação de plantas *in vitro* têm sido cada vez mais desenvolvidas e vêm assumindo um papel importante na multiplicação e preservação de espécies. Apesar do alto custo associado à utilização desse método de reprodução vegetativa, o mesmo representa uma saída à extinção e perda de espécies importantes, sejam elas de interesse agrícola ou não.

A vivência em um laboratório de pesquisa em propagação *in vitro* proporcionou a ampliação dos horizontes para além da academia, possibilitando ser parte do desenvolvimento e aprimoração de protocolos de estabelecimento de explantes distintos, com diferentes características de tecido.

No período de estágio, foi possível ampliar os conhecimentos adquiridos durante o curso de agronomia e as atividades de iniciação científica, bem como conhecer outros métodos e colocá-los em prática. Através do estágio, conheceu-se diferentes realidades, tanto nos limites do Colpos como conhecendo viveiros e pomares, possibilitando compreender tanto o estado da arte da cultura de tecidos como a delicada situação fitossanitária enfrentada por fruticultores no México.

|

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNAUD, Y.; FRANCLLET, A.; TRANSAN, H.; JACQUES, M. Micropropagation and rejuvenation of *Sequoia sempervirens* (Lamb) Endl: a review. **Ann. Sci. Forest**, V.50, p.273–295, 1993.
- BOULAY M. Multiplication et clonage rapide du *Sequoia sempervirens* par la culture in vitro. **Études et Recherches**. 12:49-55, 1979.
- BOURGKARD, F.; FAVRE, J.M. L’embryogenèse somatique chez *Sequoia sempervirens*—possibilités et limites actuelles. **Ann. Rech. Sylv. AFOCEL**, P.83–85, 1989.
- CIVATTI, Laila Mandel; MARCHI, Maria Nazaré Guimarães; BELLINTANI, Moema Cortizo. Micropropagation of two species of *Micranthocereus* (Cactaceae) with ornamental potential native to Bahia, Brazil. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 14, p. 749-762, 2017.
- CORTÉS-OLMOS, Carles et al. In vitro germination and growth protocols of the ornamental *Lophophora williamsii* (Lem.) Coult. as a tool for protecting endangered wild populations. **Scientia Horticulturae**, v. 237, p. 120-127, 2018.
- DONNET, A. Le *Sequoia sempervirens*: programme de recherche et de développement mené en France par l’AFOCEL. **École Nationale des Ingénieurs des Travaux des Eaux et Forêts et AFOCEL**, région Nord-Quest, p.104, 1984.
- EBERT, G.; FISCHER, G.; LUDDERS, P. Pitaya – a new fruit species from Colombia. **Erwerbsobstbau**, p.49–52, 1993.
- FIOR, Claudimar Sidnei; FREITAS, Elisete Maria de; PAVAN, Aline Marjana; TEIXEIRA; Marelise. Cultura de Tecidos Vegetais. In: SPEROTTO, Raul Antonio. **Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana**. Lajeado: Univates, 2014, p.213-225.
- GIUSTI, P.; VITTI, D.; FIOCCHETTI, F.; COLLA, G.; SACCARDO, F.; TUCCI, M. In vitro propagation of three endangered cactus species. **Sci. Hortic.**, p.319–332, 2002.
- HERNÁNDEZ, HM; BÁRCENAS RT. Endangered cacti in the Chihuahuan Desert: I. Distribution patterns. **Conserv Biol.**, v.9, p.1176–1188, 1995.
- HERNÁNDEZ, HM; BÁRCENAS RT. Endangered cacti in the Chihuahuan Desert: II. Biogeography and conservation. **Conserv Biol.**, v.10, p.1200–1209, 1996.
- HONG, T.D., LININGTON, S., ELLIS, R.H. **Seed Storage Behaviour: a Compendium**. Handbook for Genebanks. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, n.4, 1996.
- KORBAN, S.S., SUL, I.W. Micropropagation of coast redwood (*Sequoia sempervirens*). Jain, S.M., Häggman, H. (Eds.), **Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits**. Springer/Verlag, Netherlands, p.23–32, 2006.



MALDA, G., BACKHAUS, R. A. e MARTIN, C. Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of in vitro-cultured cactus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.58, p.1–9, 1999.

MURASHIGE, T. Plant Propagation through Tissue Cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, 25, 135-166, 1974.

PAIVA, Patrícia Duarte de Oliveira; PAIVA, Renato; PASQUAL, Moacir. Controle de oxidação no cultivo in vitro de embriões de estrelícia (*Strelitzia reginae*). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.13, n.2, p. 107-112, 2007.

PEREZ-MOLPHE, E.; PÉREZ-REYES, M.E.; VILLALOBOS-AMADOR, E.; MEZARANGEL, E.; MORONES-RUÍZ, L.R.; LIZALDE-VIRAMONTES, H.J. Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, v.34, p.131–135, 1998.

RAMIREZ-MALAGON, R., AGUILAR-RAMIREZ, I., BORODANENKO, A., PEREZ-MORENO, L., BARRERA-GUERRA, J. L., NUÑEZ-PALENIUS, H. G. e OCHOA-ALEJO, N. In vitro propagation of ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.43, p.660–665, 2007.

RUBLUO, A.; MARÍN-HERNÁNDEZ, T.; DUVAL, K.; VARGAS, A.; MARQUEZ-GUZMÁN, J. Auxin induced morphogenetic responses in long-term in vitro subcultured *Mammillaria san-angelensis* Sánchez-Mejorada (Cactaceae). **Sci. Hortic.**, v.95, p.341–349, 2002.

RUBLUO, A.; CHAVEZ, V.; MARTÍNEZ, A.P.; MARTÍNEZ-VAZQUEZ, O. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through in vitro culture. **Biol. Conserv.**, v.63, p.163–169, 1993.

SANTOS-DÍAZ, M. S.; ELIZADE-RODRIGUEZ, C. e SANTOS-DÍAZ, M. L. Effect of coconut water, darkness and auxins on morphogenesis of *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Cactaceae). **Bradleya**, v.24, p.83-88, 2006.

SAWYER, J.O.; GRAY, J.; WEST, G.J.; THORNBURGH, D.A.; NOSS, R.F.; ENGBECK Jr.; J.H., MARCOT, B.G., RAYMOND, R. History of redwood and redwood forests. **The Redwood Forest: History, Ecology, and Conservation of the Coast Redwoods**, Washington, p.7–38, 2000.

SILVA, Marina Medeiros de Araújo; FERREIRA, Lais Tomaz. Cultivo in vitro de plantas e suas aplicações em cactáceas. **Instituto Nacional do Semiárido**, 2016

SUL, I.W.; KORBAN, S.S. Direct shoot organogenesis from needles of three genotypes of *Sequoia sempervirens*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v.80, p.353–358, 2005.

TORRES-SILVA, G. et al. In vitro shoot production, morphological alterations and genetic instability of *Melocactus glaucescens* (Cactaceae), an endangered species endemic to eastern Brazil. **South African Journal of Botany**, v. 115, p. 100-107, 2018.

WYKA, T. P.; WRÓBLEWSKA, M. e HAMERSKA, M. Use of cactus Flowers as explants for micropropagation, **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.84 n.4, p.454-458, 2009.

VASILE, Laslo; MARIA, Agud Eliza; SIMONA, Vicas. In vitro modeling of morphogenesis processes in *sequoia sempervirens* (D.Don) Endl, via the use of phytohormones. **Natural Resources and Sustainable Development**, v.5, p.73-78, 2015.

VYSKOT, B.; JÁRA, Z. Clonal propagation of cacti through axillary buds in vitro. **J. Hortic. Sci.**, v.59, p.449–452, 1984.

ZAVALA-HURTADO, J.A.; VALVERDE, P.L. Habitat restriction in *Mammillaria pectinifera*, a threatened endemic Mexican cactus. **J. Veg. Sci.**, v.14, p.891–898, 2003.

## APÊNDICES

**Apêndice A:** Composição do meio de cultivo utilizado no experimento com sequoia.

COMPOSTO	QUANTIDADE
Nitrato de amônio	8 mL L <sup>-1</sup>
Nitrato de potássio	6 mL L <sup>-1</sup>
Nitrato de cálcio	15 mL L <sup>-1</sup>
Sulfato de magnésio	15 mL L <sup>-1</sup>
Fosfato de potássio	12 mL L <sup>-1</sup>
Quelatos	10 mL L <sup>-1</sup>
Micronutrientes	10 mL L <sup>-1</sup>
AIB	2 mL L <sup>-1</sup>
Sacarose	20 g L <sup>-1</sup>
Ágar	6 g L <sup>-1</sup>

**Apêndice B:** Resultados médios obtidos no estudo de micropropagação de sequoia (Texcoco de Mora, México, 2020).

TRATAMENTO	Matéria fresca (g)	Matéria seca (g)	% de água	Altura de plântulas (cm)	Nº de ramos	Tamanho das ramificações (cm)
T1	1,38	0,20	85,51	7,5	0,08	0,15
T2	1,20	0,19	84,11	6,9	0,16	0,54
T3	1,09	0,17	83,72	5,5	0,58	0,66
T4	1,01	0,18	81,66	6,0	0,08	0,04
T5	1,16	0,19	83,60	6,8	0,08	0,04
T6	1,42	0,17	87,70	7,0	3,16	1,45
T7	1,19	0,14	87,82	5,0	2,58	1,56
T8	1,19	0,16	86,46	3,0	2,33	1,44
T9	1,43	0,18	86,94	4,0	3,00	1,36
T10	1,51	0,18	87,77	4,0	2,83	1,43

T1: explante apical controle; T2: explante apical com 2 mg.L<sup>-1</sup> de 2iP; T3: explante apical com 4 mg.L<sup>-1</sup> de 2iP; T4: explante apical com 2 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina; T5: explante apical com 4 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina; T6: explante basal testemunha; T7: explante basal com 2 mg.L<sup>-1</sup> de 2iP; T8: explante basal com 4 mg.L<sup>-1</sup> de 2iP; T9: explante basal com 2 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina; T10: explante basal com 4 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina.

**Apêndice C:** Quadro da análise da variância para o experimento de diferentes tipos de explantes e concentrações de citocininas na micropropagação de sequoia (Texcoco de Mora, México, 2020).

<b>Fator</b>	<b>Altura</b>		<b>Tamanho de ramificações</b>
	<b>de plântulas</b>	<b>N° de ramos</b>	
Tipo de explante	<0.00001	<0.00001	<0.00001
Fitorregulador	0.05820	0.95059	0.62665
Tipo de explante*Fitorregulador	0.33639	0.04612	0.14573

**Apêndice D:** Composição do meio de cultivo Villegas adaptado para pitaya.

<b>COMPOSTO</b>	<b>QUANTIDADE</b>
Nitrato de amônio	10 mL L-1
Nitrato de potássio	10 mL L-1
Nitrato de cálcio	15 mL L-1
Sulfato de magnésio	15 mL L-1
Fosfato de potássio	13 mL L-1
Quelatos	10 mL L-1
Tiamina	4 mL L-1
Mionositol	10 mL L-1
AIB	2 mL L-1
BA	4 mL L-1
Sacarose	20 g L-1
Ágar	6 g L-1