



MARIANE APARECIDA RODRIGUES

**MICROPROPAGAÇÃO DE PITAIAS COM ÊNFASE EM
DIFERENTES DENSIDADES DE FLUXO DE FÓTONS E
ORGANOGENÊSE INDIRETA**

LAVRAS - MG

2017

MARIANE APARECIDA RODRIGUES

**MICROPROPAGAÇÃO DE PITAIA COM ÊNFASE EM DIFERENTES
DENSIDADES DE FLUXO DE FÓTONS E ORGANOGÊNESE INDIRETA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Prof^a. Dr^a. Leila Aparecida Salles Pio

Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

Dra. Marlúcia Souza Pádua

Coorientadores

LAVRAS - MG

2017

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Rodrigues, Mariane Aparecida.

Micropropagação de pitaia com ênfase em diferentes densidades
de fluxo de fótons e organogênese indireta / Mariane Aparecida
Rodrigues. - 2017.

65 p. : il.

Orientador(a): Leila Aparecida Salles Pio.

Coorientador(a): José Eduardo Brasil Pereira Pinto, Marlúcia
Souza Pádua.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. intensidades luminosas. 2. regeneração. 3. *Hylocereus
undatus*. I. Pio, Leila Aparecida Salles. II. Pinto, José Eduardo
Brasil Pereira. III. Pádua, Marlúcia Souza. IV. Título.

MARIANE APARECIDA RODRIGUES

**MICROPROPAGAÇÃO DE PITAIAS COM ÊNFASE EM DIFERENTES
DENSIDADES DE FLUXO DE FOTONS E ORGANOGÊNESE INDIRETA**

**MICROPROPAGATION OF PITAYAS WITH EMPHASIS IN DIFFERENT
PHOTON FLUX DENSITIES AND INDIRECT ORGANOGENESIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 23 de Fevereiro de 2017

Dr. Eduardo Alves

UFLA

Dr. Rafael Hansen Madail

IF SUL DE MINAS

Dra. Leila Aparecida Salles Pio
Orientador

LAVRAS - MG

2017

A Deus, que sempre me guiou pelos caminhos da vida, sempre me iluminou e nunca me desamparou.

Ao meu pai, Geraldo que com todas as dificuldades lutou para que eu me formasse e pelo grande exemplo de pessoa e à minha mãe Maria do Carmo Campos Rodrigues (in memoriam) pelos momentos de cobrança, por ter me ensinado a busca ao saber, obrigado a vocês pela minha educação.

Ao meu irmão Cleder, pelo companheirismo e pelo apoio em todas as horas e pelo presente na minha vida que é o meu sobrinho Bernardo.

Ao Bernardo por ser a alegria dos meus dias

A minha madrinha Marlete, pelo amparo, conselhos e amor incondicional.

Ao meu namorado Kalill pelos bons momentos vividos juntos, pelo amor, pelo exemplo de ótimo profissional e por não me deixar desanimar.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela existência.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Ao programa de pós-graduação em Agronomia/ Fitotecnia por me permitir realizar esse sonho.

A minha orientadora, Dra. Leila Aparecida Salles Pio, pela orientação, confiança, disponibilidade e paciência.

Ao meu coorientador, Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto, pelos ensinamentos, apoio e colaboração durante o mestrado.

A minha coorientadora Marlúcia pela paciência e por sempre estar disposta a ajudar.

Aos membros da banca examinadora, Rafael e Eduardo que gentilmente aceitaram o convite para a avaliação deste trabalho.

A todos meus familiares, em especial ao Vô João e Tia Darci que me acolheram quando precisei.

Aos meus amigos, Evaldo, Thainá, Ana Clara, Fernanda, Larissa, Karine, Mayara, Cássia, Rafaela, Isadora e Miguel, pela amizade, companheirismo, ensinamentos e momentos de muitas risadas e descontração.

Em especial agradeço a Flávia, minha amiga irmã, que sempre me ajudou em tudo que podia e não podia, companheira, conselheira e braço direito.

A todos que de alguma forma contribuíram.

RESUMO

O cultivo da pitaiia tem sido promissor gerando uma busca por novas técnicas de cultivo. Assim o objetivo do trabalho foi promover um protocolo de micropropagação com foco na fase de multiplicação de pitaiias (*Hylocereus undatus*) por organogênese indireta e por meio de diferentes densidades de fluxo de fótons. Plântulas foram previamente germinadas *in vitro* e forneceram explantes para os dois experimentos. A organogênese foi obtida por meio de plântulas identificadas e porções de explantes apical e medianos sob diferentes reguladores de crescimento (TDZ e 2,4-D) e suas concentrações 2,4-D: 2,0 e 4,0 mg L⁻¹; TDZ: 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ e as combinações de 2,0 mg L⁻¹ de TDZ com 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 2,0 de 2,4-D mg L⁻¹ com a adição de 4,0 mg L⁻¹ de TDZ e um tratamento controle, com três repetições contendo três frascos dispostos em DIC, num fatorial incompleto. Foram avaliados, porcentagem de cobertura de calos aos 45 e 60 dias. Após 60 dias os tratamentos mais discrepantes fenologicamente (testemunha, 2 e 4,0 mg de TDZ e 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D) seguiram para análise por citometria de fluxo e microscopia eletrônica de varredura. No entanto para o estudo das diferentes densidades de fluxo de fótons foram utilizadas cinco densidades de fluxo de fótons (20,0; 57,0; 78,0; 102,0 e 139,0 μmol m⁻².s⁻¹) com cinco repetições (4 tubos /repetição) dispostos em DIC. Após 45 dias foram avaliados os parâmetros: comprimento do cladódio, largura do cladódio na metade da altura, número de brotos e raiz, comprimento raiz principal e matéria seca de parte aérea e as plantas foram submetidas a análises anatômicas e de pigmentos fotossintéticos. Pode-se concluir que a micropropagação por organogênese indireta pode ser utilizada para pitaiia e que o regulador de crescimento TDZ na concentração de 2,00 mg L⁻¹ é o mais indicado para essa função, comprovada pela presença de estruturas características demonstradas por microscopia eletrônica de varredura como vasos condutores e por gerar plantas estáveis geneticamente. Conclui-se também que a intensidade luminosa de 102,0 μmol m⁻².s⁻¹ é a mais indicada para o cultivo da espécie gerando um bom crescimento, como também, proporciona plantas com características anatômicas e com quantidade de pigmentos satisfatórios.

Palavras chave: intensidades luminosas, regeneração, *Hylocereus undatus*.

ABSTRACT

The cultivation of pitaya has been promising generating a search for new cultivation techniques. So the objective of this research was to promote a micropropagation protocol with a focus on the multiplication stage of pitayas (*Hylocereus undatus*) by indirect organogenesis and by means of different photon flux densities. Seedlings were previously germinated *in vitro* and provided explants for the two experiments. Organogenesis was obtained by means of identified seedlings and portions of apical and median explants under different growth regulators (TDZ and 2,4-D) and their concentrations 2,4-D: 2,0 and 4,0 mg L⁻¹; TDZ: 2,0 and 4,0 mg L⁻¹ and combinations with 2,0 mg L⁻¹ of TDZ with 4,0 mg L⁻¹ of 2,4-D and 2,0 of 2,4-D mg L⁻¹ with an addition of 4,0 mg L⁻¹ of TDZ and a control treatment, with three repetitions containing three ICS bottles, in an incomplete factorial. The percentage of callus coverage was evaluated at 45 and 60 days. After 60 days the most phenologically discrepant treatments (control, 2 and 4.0 mg of TDZ and 4.0 mg L⁻¹ of 2,4-D) were followed for analysis by flow cytometry and scanning electron microscopy. In order to study the different photon flux densities, five photon flux densities (20,0; 57,0; 78,0;102,0 and 139,0 μmol m⁻².s⁻¹) were used with five replicants (4 tubes / replicate) arranged in DIC. After 45 days the parameters were evaluated: cladodium length, half - height cladodium width, number of shoots and root, main root length and shoot dry matter, and the plants were submitted to anatomical and photosynthetic pigment analyses. It can be concluded that micropropagation by indirect organogenesis can be used for pitaya and that the growth regulators TDZ at the concentration of 2.00 mg L⁻¹ is the most suitable for this function, as evidenced by the presence of characteristic structures demonstrated by scanning electron microscopy as conducting vessels and for generating genetically stable plants. It was also concluded that the luminous intensity of 102,0 μmol m⁻².s⁻¹ is shown to be the most suitable for the cultivation of the species generating good growth, as well, it provides plants with anatomical characteristics and with a satisfactory amount of pigments.

Keywords: light intensities, regeneration, *Hylocereus undatus*.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1.....	1
1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
2.1	Classificação botânica.....	2
2.2	Cultura de tecidos e Organogênese.....	5
2.2.1	Análises por Microscopia Eletrônica de Varredura e por Citometria de Fluxo....	7
2.3	Cultura de tecidos e órgão vegetais e a influência da luz.....	8
2.3.1	Anatomia vegetal.....	10
2.3.2	Pigmentos fotossintéticos.....	11
	REFERÊNCIAS.....	12
	CAPÍTULO 2 ORGANOGÊNESE INDIRETA EM PITAIAS VERMELHAS DE POLPA BRANCA.....	22
1	INTRODUÇÃO.....	24
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
2.1	Indução de calos.....	25
2.2	Microscopia eletrônica de varredura.....	26
2.3	Citometria de fluxo.....	27
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
3.1	Indução de calos.....	27
3.2	Microscopia eletrônica de varredura.....	31
3.3	Citometria de fluxo.....	33
4	CONCLUSÕES.....	34
	REFERÊNCIAS.....	35
	CAPÍTULO 3 INFLUÊNCIA DAS DIFERENTES DENSIDADES DE FLUXO DE FÓTONS SOBRE PLÂNTULAS DE PITAIA <i>IN VITRO</i>	38
1	INTRODUÇÃO.....	40
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
2.1	Análises fitotécnicas.....	41
2.2	Análise de pigmentos fotossintéticos.....	41
2.3	Análises anatômicas.....	42
2.4	Análise estatística.....	42
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
3.1	Análises fitotécnicas.....	43
3.2	Análise de pigmentos fotossintéticos.....	46
3.3	Análises anatômicas.....	48
4	CONCLUSÕES.....	54
	REFERÊNCIAS.....	54

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Atualmente os fruticultores tem buscado opções de cultivo de diferentes frutíferas para saciar as necessidades dos consumidores que cada vez mais, estão à procura de novidades nas bancas de comercialização de frutas. Com isso as frutas exóticas, vem ganhando um grande espaço no mercado, colaborando com a produção das mesmas. Dentre as frutíferas exóticas a pitaia, também conhecida como fruta dragão, tem se destacado devido a sua exuberância e sabor único, o que atrai os consumidores, além de possuir uma fácil adaptação para cultivo, fazendo com que esta seja uma boa opção de plantio para os produtores.

A cultura da pitaia tem chamado a atenção pelo seu potencial econômico como fruta exótica, como também pela sua aptidão para a agricultura sustentável em terras semi-áridas e áridas despertando assim, elevado interesse do mercado.

Essa aptidão se deve ao fato de ser uma planta resistente à seca, característica proporcionada pela sua própria fisiologia, por possuir o metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) o que influi na redução da perda de água pela planta.

É uma cultura amplamente cultivada em países como Mexico, Malásia, Tailândia, Vietnã e Taiwan. Como maiores mercados importadores há um destaque para a União Européia, a Ásia e principalmente a China, no Brasil seu consumo, concentra-se no Estado de São Paulo.

Apesar das potencialidades da cultura, uma questão é relatada como limitante na produção homogênea da planta; a heterogeneidade genética do material vegetal, que proporciona elevada desigualdade nos cultivos.

A propagação dessa frutífera é normalmente feita por meio de sementes ou por estaquia o que causa essa heterogeneidade. No caso da propagação sexuada as plantas demoram de quatro a seis anos para atingir a idade reprodutiva e por estaquia é complicado obter material de plantio suficiente devido ao elevado tamanho das estacas, além das baixas taxas de multiplicação.

Para evitar essa variabilidade, a micropropagação, pode ser uma técnica promissora para aumentar a produção de alimentos e garantir a segurança alimentar da população.

Dentro da micropropagação, quando há o intuito de regenerar plantas é utilizado a embriogênese somática e a organogênese. Esta ultima é uma técnica, na qual, há indução de explantes de qualquer parte da planta, a formarem novos tecidos vegetais por meio de

citodiferenciação. Esses novos tecidos são primórdios vegetativos, estruturas unipolares que possuem o sistema vascular ligado ao tecido do explante inicial.

Essa técnica pode ocorrer por duas vias: direta e indireta, na direta há o surgimento direto de gemas a partir de tecidos que apresentam potencial morfogênético na planta *in vitro*, mas que, em geral, não se expressa. Já na organogênese indireta, antes do estabelecimento das células competentes, ocorre a dediferenciação do explante, gerando um calo. Desse modo pode se obter resultados promissores quando o objetivo é aumentar o número de mudas no final da micropropagação, mudas essas que serão uniformes.

A micropropagação tem se destacado como uma forma alternativa de cultivo, em que as plantas são submetidas a condições específicas, como: componentes do meio de cultura, adição de reguladores de crescimento, umidade dentro do recipiente, e luz, condições essas que muitas vezes não são fornecidas em quantidades suficientes nas câmaras de crescimento, podendo assim, agirem como fatores limitantes para o máximo desenvolvimento das plantas refletindo na importância de se trabalhar com a adequação destes parâmetros para cada espécie.

O mais expressivo dos desafios da cultura de tecidos é oferecer intensidades de luz em quantidade e qualidade suficientes para o desenvolvimento das plantas; sendo a luz, fundamental para o crescimento das mesmas, gerando sinais moleculares que regulam o desenvolvimento e fornecem energia para a fotossíntese

Com o uso dessa ferramenta biotecnológica, a propagação vegetativa da pitáia pode ser melhorada, reproduzindo genótipos com características promissoras para plantações comerciais.

Nesse contexto objetivou-se aprimorar o protocolo de micropropagação por meio da avaliação de diferentes densidades de fluxo de fótons e por meio da organogênese indireta, em pitaias vermelhas de polpa branca (*Hylocereus undatus*.)

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Classificação botânica

As pitaias pertencem a família das cactáceas, família essa, bastante ameaçada devido à extração do seu habitat de origem para venda como ornamental e pela conversão das suas áreas de origem para uso agrícola. (JARVIS, 1981; FULLER; FITZGERALD, 1987, SÁNCHEZ-MEJORADA, 1982).

Acredita-se que o Brasil seja um dos centros de origem dessas plantas (JUNQUEIRA et al., 2010). Supõe-se que a pitiaia vermelha de polpa branca tenha origem no sul do México ou na província de Yacutan. (BAUER, 2003). Há relatos que essa frutífera foi usada por milhares de anos pelos povos indígenas das Américas (ORTIZ-HERNÁNDEZ; CARRILLO-SALAZAR, 2012), sua presença é descrita do norte do Canadá até a Patagônia (BRAVO; SCHEINVAR, 1995).

Existe uma alta divergência na literatura referente à quantidade de gêneros e espécies existentes na família, para Spichiger et al. (2002) esse número varia entre cerca de 120 a 200 gêneros, compreendendo de 1500 a 2000 espécies, observadas principalmente em regiões semidesérticas, e regiões tropicais da América Latina, enquanto para Pérez-Molphe-Balch (2015) são mais de 2000 espécies, e segundo Hunt et al. (2006) 1430 espécies e 100 gêneros.

Dentre todas as espécies catalogadas cerca de 150, possuem o hábito epifítico e evoluíram para se desenvolverem em ambientes obscuros nas florestas e bosques neotropicais (BENZING, 1990; WALLACE; GIBSON, 2002).

Num consenso geral, segundo o Internacional Cactaceae Systematics Group (ICSG), há a divisão em quatro subfamílias: Pereskioideae, Opuntioideae, Cactoideae e Maihuenioideae, só a última não é encontrada no Brasil (ZAPPI et al., 2011). Segundo este autor, grande número de gêneros pertence à Cactoideae, que ainda é fragmentada em 9 tribos, (ANDERSON, 2001). Porém, a maioria dos gêneros estão distribuídos em duas tribos: tribo Hylocereeae, subdivididas nos seguintes gêneros *Epiphyllum* Haw, *Hylocereus* (A. Breger) Britton & Rose e *Selenicereus* (A. Breger) Britton & Rose; e na tribo Rhipsalideae, com os gêneros *Hattiora* Britton & Rose, *Lepismium* Pfeiff., *Rhipsalis* Gaertn. e *Schlumbergera* Lem.

De acordo com o New Cactus Lexicon (HUNT et al., 2006), o gênero *Hylocereus* (Berger) Britton & Rose contém 14 espécies, sendo as mais cultivadas mundialmente *H. undatus*, *H. polyrhizus*, *H. monacanthus* e *H. megalanthus* (ORTIZ-HERNÁNDEZ; CARRILLO-SALAZAR, 2012).

Em cada país há diferentes espécies que são referidas como pitiaia, tornando assim a classificação botânica difícil (LIMA et al., 2013), tem-se a pitiaia vermelha com polpa branca (*Hylocereus undatus* e *Selenicereus setaceus*), a pitiaia vermelha de polpa púrpura (*Hylocereus polyrhizus* e *Hylocereus costaricensis*) e a pitiaia amarela de polpa branca (*Selenicereus megalanthus*).

Existe uma confusão no reconhecimento das espécies devido a ampla variação morfológica nas estruturas vegetativas, sendo a classificação baseada geralmente no número de aréolas, contorno da haste, no tamanho e cor dos frutos (CÁLIX DE DIOS, 2005).

Sendo assim, essa fruteira determina uma gama de características físicas e químicas, quanto ao formato, presença de espinhos, cor da casca e da polpa, teores de sólidos solúveis e pH na polpa, devido sua a imensa diversidade genética (LIMA et al., 2013).

Plantas do gênero *Hylocereus* podem crescer em copas de árvores, rochas, paredes ou chão, designando-se trepadeiras, perenes, silvestres (ALVARADO; CRUZ; RINDERMANN, 2003) hemiepífitas ou seja, absorvem água através de raízes ancoradas no solo e também pelas raízes adventícias (CACIOPPO, 1990), MIZRAHI et al., 1997) as auxiliando na fixação nos suportes e também na absorção de nutrientes (ALVARADO; CRUZ; RINDERMANN, 2003). Originadas no seu caule, denominado cladódio, suculento (CANTO; 1993) de formato triangular (LICHTENZVEIG et al., 2000) e com espinhos de 2 a 4 cm de comprimento (CANTO, 1993) estes espinhos, são folhas modificadas sem células guarda, estômatos, hipoderme, clorênquima e tecido vascular (MAUSETH, 2006), que em grande quantidade, sombreiam o córtex, o protegendo da radiação solar intensa e da radiação UV; diminuindo a incidência da densidade de fluxo de fótons (NOBEL, 1983; NOBEL; LOIK; MEYER, 1991).

Os espinhos são formados a partir de estruturas especializadas chamadas aréolas, um tipo de tecido meristemático, estruturas essas essenciais para a identificação dos cactos. (ELIAS et al., 2015), essas aréolas formam um broto curto (MAUSETH, 2006) com tricomas e originam hastes (brotos compridos), folhas, espinhos e flores. E segundo Schwager, Neinhuis e Mauseth, (2015) em *H. undatus* embora os ramos e flores derivem das aréolas, as estruturas de suporte dos brotos laterais são diferentes anatomicamente quando botões axilares dormentes e quando totalmente desenvolvidos.

Essas plantas possuem sistema radicular superficial, com aproximadamente 15 cm de profundidade do solo, fasciculado e podendo assimilar baixos teores de nutrientes (LE BELLEC; VAILLANT; IMBERT, 2006).

Possui flores hermafroditas, de tamanho elevado, (com cerca de 30 cm de diâmetro), aromáticas e brancas (BARBEAU, 1990) completas, laterais, com antese noturna com cerca de 15 horas de duração e com sua máxima abertura das 23 horas à 01 hora. Na cidade de Lavras-MG, o florescimento da pitáia ocorre de novembro a março, sendo de 3 a 5 picos de florada (MARQUES et al., 2011). A planta possui período de florescimento médio durante o ano de acordo com a região de cultivo, por ser dependente do fotoperíodo, descrita como de dias longos (LUDERS, 2004).

O desenvolvimento dos frutos é curto, de 34 a 43 dias após a antese, em condições de temperaturas mais elevadas ocorre a antecipação da maturação (SILVA; MARTINS; CAVALLARI, 2011). É uma baga indeiscente, de formato globoso a elipsoide, com 10 a 12

cm de diâmetro (HERNANDEZ, 2000), polpa branca, casca vermelha e massa de 60 a 160g (PIMIENTA BARRIOS; TOMAS-VEGA, 1993), podendo apresentar peso médio de 400g/fruto (CANTO, 1993). Possuem sementes ovaladas, negras, de 2-3 mm de largura, em grande número e eficientes na germinação (HERNANDEZ, 2000).

Os frutos possuem sabor ligeiramente doce, baixa caloria, são ricos em vitaminas e sais minerais (NUR'ALIAA et al., 2010) e polpa suculenta e atrativa (CISNEROS; TELZUR, 2013).

Segundo Ortiz-Hernández e Carrillo-Salazar (2012), os frutos têm atividade hipoglicêmica, diurética e antimicrobiana. Já Ariffin et al. (2009) ressaltam o uso da fruta no tratamento de doenças cardíacas, enquanto Wu et al., (2006) cita-as na prevenção de efeitos do câncer (YUSOF et al., 2012). O fruto da pitáia vermelha (*Hylocereus undatus* Haw.) escolhida com fonte de explante desse trabalho tem tanto a polpa, como a casca ricas em polifenóis e antioxidantes (WU et al., 2006).

A pitáia tem baixo requerimento por água e assim, alto potencial produtivo, podendo ser cultivada em áreas com baixa pluviosidade ou com períodos de secas sazonais, (ALVARADO; CRUZ; RINDERMANN, 2003), a planta possui características morfológicas para controlar condições adversas, como modificação do caule para o armazenamento de água, a redução ou ausência de folhas e a superfície cerosa.

Além dessas características, essa frutífera possui o metabolismo ácido crassuláceo (CAM), abrindo seus estômatos no período noturno e os mantendo fechados durante o dia, diminuindo assim as perdas por evapotranspiração e levando a uma maior eficiência no uso da água (CEUSTERS et al., 2009) segundo García-Rubio (2015) o gênero *Hylocereus* requer precipitação média anual de 800 a 1.500 mm e temperatura média (20 a 24 °C).

2.2 Cultura de tecidos e Organogênese

Técnicas de cultura de tecidos por meio de micropropagação tem sido usadas para as espécies de cactos, (SUÁREZ ROMÁN et al., 2014); (MENEZES et al., 2012); (LOPES et al., 2016), devido a limitações *ex vitro* na produção de mudas, como a baixa taxa de produção de sementes e o crescimento lento.

Nesse processo, cada espécie responde de uma maneira às condições de multiplicação, enraizamento e de aclimatização, sendo necessário desenvolver protocolos específicos. (HUBSTENBERGER et al., 1992). Um sistema de micropropagação, para ser eficiente, deve

fornecer uma alternativa útil para a produção rápida de brotos, visando a conservação e produção das espécies utilizadas.

A organogênese é gerada por intermédio da diferenciação de órgãos e brotos diretamente do explante (organogênese direta) (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998) ou passando por uma fase intermediária de formação de calos antes de regenerar uma nova planta (organogênese indireta), sendo esta segunda, uma das vias morfogênicas mais utilizadas na micropropagação (PEREIRA et al., 2013).

Segundo Grattapaglia e Machado, (1998) a organogênese pode originar-se de um conjunto de células ou de uma única célula e normalmente, é caracterizada por ser uma estrutura monopolar com conexão vascular dos órgãos formados com o explante de origem

Para George, 1993; Joy Iv e Thorpe, 1999, Pierik, (1997) este processo é influenciado por muitos fatores internos e externos, o que o torna bastante complexo, sendo baseado na interação entre a fonte do explante, meio de cultura e fatores ambientais. É também essencial o equilíbrio de reguladores exógenos (relação auxina/citocinina) no meio e suas respostas a essa situação, determinando o destino morfológico do calo (SUGIYAMA, 1999),

Na organogênese indireta, a partir das células do calo, formam-se gemas adventícias com capacidade para desenvolver novas estruturas (parte aérea ou raiz) e assim, tem-se a vantagem de se regenerar ao final do processo uma planta completa (BRANDÃO et al., 2005).

Essa via pode gerar resultados expressivos no aumento de número de mudas no fim da micropropagação, além de solucionar problemas de recalcitrância natural. Contudo, estudos relacionados a esse tema podem subsidiar novos conhecimentos sobre os estágios subsequentes da micropropagação, com foco na multiplicação em larga escala e ainda assessorar na otimização de protocolos de cultura de tecidos (PEREIRA et al., 2013).

Nesse processo de passar pelo estágio de calo anteriormente à regeneração; podem ser gerados variantes somaclonais, o que é uma desvantagem (PALOMBI; LOMBARDO; CABONI, 2007). De acordo com Larkin e Scowcroft, (1981) a variação caracteriza-se pela aparição aleatória de modificações no material genético cultivado *in vitro*, ou seja, mutantes espontâneos podem ser selecionados nesse material

Para plantas do gênero *Selecereus*, (pitaia amarela), Suárez Román et al. (2014) desenvolveram um protocolo para a regeneração *in vitro*, por meio de organogênese indireta a partir de meristemas axilares (aréolas), onde o TDZ (tidiazuron) na concentração de 300 μ M mostrou eficiência na indução de calos compactos, e maior número de brotos por ponto de regeneração.

2.1.1 Análises por Microscopia Eletrônica de Varredura e por Citometria de Fluxo

Por volta da década de 50, foi desenvolvida a microscopia eletrônica de varredura (MEV), que causou uma das revoluções no estudo do mundo microscópico, devido a alta profundidade de campo, conferindo aspecto tridimensional às imagens (ALVES, 2004). Este é um dos aparelhos mais versáteis para análises microestruturais de materiais sólidos, o produto final são imagens com fácil interpretação e extremamente úteis para avaliar a estrutura superficial de uma dada amostra e com alto poder de resolução, além da facilidade no preparo de amostras. (ALVES; PERINA, 2012).

A microscopia eletrônica de varredura possibilita a observação do formato externo das células e dos calos (RIBEIRO et al., 2012; PÁDUA et al., 2014), como a observação e interpretação de uma variedade de microestruturas que antes de seu advento não eram passíveis de serem analisadas, facilitando agora os estudos dos pesquisadores (BARTHLOTT; HUNT 2000).

A aplicação de análises microscópicas auxilia na separação de calos embriogênicos e organogênicos (PÁDUA, 2015), permitindo diferenciar as estruturas formadas e o processo de regeneração (orgânogênese direta ou indireta, embriogênese direta ou indireta). (FILLIPI; APPEZATO-DA-GLORIA; RODRIGUEZ, 2001; NOGUEIRA et al., 2007).

Fernando et al. (2007) e Rocha et al. (2012) demonstraram a presença de regeneração por organogênese em maracujá pela técnica de microscopia eletrônica de varredura.

Já a técnica de Citometria de Fluxo, permite avaliar o nível de ploidia de amostras desejadas, sendo uma forma confiável e rápida de estimar o conteúdo de DNA (SEGURA et al., 2007).

Em Cactaceae o número de cromossomos de base é $x = 11$, na espécie *Hylocereus undatus*, são $2n = 22$, portanto diploides (BEARD, 1937; SPENCER, 1955; ROSS, 1981; LICHTENZVEIG et al., 2000).

MENEZES (2012) utilizou-se dessa ferramenta para avaliar a presença de endorreducação em plantas de pitaias submetidas a meios de cultura com $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA, acrescido de BAP e cinetina, nas dosagens 0; 1; 5 e 10 mg L^{-1} e observou que esse fenômeno em todos os tratamentos usados.

São citadas alterações genéticas como exemplo a polissomia, endoploidia e endorrepliação em culturas submetidas a micropropagação. Esta instabilidade genética ocorre devido ao longo desenvolvimento de certas plantas, o ciclo celular normal pode ser

substituído por um novo, alterado, que não possui mitoses (CHEVALIER et al., 2011), O fenômeno é comum nos tecidos de suculentas e cactos (DE ROCHER et al., 1990; NEGRON-ORTIZ, 2007).

Portanto esses vários ciclos de síntese de DNA sem ocorrência de mitose, que colaboram para o crescimento de órgãos e participam do comando de processos de expansão celular, ocorrendo em mais de 90% das angiospermas (SLIWINSKA; LUKASZEWSKA, 2005). Assim há um aumento no conteúdo de DNA nuclear e com isso pode-se gerar uma proteção do DNA genômico à condições desfavoráveis, como por exemplo, os causados pela radiação UV (YAMASAKI et al., 2010), assim como auxiliar na adaptação a ambientes adversos (MENEZES et al., 2012).

Pádua (2015) utilizou a técnica para verificar a estabilidade de plantas obtidas por embriogênese e constatou que o tempo de cultivo *in vitro* e altas concentrações de auxina podem ter afetado a estabilidade genética das plantas, enquanto Silva (2009) ao investigar por citometria de fluxo plântulas regeneradas por organogênese, constatou que não houve variação na quantidade de DNA dos regenerantes aclimatizados de todos os genótipos.

2.3 Cultura de tecidos e órgão vegetais e a influência da luz

A cultura de tecidos e órgãos vegetais é uma técnica com alta aplicabilidade na agricultura, utilizando-se de explantes, ou seja, pequenos fragmentos de tecidos vivos, isolados da planta mãe, desinfestados e cultivados assepticamente, durante períodos indeterminados em meios de cultura propício (ANDRADE, 2002).

Dentre as aplicações da cultura de tecidos, a micropropagação é uma das aplicações de maior impacto e praticidade (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Porque produz mudas em larga escala, homogêneas e saudáveis, utilizando de pequena quantidade de material propagativo (MENEZES et al., 2012). Sendo muito útil na proteção *ex situ* ou na produção para o mercado e colecionadores de cactos. (LEMA-RUMIŃSKA; KULUS 2012).

Porém segundo Andrade (2002) existem vários fatores que afetam a regeneração *in vitro*, tais como; o genótipo da planta, a fonte de explantes, e a condição em que a cultura está estabelecida.

Há necessidade de controlar fatores químicos e físicos para adequar o cultivo *in vitro* à espécie. A luz por exemplo, é um fator físico essencial para as plantas, estando ligada a processos de regulação de crescimento e desenvolvimento vegetativo e reprodutivo. Assim as

respostas morfofisiológicas das plantas são bastante dependentes da luz, como da sua presença ou ausência. (LARCHER, 2004).

Alterações na intensidade de irradiância, como também no espectro de luz, regulam a fotossíntese e, conseqüentemente o crescimento e adaptação das plantas (ZERVOUDAKIS et al., 2012), causando alterações na anatomia foliar, entre outros (SCHLUTER et al., 2003; SESMA; DEMUNER; HEBLING, 2009). Há também modificações nas quantidades de componentes fotossintéticos de transporte de elétrons nas folhas, de acordo com a disseminação da densidade do fluxo de fótons espectral durante o crescimento da planta (CHOW; MELIUS; ANDERSON, 1990; ANDERSON; CHOW; PARK, 1995; MATSUDA et al., 2004, 2007, 2008).

Plantas impostas a mudanças nas condições de luz são capazes de aclimatar-se em diferentes graus, a estes novos ambientes em vários sentidos, por meio de alterações em características foliares (razão clorofila a/b, espessura foliar, teor de nitrogênio, densidade estomática) como também sofrer alterações de alocação de biomassa para as partes mais atingidas com a mudança de luz (LEE et al., 2000). Essas plantas também sofrem alterações na síntese e degradação das clorofilas e frequência dos estômatos. (BOEGER; WISNIESWSKI, 2003; ENGEL; POGGIANI, 1991). Por exemplo em altas densidades o teor de clorofila é reduzido e há diminuição da relação clorofila: carotenóide (HENDRY; PRICE, 1993; MAXWELL; GRIFFITHS. H; YOUNG, 1994), bem como aumento do teor de carotenóides (ADAMS; MITH; OSMOND, 1987).

A luz utilizada no cultivo *in vitro* é um fator de grande impacto, tanto na multiplicação como no enraizamento das plântulas, e em irradiações inadequadas pode não favorecer a indução e o desenvolvimento de raízes (PASA et al., 2012; FACHINELLO; PETERS; RADMANN, 2002).

Muitos estudos demonstram a plasticidade fisiológica das espécies de acordo com a radiação fotossinteticamente ativa (ALMEIDA et al., 2005; FRANCO; DILLENBURG, 2007). Essa plasticidade é relevante para a sobrevivência de plantas em diversos ambientes refletindo-se assim na distribuição geográfica e ecológica das espécies (PETIT; THOMPSON; BRETAGNOLLE, 1996)

Soontornchainaksaeng et al. (2001) em estudos observando o crescimento *in vitro* de *Phaius tankervilleae* e *Vanda coerulea* (Orquidáceas, sendo a última uma epífita) sob as intensidades de 28, 37, 56, 74 e 93 $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, obtiveram maior número de folhas e desenvolvimento de área foliar, maior acúmulo de biomassa seca e altura de plantas na quarta

intensidade ($74 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), comentaram também que a maior intensidade ($93 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) não obteve bons resultados.

2.3.1 Anatomia vegetal

Pesquisas sobre a estrutura interna dos vegetais podem ajudar na compreensão de diversos fenômenos ligados ao corpo vegetal e auxiliar em estudos de identificação taxonômica (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2012).

Mesmo com a expressiva importância ecológica e econômica das cactáceas, são escassas informações sobre temas como desenvolvimento e anatomia, entres outros para referida família. Com isso, há a dificuldade de compreender a progressão do desenvolvimento e do estabelecimento de mudas em diversos ambientes. (ALMEIDA, 2013).

Terrazas e Mauseth (2002) e Dettke e Milaneze-Gutierrez (2008) descreveram que plantas dessa família tem adaptação por meio de mudanças anatômicas caulinares, com presença de estômatos localizados em depressões da epiderme (em certas espécies), hipoderme colenquimática e desenvolvimento de amplas proporções de tecido parenquimático com células mucilaginosas, cera epicuticular e cutícula espessa. Segundo Raveh, Nerd e Mizrahi (1998), *H. Undatus* não possui a presença desta cera que tem a função de proteger as plantas de altas densidades de fluxo de fótons.

Na natureza, a pitáia é encontrada em florestas tropicais da América em condições de sub-bosque, sob irradiância de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, considerada uma baixa radiação luminosa (ALMEIDA, 2015).

A quantidade da luz é um dos fatores conhecidos por regular a morfogênese, crescimento e a diferenciação nas plantas (MOSHE; DALIA, 2007). Com isso alterações na anatomia e morfologia estão vinculadas a plasticidade vegetal refletindo-se na taxa de crescimento e de sobrevivência das mesmas (ALVARENGA et al., 2003).

Altas intensidades de luz, tem influenciado vários processos fisiológicos, associados principalmente, à fotossíntese e transpiração, afetando e assim causando a diminuição da área foliar de plantas, gerando alterações anatômicas primárias, reduzindo o tamanho das células, deixando as paredes e cutículas mais espessas e o parênquima paliçádico se sobressai em relação ao esponjoso. (ALVAREZ et al., 2012; GÜVENÇ; KENDIR, 2012; IVANCICH et al., 2012).

Em diversas espécies quando camadas de cera reduzem a absorção de radiação, há uma compensação em duas ou três camadas de parênquima paliádico para assim desenvolver mais ampla eficiência de utilização da luz fotossinteticamente ativa (SATIL; SELVI, 2007).

Há também alterações nas estruturas como epiderme, sendo que a espessura da epiderme superior podendo aumentar a reflectancia de folhas expostas a altas irradiâncias preservando os tecidos fotossintéticos (CHAZDON; KAUFMANN, 1993).

Já as baixas intensidades normalmente estão relacionadas com baixo crescimento, causado por decréscimos na eficiência fotossintética (LAMBERS; CHAPIM; PONS, 1998).

As condições de irradiância também podem afetar o controle e a abertura e fechamento dos estômatos das plantas durante o crescimento. Em condições de baixa disponibilidade de luz estes são afetados obtendo mau funcionamento e uma perda expressiva na atividade fotossintética e na quantidade de água (APÓSTOLO; BRUTTI; LLORENTE, 2005).

Contudo, as plantas apresentam respostas diversificadas em relação a alterações de irradiância (DAS, 2004).

Em seus estudos, Calvente (2010), comenta que o primórdio foliar de Cactaceae, em geral, desenvolve uma ampliação da base foliar conhecida como podário e assim não desenvolve nem a lâmina, nem o pecíolo, esse podário bem desenvolvido origina estruturas entumecidas que, entrepostos em séries verticais, podem formar costelas, que possuem números variáveis.

As pitaias possuem apenas cladódios, que são caules fotossintéticos, e a influência da radiação sobre a sua anatomia é muito pouco conhecida (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009). Comumente quando se observada uma seção transversal desse caule, em regiões de tecidos completamente diferenciados, pode-se observar quatro regiões distintas de fora para dentro: sistema de revestimento, córtex, sistema vascular e medula. (SAJO; CASTRO 2006). Esse caule é revestido pela epiderme, que segundo TERRAZAS; MAUSETH (2002), normalmente se dispõe em uma camada unisseriada de células espessas quadradas ou retangulares em secção transversal revestida por cutícula, essa epiderme contém estômatos.

2.3.2 Pigmentos fotossintéticos

Cada espécie pode responder de uma maneira a densidade de fluxo de fótons. Altas intensidades de radiação luminosa podem ser prejudiciais ao crescimento da plântula, resultando em uma diminuição da eficiência fotossintética, ocasionando a degradação do aparato fotossintético (MARCHESE, 2008).

A eficiência fotossintética, o crescimento e a adaptabilidade das plantas, estão particularmente relacionados a um pigmento conhecido como clorofila. As clorofilas são responsáveis pela conversão da radiação luminosa em energia, sob a forma de ATP e NADPH e nos vegetais superiores são agrupadas em duas formas: clorofila a e clorofila b, constantemente sintetizadas e degradadas de acordo com fatores internos e externos as plantas (TAIZ; ZEIGER, 2013). Segundo estes autores outra classe importante são os carotenoides, pigmentos acessórios relacionados à multiplicação celular, crescimento das plantas e com uma ação fotoprotetora.

O pigmento mais representativo nas plantas é a clorofila, que promove a cor verde e é sintetizado nos cloroplastos, enquanto os carotenoides estão entre as cores amarelo, laranja e vermelho (ELIAS, et al., 2015).

Segundo Muller, Li e Niyogi (2001) se a planta recebe energia luminosa em demasia pode-se gerar à produção de espécies tóxicas, tais como superóxidos, oxigênio singlete e peróxidos. No entanto, os carotenoides (protetores), e alguns mecanismos como, a modificação da distribuição de energia entre os fotossistemas I e II pelos pigmentos proteicos das antenas e o ciclo das xantofilas podem minimizar esses danos (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Por outro lado, modificações no aparelho fotossintético, podem determinar a plasticidade adaptativa das espécies a essas condições (PACHECO et al., 2013).

Geralmente os teores de clorofila e de carotenoides tendem a ter um acréscimo quando se reduz a intensidade luminosa (FERRAZ; SILVA, 2001).

No entanto, os efeitos de luz e sombra nos caules de cactos e sua influência nos pigmentos têm sido estudados com baixa frequência (LOIK, 2008).

REFERÊNCIAS

ADAMS III, W. W.; SMITH, S. D.; OSMOND, C. B. Photoinhibition of the CAM succulent *Opuntia basilaris* growing in Death Valley: evidence from 77K fluorescence and quantum yield. **Oecologia**. v. 71, n. 2, p. 221-228, 1987.

ALMEIDA, E. I. B. **Sombreamento na ecofisiologia, produção e propágulos de pitaia vermelha**. 2015. 97 p. Tese (Doutorado Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal do Ceará, CE, 2015.

ALMEIDA, O.J. G. et al. Seedling morphology and development in the epiphytic cactus *Epiphyllum phyllanthus* (L.) Haw.(Cactaceae: Hylocereeae). **The Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 140, n. 2, p. 196-214, 2013.

ALMEIDA, S. M. Z. et al. Alterações morfológicas e alocação de biomassa em plantas jovens de espécies florestais sob diferentes condições de sombreamento. **Ciência Rural**, v. 35, p. 6268, 2005.

ALVARADO, M. R. M.; CRUZ, M. A. G.; RINDERMANN, R. S. Pitahaya de México Producción y comercialización en el contexto internacional In: CALUDIO, F. V. Pitayas y Pitahayas. CIESTAAM, **Universidad Autónoma Chapingo**, p. 98-121, 2003.

ALVARENGA, A. A. et al. Effects of different light levels on the initial growth and photosynthesis of *Croton urucurana* Baill. in southeastern Brazil. **Revista Árvore**, n. 1, v. 27, p. 53-57, 2003.

ALVAREZ, C. et al. Effects of light and ventilation on physiological parameters during *in vitro* acclimatization of *Gevuina avellana* mol. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, n. 1, v. 110, p. 93-101, 2012.

ALVES E. **Introdução à microscopia eletrônica**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 88 p.

ALVES, E.; PERINA, F. J. **Apostila do curso introdutório à microscopia eletrônica de varredura e microanálise de raios X**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2012. 63 p.

ANDERSON, E. F. The cactus family. Portland, **Or.: Timber Press** 776 p.-illus., col. illus.. ISBN, v. 881924989, 2001.

ANDERSON, J. M.; CHOW, W. S.; PARK, Y. The grand design of photosynthesis: acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. **Photosynthesis Research**, v. 46, n. 1, p. 129-139, 1995.

ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa cerrados, 2002) (Documentos, 58).

APÓSTOLO, N.; BRUTTI, C. B.; LORENTE, B. E. Leaf anatomy of *Cynara scolymus* L. in successive micropropagation stages. In: **Vitro Cellular & Developmental**, n. 3, v. 41, p. 307-313, 2005.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. (Ed.). **Anatomia vegetal**. Viçosa, MG: UFV, 2012, p. 404.

ARIFFIN, A. A. et al. Essential fatty acids of pitaya (dragon fruit) seed oil. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 561-564, may, 2009.

BARBEAU, G. La pitahaya rouge, un nouveau fruit exotique. **Fruits**, v. 45, p. 141-147, 1990.

BARTHLOTT, W. D.; R. HUNT. Cactaceae. In: KUBITZKI, K. (Ed.). The families and genera of vascular plants. **Springer-Verlag**, Alemanha. v 2, p. 161-19, 1993.

BAUER, R. A synopsis of the tribe Hylocereeae F. Buxb. **Cactaceae Syst. Initiatives**, n. 17, 2003.

- BEARD, E. C. Some chromosome complements in the Cactaceae and a study of meiosis in *Echinocereus papillosus*. **Botanical Gazette**, v. 99, n. 1, p. 1-21, 1937.
- BENZING, D. H. **Vascular epiphytes: General biology and related biota**. University Press, Cambridge, UK. 1990. 354 p.
- BOEGER, M.R.T.; WISNIEWSKI, C. Comparação da morfologia foliar de espécies arbóreas de três estágios sucessionais distintos de floresta ombrófila densa (Floresta Atlântica) no Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 1, p. 61-72, 2003.
- BRANDÃO, R. L. et al. Regeneração em Cultura de Tecido de Cultivares de Sorghum bicolor através de Organogênese. **Embrapa Milho e Sorgo**, 2005. (Circular técnica).
- BRAVO, H., SHEINVAR, L. El interesante mundo de las cactáceas. **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**. 1995.
- CACIOPPO, O. Pitaya: una de las mejores frutas producida por Colombia. **Informativo Agro Economico**, p. 15-19, 1990.
- CÁLIX DE DIOS, H. “A new subspecies of *Hylocereus undatus* (Cactaceae) from Southeastern México, **Haseltonia**, v. 11, p. 11-17, 2005.
- CANTO, A. R. **El cultivo de pitahaya em Yucatan**. Maxcanú: Yucatán, 1993. 53 p.
- CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia Vegetal: Estrutura e função de Órgãos Vegetativos**. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.
- CEUSTERS, S. A. et al. Differential usage of storage carbohydrates in the CAM bromeliad *Aechmea* ‘Maya’ during acclimation to drought and recovery from dehydration. **Physiologia Plantarum**, n. 135, p. 174–184, 2009.
- CHAZDON, R.L.; KAUFMANN, S. Plasticity of leaf anatomy of two rain forest shrubs in relation to photosynthetic light acclimation. **Functional Ecology**, n. 4, v. 7, p. 385-394, 1993.
- CHEVALIER, C.; et al. Elucidating the functional role of endoreduplication in tomato fruit development. **Annals of Botany**, Oxford, v. 107, p. 1159-1169, 2011.
- CHOW W. S.; MELIUS. A.; ANDERSON. J. M. Adjustments of photosystem stoichiometry in chloroplasts improve the quantum efficiency of photosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 19, p. 7502-7506, 1990.
- CISNEROS, A., TEL-ZUR, N. Genomic analysis in three *Hylocereus* species and their progeny: Evidence for introgressive hybridization and gene flow. **Euphytica**, v. 194, n. 1, p. 109-124, 2013.
- Corporación Colombia Internacional – CCI, “**Exótica**,” Boletín 2 (5, 6, 11), Bogotá, Colombia, 1998.
- DAS, V. S. R. **Photosynthesis, Regulation Under Varying Light Regimes**, 1st ed. Science Publishers, Inc., Enfield, New Hampshire, 2004.

DE ROCHER E. J, et al., Developmentally regulated systemic endopolyploid in succulents with small genomes. **Science**, v. 250, n. 4977, p. 99-102, 1990.

DETTKE, G. A.; MILANEZE-GUTIERRE, M. A. Anatomia caulinar de espécies epífitas de Cactaceae, subfamília Cactoideae. **Hoehnea**, v. 35, n. 4, p. 583-595, 2008.

ELIAS, H et al. The effects of plant growth regulators on shoot formation, regeneration and coloured callus production in *Echinocereus cinerascens in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 120, n. 2, p. 729-739, 2015.

ENGEL, V. L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 3, n. 1, p. 39-45, 1991.

FERNANDO, J. A. et al. New insights into the *in vitro* organogenesis process: the case of Passiflora. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 91, n. 1, p. 37-44, 2007.

FERRAZ, K. K. F.; SILVA, D. M. Avaliação ecofisiológica do crescimento inicial de espécies florestais usadas na recuperação de áreas degradadas - II. *Calliandracalothyrsus* Meisn. p. 6-087. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 8., **Anais...** Ilhéus: SBFV, CD-ROM. 2001.

FILIPPI, S. B., APPEZATO-DA-GLORIA, B., RODRÍGUEZ, A. P. M. Histological changes in banana explants, cv. Nanicao (*Musa spp.*, group AAA), submitted to different auxins for induction of somatic embryogenesis. **Rev. Bras. Bot.**, v. 24, p. 595-602, 2001.

FRANCO, A. M. S.; DILLENBURG, L. R. Ajustes morfológicos e fisiológicos em plantas jovens de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze em resposta ao sombreamento. **Hoehnea**, v. 34, n. 2, p. 135-144, 2007.

FULLER, D.; FITZGERALD, S. **Conservation and commerce of cacti and other succulents**. p. 264, 1987.

GARCÍA-RUBIO, L. A. et al. Distribución geográfica de *Hylocereus* (Cactaceae) en México. **Botanical Sciences**, v. 93, n. 4, p. 921-939, 2015.

GEORGE, E. F. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Part 1, 2^a Ed., Edington: Exegetics, v.1, p.121-345, 1993.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, v. 1, p. 183-260, 1998.

GÜVENÇ, A.; KENDIR, G. The leaf anatomy of some *Erica* taxa native to Turkey. **Turkish Journal of Botany**, v. 36, n. 3, p. 253-262, 2012.

HENDRY, G. A. F.; PRICE A. H. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. In: HENDRY G.A.F.; GRIME, J. P. (Eds.). **Methods in Comparative Plant Ecology. A Laboratory Manual**, p. 148-152, 1993.

- HERNANDEZ, Y. D. O. **Hacia el conocimiento y la conservacion de la pitahaya**. Oaxaca: IPN-SIBEJ-CONACYT-FMCN, p. 124, 2000.
- HUBSTENBERGER, J. F., CLAYTON, P. W.; PHILLIPS, G. C. Micropropagation of cacti (Cactaceae). **Biotechnology in agriculture and forestry**, 1992.
- HUNT, D. et al. The new cactus lexicon: descriptions and illustrations of the cactus family. **Milborne Port, Dorset: David Hunt Books**, v. 2, 2006.
- IVANCICH, H. S. et al., Foliar anatomical and morphological variation in *Nothofagus pumilio* seedlings under controlled irradiance and soil moisture levels. **Tree Physiology**, n. 5, v. 32, p. 554–564, 2012.
- JARVIS, C. E. Trade in cacti and other succulent plants in the United Kingdom. **The Cactus and Succulent Journal of Great Britain**, v. 41, n. 4, p. 113-118, 1979.
- JOY IV. R.W.; THORPE, T. A. Shoot morphogenesis: structure, physiology, biochemistry and molecular biology. In: **Morphogenesis in plant tissue cultures**. Springer Netherlands, 1999. p. 171-214.
- JUNQUEIRA, K. P. et al. Pitaya accesses genetic variability with different production levels through rapd markers. **Revista Brasileira De Fruticultura**, v. 32, n. 3, p. 840-846, set. 2010.
- LAMBERS, H.; CHAPIM III, F. S.; PONS, T. L. **Plant physiological ecology**. 1998.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2004. 531 p.
- LARKIN, P. J., SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 60, n. 4, p. 197-214, 1981.
- LE BELLEC, F.; VAILLANT, F.; IMBERT, E. Pitahaya (*Hylocereus* spp.): a new fruit crop, a market with a future. **Fruits**, v. 61, n. 4, p. 237-250, 2006.
- LEE, D. W. et al. Effects of irradiance and spectral quality on leaf structure and function in seedlings of two Southeast Asian *Hopea* (Dipterocarpaceae) species. **American Journal of Botany**, v. 87, n. 4, p. 447-455, 2000.
- LEMA-RUMIŃSKA; KULUS, R. Induction of somatic embryogenesis in *Astrophytum asterias* (Zucc.) Lem. in the aspect of light conditions and auxin 2, 4-D concentrations. **Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus**, v. 11, p. 77-87, 2012.
- LICHTENZVEIG, J. et al. Cytology and mating systems in the climbing cacti *Hylocereus* and *Selenicereus*. **American Journal of Botany**, v. 87, n. 7, p. 1058-1065, 2000.
- LIMA, C. A. de. et al. Características físico-químicas, polifenóis e flavonoides amarelos em frutos de espécies de pitaias comerciais e nativas do Cerrado, **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 565-570, 2013.

- LOIK M. E. The effect of cactus spines on light interception and Photosystem II for three sympatric species of *Opuntia* from the Mojave Desert. **Physiologia Plantarum** v. 134, p. 87-98, 2008.
- LOPES, C. A. et al. Indução de calos, potencial embriogênico e estabilidade genética em pitaia vermelha. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária)**, v. 11, n. 1, p. 21-25, 2016.
- LUDERS, L. **The ploidia or dragon fruit (*hylocereus undatus*)**. Darwin: University of Darwin, 2004. p. 5.
- MARCHESE, et al., Irradiance stress responses of gas exchange and antioxidant enzyme contents in pariparoba [*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.] plants. **Photosynthetica**, Prague, n.4, v. 46, p. 501-505, 2008.
- MARQUES, V. B. et al. Fenologia reprodutiva de pitaia vermelha no município de Lavras, MG. **Ciência Rural**, v. 41, p. 984-987, 2011.
- MATSUDA, R. et al. Photosynthetic characteristics of rice leaves grown under red light with or without supplemental blue light. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, n. 12, p. 1870-1874, 2004.
- MATSUDA, R. et al. Analysis of the relationship between blue-light photon flux density and the photosynthetic properties of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves with regard to the acclimation of photosynthesis to growth irradiance. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 53, n. 4, p. 459-465, 2007.
- MATSUDA, Ryo et al. Effects of blue light deficiency on acclimation of light energy partitioning in PSII and CO₂ assimilation capacity to high irradiance in spinach leaves. **Plant and Cell Physiology**, v. 49, n. 4, p. 664-670, 2008.
- MAUSETH, James D. Structure–function relationships in highly modified shoots of Cactaceae. **Annals of Botany**, v. 98, n. 5, p. 901-926, 2006.
- MAXWELL C.; GRIFFITHS. H.; YOUNG A. J. Photosynthetic acclimation to light regime and water stress by the C₃-CAM epiphyte *Guzmania monostachia*: Gas-exchange characteristics, photochemical efficiency and the xanthophyll cycle. **Functional Ecology**, v. 8, p. 746-754, 1994.
- MENEZES, T. P. de; et al. Micropropagação e endorreduplicação em pitaya vermelha, *hylocereus undatus* haw. **Bioscience Journal**, Uberlandia, v. 28, n. 6, p. 868–876, 2012.
- MIZRAHI, Y.; NERD, Avinoam. Climbing and columnar cacti: new arid land fruit crops. **Horticulture**, v. 82, p. 13, 1999.
- MOSHE, R., DALIA, E. On the effect of light on shoot regeneration in petunia. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, n.1, v. 89, p. 49-54, 2007.
- MÜLLER, P.; LI, X.; NIYOGI, K. K. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. **Plant physiology**, v. 125, n. 4, p. 1558-1566, 2001.

- NEGRON-ORTIZ V. Chromosome numbers, nuclear DNA content, and polyploidy in *Consolea* (Cactaceae), an endemic cactus of the Caribbean Islands. **Am J Bot**, v. 94, n. 8, p. 1360-1370, 2007.
- NOBEL, P. S. Spine influences on PAR interception, stem temperature, and nocturnal acid accumulation by cacti. **Plant, Cell & Environment**, v. 6, n. 2, p. 153-159, 1983.
- NOBEL, P. S.; LOIK, M. E.; MEYER, R. W. Microhabitat and diel tissue acidity changes for two sympatric cactus species differing in growth habit. **The Journal of Ecology**, p. 167-182, 1991.
- NOGUEIRA, R. C. et al. Análise ultra-estrutural de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. 48-50, 2007.
- NUR'ALIAA, A. R. et al. Response surface optimization for clarification of white pitaya juice using a commercial enzyme. **Journal of Food Process Engineering**, v. 33, n. 2, p. 333-347, 2010.
- OCHATT, S. J. Flow Cytometry in Plant Breeding. **Cytometry Part A**, v. 73A, p. 581-598, 2008.
- ORTIZ-HERNÁNDEZ, Y. D.; CARRILLO-SALAZAR, J. A. Pitahaya (*Hylocereus* spp.): A short review. **Comunicata Scientiae**, v. 3, n. 4, p. 220-237, 2012.
- PACHECO, F. V. et al. Gas exchange and production of photosynthetic pigments of *Piper aduncum* L. grown at different irradiances. **American Journal of Plant Sciences**, v.4, p. 114-121, 2013.
- PÁDUA M. S., et al., *In vitro* development and acclimatization of dendezeiro (*Elaeis guineensis*) **Revista Árvore**, v. 38, p. 1095-1102, 2014.
- PÁDUA, Marlúcia Souza. **Embriogênese somática e transformação genética em dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.)** 2015. 135 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.
- PALOMBI, M. A.; LOMBARDO, B.; CABONI, E. *In vitro* regeneration of wild pear (*Pyrus pyraeaster* Burgsd) clones tolerant to Fe-chlorosis and somaclonal variation analysis by RAPD markers. **Plant cell reports**, v. 26, n. 4, p. 489-496, 2007.
- PASA, M. S. et al. Qualidade de luz e fitorreguladores na multiplicação e enraizamento *in vitro* da amoreira-preta 'Xavante'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 8, p. 1392-1396, ago. 2012.
- PEREIRA, R. P. W.; MONTEIRO, M. B. O.; ABREU, H. S. Callogenesis in stem explants of *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) showing resilience in oxide calluses. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 20, n. 3, p. 407-416, ago. 2013.

- PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E. et al. Tissue culture of ornamental cacti. **Scientia Agricola**, v. 72, n. 6, p. 540-561, 2015.
- PETIT, C.; THOMPSON, J. D.; BRETAGNOLLE, F. Phenotypic plasticity in relation to ploidy level and corm production in the perennial grass *Arrhenatherum elatius*. **Canadian Journal of Botany**, v. 74, n. 12, p. 1964-1973, 1996.
- PIERIK, R.L.M. **In vitro culture of higher plants**. 4th ed. Dordrecht: Kluwer Academic, p. 348, 1997.
- PIMIANTA-BARRIOS E.; TOMAS-VEGA, M. V. Caracterización de la variación en el peso y la composición ploidia del fruto en variedades de pitayo (*stenocereus queretaroensis* (weber) buxbaum). **Revista Sociedad Mexicana Cactología**, Ciudad del Mexico, v. 38, p. 82-88, 1993.
- RADMANN, E. B.; FACHINELLO, J. C.; PETERS, J. A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira 'M-9'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 624-628, 2002.
- RAVEH, E.; NERD, A.; MIZRAHI, Y. Responses of two hemiepiphytic fruit crop cacti to different degrees of shade. **Scientia Horticulturae**, v. 73, n. 2, p. 151-164, 1998.
- RIBEIRO, L de O. et al., Morphological and ultrastructural analysis of various types of banana callus, cv. Prata anã. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 34, p. 423-429, 2012.
- ROSS, R. Chromosome counts, cytology, and reproduction in the Cactaceae. **American Journal of Botany**, p. 463-470, 1981.
- SAJO, M. G.; CASTRO, N. M. Caule. In: APPEZZATODA-GLORIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. (Eds.). **Anatomia vegetal**. Viçosa: Editora Universidade Federal de Viçosa, cap. 11, p. 283-302, 2006.
- SÁNCHEZ-MEJORADA, H. Mexico's problems and programmes monitoring trade in common and endangered cacti. **The Cactus and Succulent Journal of Great Britain**, v. 44, n. 2, p. 36-38, 1982.
- SATIL, F. H.; SELVI, S. An anatomical and ecological study of some *Crocus L.* taxa (Iridaceae) from the west part of Turkey. **Acta Botanica Croatica**, n. 1, v. 66, p. 25-33, 2007.
- SCHLÜTER, U. et al., Photosynthetic performance of an *Arabidopsis* mutant with elevated stomatal density (*sdd1-1*) under different light regimes. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 867-874, 2003.
- SCHWAGER, H.; NEINHUIS, C.; MAUSETH, J. D. Secondary Growth of the Leaf and Bud Traces in *Hylocereus undatus* (Cactaceae) during the Formation of Branches or Flowers. **International Journal of Plant Sciences**, v. 176, n. 8, p. 762-769, 2015.
- SEGURA, S. et al. Genome sizes and ploidy levels in Mexican cactus pear species *Opuntia* (Tourn.) Mill. series *Streptacanthae* Britton et Rose, *Leucotrichae* DC., *Heliabravoanae*

Scheinvar and Robustae Britton et Rose. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, n. 5, p. 1033-1041, 2007.

SESMA, R. B.; DEMUNER, V. G.; HEBLING S. A. Efeito de diferentes níveis de sombreamento sobre o crescimento inicial de *Jatropha curcas* L. em casa de vegetação. **Natureza online**, v. 7, p. 31-36, 2009.

SILVA, A. C. C.; MARTINS, A. B. G.; CAVALLARI, L. L. Qualidade de frutos de pitaya em função da época de polinização, da fonte de pólen e da coloração da cobertura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 1162-1168, 2011.

SILVA, C. V. da et al. **Germinação *in vitro*, organogênese em explantes radiculares e transformação genética de *Passiflora cincinnata* e *P. edulis***. 2009. 99 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

SLIWINSKA, E.; LUKASZEWSKA, E. Polysomaty in growing *in vitro* sugar-beet (*beta vulgaris* L.) seedlings of different ploidy level. **Plant Science**, Elsevier, v. 168, n. 4, p. 1067-1074, 2005.

SOONTORNCHAINAKSAENG, P. et al. *In vitro* studies on the effect of light intensity on plant growth of *Phaius tankervilleae* (Banks ex L'Herit.) Bl. and *Vanda coerulea* Griff. **Science Asia**, Bangkok, v. 27, p. 233-237, 2001.

SPENCER, J. L. A cytological study of the Cactaceae of Puerto Rico. **Botanical Gazette**, v. 117, n. 1, p. 33-37, 1955.

SPICHIGER, R. E. et al. Botanique systématique des plantes à fleurs: une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales. **PPUR presses polytechniques**, 2002.

SUÁREZ ROMÁN, R. S. et al. Multiplication of *Selenicereus megalanthus* (yellow pitahaya) and *Hylocereus polyrhizus* (red dragon fruit) by somatic organogenesis view. **Acta Agronómica**, v. 63, n. 3, p. 272-281, 2014.

SUGIYAMA, M. Organogenesis *in vitro*. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 61-64, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

TERRAZAS, T.; MAUSETH, J. D. Stem anatomy and morphology. In: NOBEL, P.S. (Ed.) **The cacti: biology and uses**. California University Press, Berkeley, 2002. p.47-60.

THORPE, T. A.; HARRY, I. S.; KUMAR, P. P. Application of micropropagation to forestry, 1984. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. Micropropagation-Technology and Application. Netherlands: **Kluwer Academic Publishers**, p. 310-312, 1991.

WALLACE, R. S.; GIBSON, A. C. Evolution and systematics. **Cacti: biology and uses**. University of California Press, Berkeley, 2002. p. 1-21.

WU, L. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 95, p. 319-327, 2006.

YAMASAKI, S. et al. Continuous uv-b irradiation induces endoreduplication and peroxidase activity in epidermal cells surrounding trichomes on cucumber cotyledons. **Journal of radiation research**, Oxford University Press, v. 51, n. 2, p. 187-196, 2010.

YUSOF, Y. A. et al. The drying and tableting of pitaya powder. **Journal of Food Process Engineering**, v. 35, n. 5, p. 763-771, 2012.

ZAPPI, D. et al. **Plano de ação nacional para a conservação das Cactáceas**. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Icmbio. 2011.

ZERVOUDAKIS, G. et al. Influence of Light Intensity on Growth and Physiological Characteristics of Common Sage (*Salvia officinalis* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, n.1, v.55, p. 89-95

CAPÍTULO 2

ORGANOGENESE INDIRETA EM PITAIAS VERMELHAS DE POLPA BRANCA

RESUMO

A pitiaia de polpa branca é uma frutífera que tem atraído o consumidor devido a suas propriedades organolépticas e seu sabor suave. Ela possui um período de colheita estendido, sendo também considerada uma planta ornamental. Estas características têm chamado a atenção dos fruticultores, que se deparam com uma fruta de valor expressivo. Essa exposição tem despertado a necessidade de novas técnicas de propagação para subsidiar a futura expansão dessa frutífera, sendo que a técnica de micropropagação; via organogênese é uma boa alternativa. Assim o presente estudo foi realizado com o objetivo de identificar se havia diferença entre as plantas germinadas *in vitro* que deram origem aos explantes, como também, verificar o efeito da porção do explante (apical e mediano), e observar os efeitos de diferentes reguladores de crescimento (TDZ e 2,4-D) e suas concentrações sobre a regeneração de plântulas de pitiaia por meio da organogênese indireta. Os tratamentos consistiram de diferentes concentrações de 2,4-D: 2,0 e 4,0 mg L⁻¹; TDZ: 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ e as combinações de 2,0 mg L⁻¹ de TDZ com 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 2,0 de 2,4-D mg L⁻¹ com a adição de 4,0 mg L⁻¹ de TDZ e um tratamento controle, com três repetições contendo três frascos, para cada tipo de segmentos: apical e mediano, inoculados na posição horizontal. Todas as plantas foram identificadas separadamente visto que vieram de plantas previamente germinadas *in vitro* e portanto, esse fator poderia gerar variabilidade. Foram avaliados, porcentagem de cobertura de calos aos 45 e 60 dias. Foram escolhidos, após 60 dias de cultivo, os tratamentos mais discrepantes fenologicamente para análise por citometria de fluxo e por microscopia eletrônica de varredura. Considerando, especialmente as estruturas encontradas em dois tratamentos específicos, 2,0 mg L⁻¹ e 4,0 mg L⁻¹ de TDZ, comparados ao controle (sem adição de regulador) e a um tratamento com a presença de 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, que apresentou calos desorganizados com características inviáveis para regeneração. O 2,4-D na concentração de 4,0 mg L⁻¹ gera a maior porcentagem de cobertura por calos nos segmentos medianos, porém esse tratamento não se mostrou viável quando avaliado a produzir regeneração. Os segmentos medianos, foram os mais viáveis como fonte de explante para a formação de calos na espécie. A individualidade de plantas advindas de sementes germinadas *in vitro* não gera variabilidade. O Regulador de crescimento TDZ na concentração de 2,00 mg L⁻¹, é indicado para a indução de organogênese indireta de pitiaia, comprovada pela presença de estruturas características demonstradas por microscopia eletrônica de varredura como vasos condutores. Tanto o tratamento testemunha, quanto os calos e os órgãos formados por organogênese indireta, apresentam endoreduplicação.

Palavras-chave: regeneração, *Hylocereus undatus*, Microscopia eletrônica de varredura, Citometria de fluxo

ABSTRACT

White-fleshed pitaya is a fruit that has attracted the consumer due to its organoleptic properties and its smooth taste. It has an extended harvest period and is also considered an ornamental plant. These characteristics have caught the attention of fruit growers, who are faced with a fruit of expressive value. This exposure has awakened the need for new propagation techniques to subsidize the future expansion of this fruit, so the micropropagation technique, via organogenesis, is a good alternative. Thus, the present study was carried out to identify if there was a difference between the *in vitro* germinated plants that gave rise to the explants, as well as to verify the effect of the explant portion (apical and median), and to observe the effects of different growth regulators (TDZ and 2,4-D) and their concentrations on the regeneration of pitaya seedlings by means of indirect organogenesis. The treatments consisted of different concentrations of 2,4-D: 2,0 and 4,0 mg L⁻¹; TDZ: 2.0 and 4.0 mg L⁻¹ and the TDZ 2.0 mg L⁻¹ combinations with 4.0 mg L⁻¹ of 2,4-D and 2,0 of 2,4-D mg L⁻¹ with the addition of 4.0 mg L⁻¹ of TDZ and a control treatment, with three repetitions containing three test-tubes, for each type of segments: apical and median inoculated in the horizontal position. All plants were identified separately since they came from previously germinated plants *in vitro* and therefore, this factor could generate variability. The percentage of callus coverage was evaluated at 45 and 60 days. After 60 days of cultivation, the most phenologically discrepant treatments were chosen for analysis by flow cytometry and by scanning electron microscopy. Considering especially the structures found in two specific treatments, 2.0 and 4.0 mg L⁻¹ of TDZ, compared to the control (without an addition of regulator) and a treatment with the presence of 4.0 mg L⁻¹ of 2,4-D, which presented disorganized calluses with infeasible characteristics for regeneration. The 2,4-D in the concentration of 4.0 mg L⁻¹ generates the highest percentage of callus coverage in the median segments, but this treatment was not viable when evaluated to produce regeneration. The median traits were most viable as a source of explant for callus formation in the species. The individuality of plants from germinated seeds *in vitro* did not generate variability. The TDZ growth regulator at the concentration of 2.00 mg L⁻¹ is indicated for the induction of indirect organogenesis of white-fleshed pitaya, evidenced by the presence of characteristic structures demonstrated by scanning electron microscopy as conducting vessels. Both the control treatment and the callus and organs formed by indirect organogenesis presented endoreduplication.

Key words: regeneration, *Hylocereus undatus*, Scanning electron microscopy, Flow cytometry

1 INTRODUÇÃO

A pitiaia de polpa branca (*Hylocereus undatus*) é uma frutífera trepadeira que tem despertado a atenção mundial por ser considerada ornamental e por ter uma colheita de frutos estendida (DAHANAYAKE; RANAWAKE 2012). Seu gênero está incluso na família Cactaceae, subfamília Cactoideae, tribo Hylocereeae (Britton e Rose). (BARTHLOTT; HUNT, 1993).

Segundo Lopes et al. (2016) atributos como o sabor doce e suave, polpa consistente e sementes abundantes, tem gerado expressiva receptividade nos mercados consumidores, o que tem estimulado o interesse dos produtores, assim como o elevado valor pago pelo quilo da fruta.

A propagação dessa planta é feita por algumas vias: via seminífera; que possui baixa viabilidade (THINESH; SERAN, 2015) variabilidade genética, crescimento inicial lento, além das plantas demorarem mais para começar a produzir (HERNÁNDEZ, 2000), ou por via vegetativa por meio de estacas (50 cm de comprimento) gerando difícil obtenção de material suficiente para plantios e taxas de multiplicação baixas (LE BELLEC; VAILLANT; IMBERT, 2006). Também há a possibilidade de se utilizar a micropropagação de plantas.

A utilização de técnicas de cultura de tecidos é promissora para a demanda de cultivos comerciais. (PELAH et al., 2002). Por essa técnica é possível multiplicar rapidamente as plantas, de modo rentável e eficiente quando comparado com outros métodos de propagação (CHOFFE et al., 2000).

A micropropagação pode ser realizada por diferentes vias, como por exemplo a organogênese. Essa ocorre devido a diferenciação de órgãos e brotos do próprio explante (organogênese direta) ou pela formação de calo (organogênese indireta), sendo característico uma estrutura monopolar com conexão com o explante (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A organogênese depende de vários fatores internos e externos, entre eles a interação da fonte de explante com o meio de cultivo e o ambiente (GEORGE, 1993; PIERIK, 1997; JOY IV; THORPE, 1999).

A organogênese também é dependente da ação de auxinas e citocininas, (SUGIYAMA, 1999). Segundo George (1993) o 2,4-D é a auxina mais usada na indução de calo em estudos de organogênese indireta.

Já o TDZ tem sido utilizado em alguns trabalhos com cactáceas da mesma tribo, Hylocereeae, conhecidas como pitaias amarelas (CAETANO NUNES et al., 2014; PELAH et

al., 2002). Estudos tem mostrado que essa citocinina é constantemente associado com o metabolismo de reguladores de crescimento nas plantas (ALI; ABBASI, 2014) gerando uma rápida divisão e estimulando a organogênese no rebento e agindo de forma que seu efeito fisiológico pode alterar o estresse oxidativo nas células (GUO et al., 2017) A ativação das aréolas (tecido meristemático) foi obtida em outros trabalhos adicionando zeatina, cinetina e BAP todas citocininas como o TDZ (GÓMEZ; CASTELLANOS-JUÁREZ, 2012).

Uma técnica que tem sido utilizada para confirmar a presença de regeneração por organogênese é a microscopia eletrônica de varredura onde Fernando et al. (2007) e Silva (2009) obtiveram sucesso em maracujá. Esse último autor também lançou mão do auxílio de mais uma técnica, a citometria de fluxo, que pode ser usada para verificar se houve variação na quantidade de DNA dos regenerantes.

Nesse contexto o presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da porção do explante (apical e mediano), e de diferentes reguladores de crescimento (TDZ e 2,4-D) e suas concentrações, como também a influência da identidade de plantas previamente germinadas *in vitro*, sobre a regeneração de plântulas de *Hylocereus undatus* por meio da organogênese indireta.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Indução de calos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As plantas utilizadas como base de segmentos para os trabalhos vieram de sementes coletadas de frutos e ficaram sob bancada até estarem secas. Antes da desinfestação, as sementes de *H. undatus* foram tratadas com cal para retirada do excesso de mucilagem. Em seguida, as sementes foram lavadas em água corrente por duas horas e posteriormente desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio a 50% durante 15 minutos. Após a desinfestação o material vegetal foi lavado quatro vezes com água destilada e autoclavada em câmara de fluxo laminar. Foi inoculada uma semente por tubo de ensaio em um total de 400 tubos, em meio Phillips e Collins (1984), sendo mantidos em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 60 dias, quando obtiveram tamanho suficiente para serem repicadas.

Segmentos apical e medianos obtidos de plântulas pré-estabelecidas a partir de germinação de sementes *in vitro* de pitaiá, foram utilizados como fontes de explantes. Os explantes foram cultivados em meio Phillips e Collins (1984) semissólido, acrescido de 25 g L^{-1} de sacarose e

6 g L⁻¹ de ágar, 100 mg L⁻¹ de glutamina e pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem. Foram utilizados frascos com capacidade de 200 mL, contendo 35 mL de meio.

Os tratamentos consistiram de diferentes concentrações de 2,4-D: 2,0 e 4,0 mg L⁻¹; TDZ: 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ e as combinações de 2,0 mg L⁻¹ de TDZ com 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e 2,0 de 2,4-D mg L⁻¹ com a adição de 4,0 mg L⁻¹ de TDZ e um tratamento controle, com três repetições contendo três frascos por repetição para cada tipo de segmentos: apical e mediano, inoculados na posição horizontal. Todas as plantas foram identificadas por terem vindo de sementes.

O experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial incompleto. As plantas ficaram em sala de crescimento desprovida de iluminação, durante 60 dias.

Foram avaliados, porcentagem de cobertura de calos aos 45 e 60 dias. Os dados foram submetidos à análise de variância com o modelo linear misto com o auxílio do software RStudio (2012), onde o efeito aleatório foi o de plantas e os fixos foram os tipos de segmento (apical e mediano) e o níveis de auxina e citocinina utilizados (0,0; 2,0; 4,0 mg L⁻¹ e combinações).

Para as análises subsequentes, foram escolhidos apenas os tratamentos mais discrepantes fenologicamente: tratamento controle sem adição de regulador de crescimento, tratamentos com a adição de 2,0 e 4,0 mg de TDZ que apresentaram regeneração e calos amarelados e o tratamento com a presença de 4,0 mg de 2,4-D, constituído de calos friáveis, que pareceram não possuir características muito viáveis para regeneração.

2.2 Microscopia eletrônica de varredura

As amostras de calos foram fixadas em solução de Karnovsky (glutaraldeído a 2,5% e 2,5% de paraformaldeído), em tampão de cacodilato 0,05 M, pH 7,0, durante 24 horas, a 4 °C. Os calos foram colocados em 30% de glicerol, durante 30 minutos e, em seguida, lavados por três vezes (10 minutos) em tampão de cacodilato 0,05 M e pós-fixados em 1% de tetróxido de ósmio, durante duas horas. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em gradiente crescente de acetona (25%, 50%, 75% e 90%), durante 10 minutos cada e 100% de acetona, duas vezes de 10 minutos. As amostras foram, então, levadas para o aparelho de ponto crítico, usando CO₂ líquido para a secagem completa. Posteriormente, as amostras foram montadas em suportes de alumínio (stubs), cobertas com ouro usando um evaporador de ouro SDC 050 e observadas em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40XVP.

2.3 Citometria de fluxo

Para a determinação do conteúdo de DNA, 20-30 mg de tecido de calos, juntamente com a mesma quantidade de tecido foliar de *Pisum sativum* (padrão de referência interno) foram triturados em placa de Petri contendo 1 mL de tampão Marie gelado para a liberação dos núcleos. A suspensão de núcleos foi aspirada através de duas camadas de gaze, com auxílio de uma pipeta plástica e filtrada através de uma malha de 50 μm . Os núcleos foram corados pela adição de 25 μL de uma solução de 1 mg mL⁻¹ de iodeto de propídeo para cada amostra. Em cada amostra, 10 mil núcleos foram analisados utilizando-se uma escala logarítmica. A análise foi realizada no citômetro Facscalibur (Becton Dickinson), os histogramas obtidos com o software Cell Quest e analisados estatisticamente no software WinMDI 2.8.

O conteúdo de DNA nuclear (pg) das plantas foi estimado utilizando-se a razão entre as intensidades de fluorescência dos núcleos G1 (núcleos que estão na fase G1 da Interfase) do padrão de referência (*P. sativum*) e dos núcleos G1 da amostra, multiplicando-se esta razão pela quantidade de DNA do padrão de referência (9,09 pg). Foram utilizadas 3 repetições, sendo utilizado um explante/estrutura por repetição.

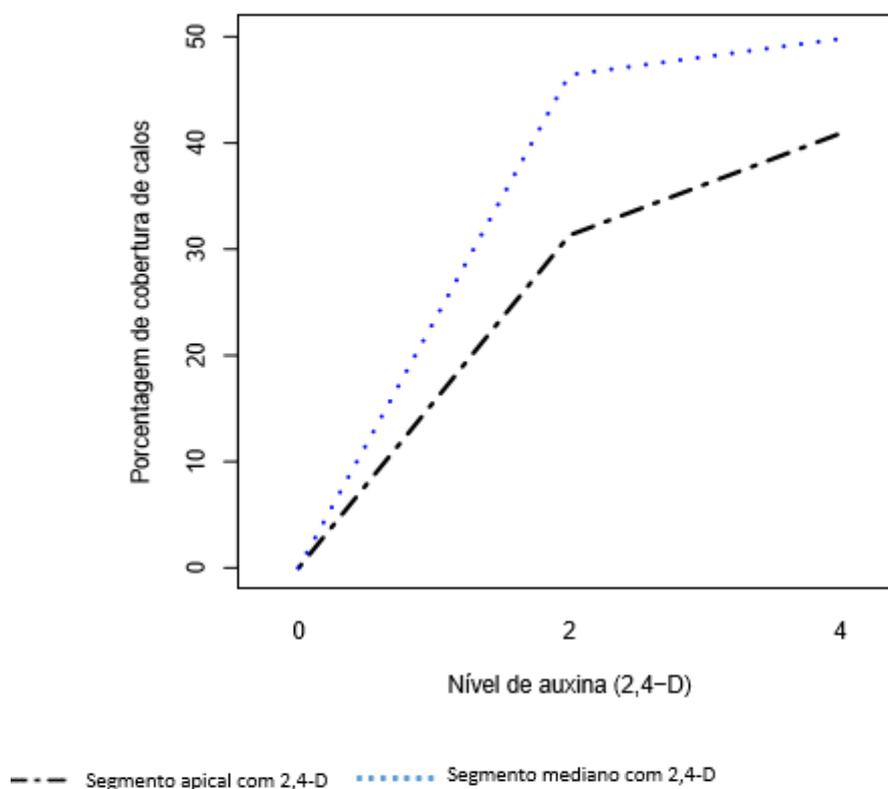
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Indução de calos

A porção do explante não obteve importância como fator isolado, porém quando relacionado a concentração de auxina notou-se a sua importância, isto porque o resultado foi mais qualitativo.

Assim, portanto o gráfico do modelo de interação (Figura 2.1), obteve uma representação mais fiel dos fatos, variando e controlando as curvas por meio de segmentos e citocinina (TDZ), por meio ainda, de um modelo linear misto, onde a variância entre as plantas doadoras dos explantes foram a fonte do erro experimental.

Figura 2.1 - Porcentagem de cobertura de calos em segmentos apicais e medianos submetidos a meios de cultura com diferentes concentrações de auxina 2,4-D (0,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹)



Fonte do autor (2016)

Houve interação da auxina 2,4-D com os segmentos apical e mediano, havendo neste último maior porcentagem de cobertura de calos com o aumento da concentração de auxina.

Isso provavelmente se deve ao fato de que o explante mediano pode ter mais tecido meristemático (aréolas) que no ápice, mesmo que no ápice a concentração de auxina endógena seja maior, por ser produzida ali e translocada para regiões basais, de forma polar (TAIZ; ZEIGER, 2013). Esse fato pode estar relacionado à quebra da dominância apical, já que os explantes foram inoculados na posição horizontal, podendo estar ocorrendo uma inibição desta translocação de auxina, favorecendo maior cobertura de calos nos segmentos medianos. Botrel et al. (2015) ao estudar posição de inoculação e região de segmentos inoculados em *H. marruboides*, obteve maior número de brotação em gemas laterais de segmentos dispostos na horizontal.

Outros autores como Venturieri e Venturieri (2004), Lameira et al. (1997) também avaliaram a área coberta por calos sobre o explante, para caracterizar a produção destes em

relação ao regulador de crescimento utilizado. O regulador de crescimento estudado que demonstrou maior porcentagem de cobertura por calos sobre o explante foi a auxina 2,4-D, porém não regenerou plântulas, como aconteceu com a citocinina TDZ, em que foi observada a regeneração de órgãos.

No tratamento controle, foi observada a emissão de raízes em todas as repetições em ambos os explantes. No entanto, não houve formação de parte aérea, (Figura 2.2A) esse fato pode ter acontecido devido a posição em que os explantes foram inoculados, sendo colocados na horizontal no meio de cultura, onde a parte que estava em contato com o meio de cultura foi mais responsiva ao enraizamento, podendo ter sido favorecida pela absorção de água e nutrientes (BOTREL, 2012).

Quando se utilizou a concentração 2,0 mg L⁻¹ do regulador TDZ, houve a presença de calos claros e amarelados e o surgimento de estruturas peculiares que lembravam muito uma miniatura de cacto, aclorofilada devido seu cultivo na ausência de luz, originando de calos pequenos (Figura 2.2B). Esses calos regeneravam-se da parte basal dos explantes, porém inicialmente era difícil saber de onde a nova estrutura se originava, o que levou a análises de microscopia eletrônica de varredura. Essas estruturas surgiram em cerca de 50% dos explantes, desses quais 78% vieram de segmentos medianos, segundo Pickens et al. (2006) a taxa de regeneração depende do tipo de explante.

Suárez Román et al. (2014) obtiveram um protocolo de regeneração de pitaias amarelas (*Selenicereus megalanthus*) por organogênese indireta utilizando-se do regulador de crescimento TDZ, em calos verde arroxeados e Pelah et al. (2002) também utilizou-se do mesmo regulador, já em segmentos de partes próximas a cotilédones, obtendo a regeneração máxima de brótos em pitaiá amarela.

Quando se utilizou a concentração 4,0 mg L⁻¹ do regulador TDZ houve uma pequena formação de calos claros que também apresentaram as estruturas peculiares que a concentração pela metade apresentou, porém menores e mais discretas (Figura 2.2C). Quanto a quantidade, surgiram em cerca de 50% dos explantes, onde 78% vieram de segmentos medianos exatamente como ocorreu com a metade desta concentração.

Tanto no tratamento que possuía adição de 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D (Figura 2.2D) quanto no que possuía 4,0 mg L⁻¹ do regulador de crescimento (Figura 2.2E), formaram-se calos friáveis, (rosados, arroxeados e esbranquiçados) em 73% dos explantes, incluindo todos os medianos e em 100% dos explantes, respectivamente. Lopes et al., (2016) ao desenvolver uma curva de crescimento de calos de pitaiá (*H. undatus*), notou esta cor em calos cultivados na presença do regulador de crescimento 2,4-D e glutamina e atribuiu essa característica a

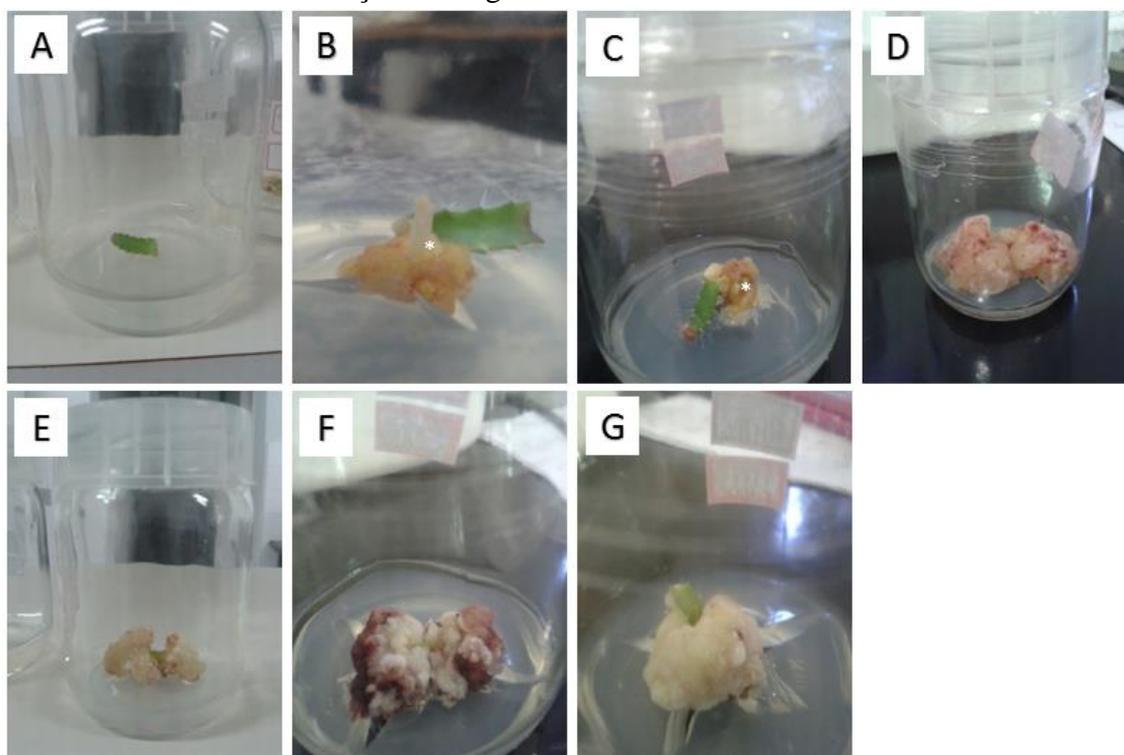
presença de antocianinas. Porém, segundo Cai, Sun e Corke (2003) o pigmento comum às pitaias são as betalaínas, mais especificamente betacianinas, grupo de coloração vermelho-violeta, (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000) sendo que quando há a presença de betalaínas nas plantas não há a presença de antocianina e vice-versa. (NAKASHIMA, 2015).

Esse pigmento tem função antioxidante (CAI; SUN; CORKE, 2003) e é notado que quando houve a presença dessa pigmentação não houve regeneração.

Para a combinação de reguladores de crescimento $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de TDZ e $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D, houve formação de calos em 95% dos explantes incluindo todos os medianos, eram rosados bem escuros e avermelhados, (Figura 2.2F) mas com tamanho menor que os calos produzidos com 2,4-D separadamente.

Na combinação de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D e 4 mg L^{-1} de TDZ houve a formação de calos bastante esbranquiçados, (Figura 2.2G) e menos avermelhados que os do tratamento anterior e foi detectada a presença de calos em 100% dos segmentos.

Figura 2.2 - Calos de pitaiia (*Hylocereus undatus*) aos 60 dias de cultivo, submetidos a diferentes concentrações de reguladores.



Legenda: A) tratamento controle. B) Explante inoculado em meio de cultura contendo $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ com formação de calos (*) e órgãos, cladódio (organogênese indireta). C) Calos induzidos no tratamento $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ, com formação de órgãos bem discretos e pequenos (*) D) Explante inoculado em meio de cultura contendo $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D, com aspecto friável cor mista com

pigmentos rosados e esbranquiçados. E) Explante inoculado em meio de cultura contendo 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D, formando calos rosados, arroxeados e friáveis. F) Calos induzidos no tratamento 2,0 mg L⁻¹ TDZ e 4,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D, com coloração rosa escura e avermelhada. G) Calos induzidos no tratamento 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 4,0 mg L⁻¹ TDZ com aspecto açucarado e branco.

Fonte: Do autor (2016)

3.2 Microscopia eletrônica de varredura

A testemunha apresentou estômatos paralelocíticos, uma epiderme com estrias epicuticulares, e um tecido organizado (Figura 2.3 A, B). Foi também observada a presença de espinho envolto por células afiladas e compridas que lembraram tricomas, (Figura 2.3 C).

Elias, Hashimah et al. (2015) observaram a existência de um tecido utilizado para identificar as cactáceas que possui esses atributos, é um meristema que forma os espinhos, conhecido como aréolas, possui tricomas e origina também folhas e flores. Porém essas células também lembraram calos, como se essa região tivesse sofrido uma desdiferenciação e uma hiperplasia, mas por falta de estímulo de um regulador de crescimento não tivesse se multiplicado.

O tratamento no qual foi adicionado 2,0 mg L⁻¹ de TDZ gerou calos que desenvolveram estruturas, cladódios, aclorofilados sem a presença de raiz, (Figura 2.3 D) e a microscopia de varredura possibilitou a visualização da formação de vasos condutores (Figura 2.3E,F) o que demonstra características de organogênese indireta que é evidenciada por estruturas unipolares onde o sistema vascular está ligado ao tecido do explante inicial (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

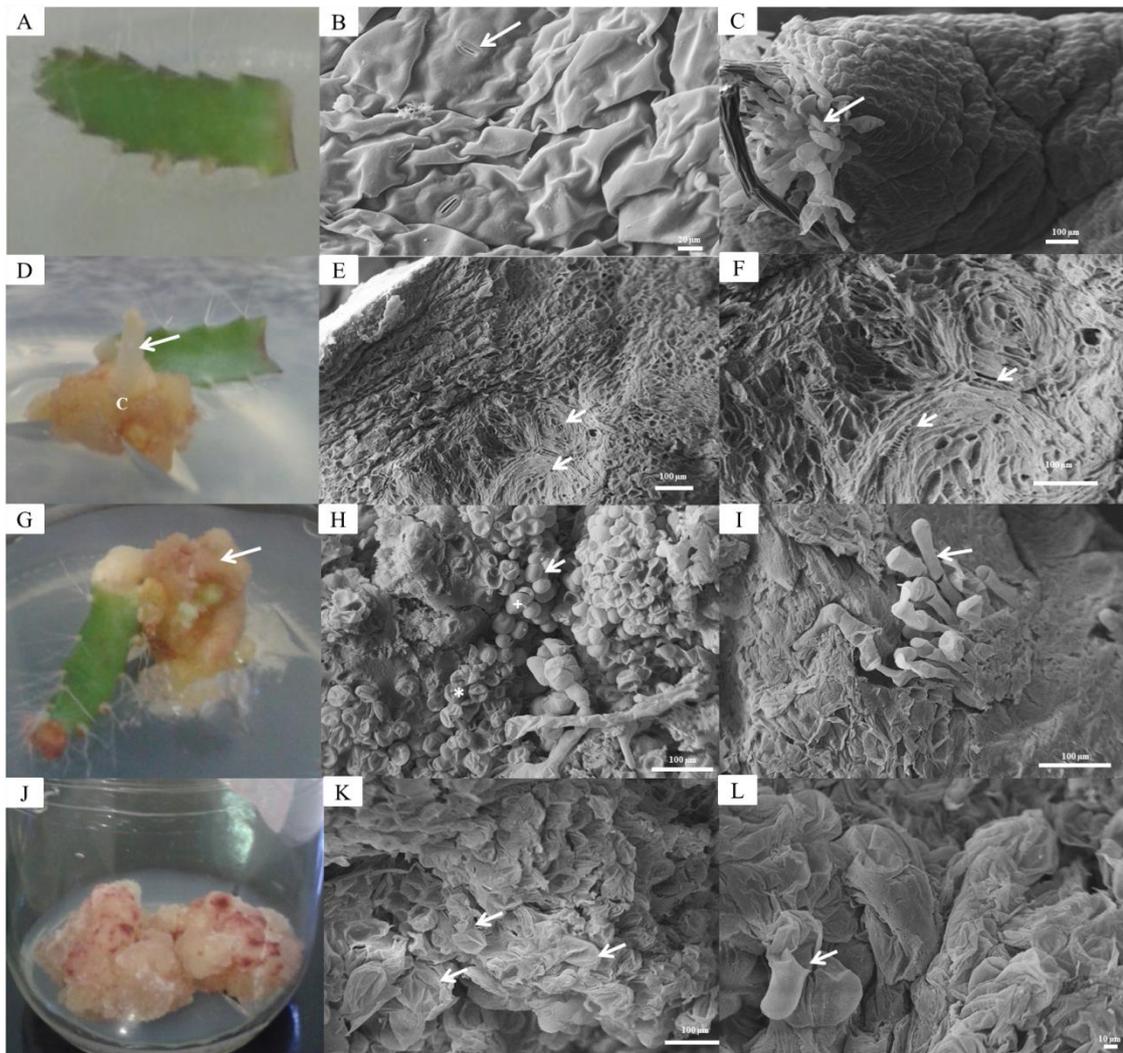
Já quando foi utilizada a concentração de 4 mg L⁻¹ do regulador os calos tiveram cor e aspecto similares aos gerados pela metade dessa concentração (Figura 2.3G) no entanto, as imagens evidenciaram calos com muitas células de parede celular rompida e murchas, que demonstram características ruins, mais também revela algumas células isodiamétricas e pequenas em aglomerados com características e potencial embriogênico. (Figura 2.3 H)

No cultivo de calos há uma grande heterogeneidade dos mesmos e somente um número restrito de células assume potencial embriogênico, devido ao potencial genético, ao tecido inoculado e aos reguladores de crescimento incorporados ao meio de cultura. (AMMIRATO, 1983; BROWN; ATANASSOV, 1985; DE FIGUEIREDO CARVALHO et al., 2013), assim subcultiva-se apenas as partes com atributos interessantes. Normalmente essas células de caráter embriogênico são pequenas e isodiamétricas, particularidade que permite a intensa divisão e a formação de aglomerados celulares que dão origem a embriões somáticos (ÂNGELO et al., 2013; SILVA et al., 2014).

Esse tratamento também demonstrou células alongadas, com parede celular rompida o que lembrou as estruturas que parecem tricomas de região meristemática axilar (Figura 2.3I) encontradas na testemunha.

O tratamento com a adição de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D, demonstrou calos rosados e esbranquiçados com pontos translúcidos, (Figura 2.3J) característica essa última que segundo Figueiredo et al. (2007), são de calos com células de formato alongado, pobres em organelas citoplasmáticas e sem capacidade embriogênica e que neste trabalho também não demonstrou capacidade organogênica, gerando células murchas, alongadas e rompidas, (Figura 2.3K,L) características inviáveis à regeneração.

Figura 2.3 – Microscopia Eletrônica de Varredura de explantes de pitiaia (*Hylocereus undatus*) submetidos a diferentes concentrações de reguladores



Legenda: A) Explante (segmentos de cladódios) tratamento controle. B) Estômatos (setas). C) Supõe-se que seja uma região com grande concentração de células meristemáticas (aréolas) com alta capacidade de multiplicação mais que por falta de estímulo de regulador de crescimento não se multiplicou (setas) e tecido organizado (*). D) Explante inoculado em meio de cultura contendo $2,0$

mg.L⁻¹ de TDZ com formação de calos (c) e órgãos (organogênese indireta) (seta). E) Eletromicrografia de cladódios obtidos por organogênese indireta, apresentado vasos condutores (setas). F) Vasos condutores - elementos de vaso (setas) G) Calos induzidos no tratamento 4,0 mg.L⁻¹ de TDZ . (setas) H) Calos com células isodiamétricas e pequenas (setas), células com a parede celular rompida (+) e células murchas (*). I) Células alongadas e com parede celular rompida supõe-se que sejam aréolas (setas). J) Calos induzidos no tratamento 4,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D (setas). K) Células murchas (setas). L) Células alongada e rompida (seta).

Fonte: Do autor (2016)

3.3 Citometria de fluxo

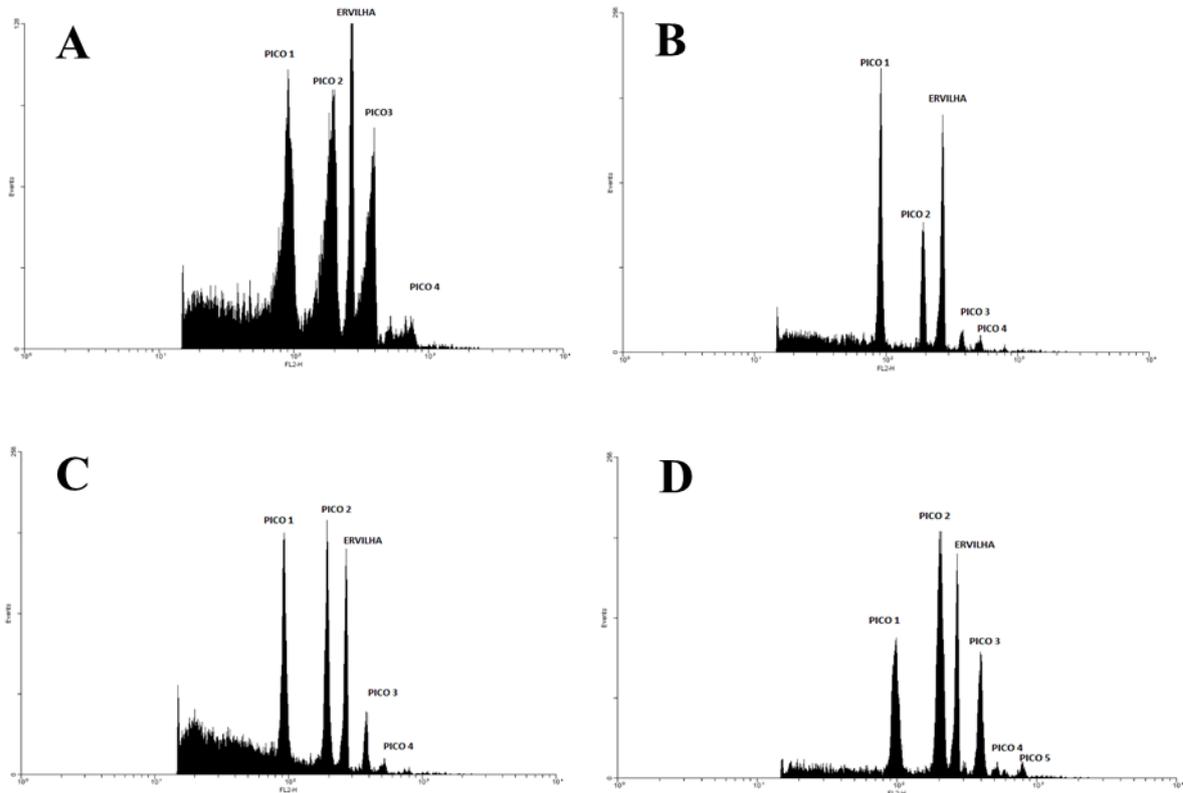
O conteúdo de DNA não variou com a presença de reguladores de crescimento, como também não variou nos tratamentos que regeneraram cladódios por organogênese indireta, não havendo assim diferença estatística e demonstrando que não houve qualquer indício de variação somaclonal, o que é comum quando os explantes são submetidos a concentração de reguladores de crescimento, como ocorreu com Pádua (2015) quando utilizou a técnica para verificar a estabilidade de plantas obtidas por embriogênese e constatou que o tempo de cultivo *in vitro* e altas concentração de auxina poderiam ter afetado a estabilidade genética das plantas de dendenheiro.

Porém os gráficos evidenciaram a presença de endoreduplicação, fenômeno que muitas vezes acontece durante a diferenciação de células que são altamente especializadas morfológicamente, que é o caso do cladódio das pitaias, descrito como um caule modificado com função de armazenamento de água (MENEZES et al., 2012).

Este fenômeno endoreduplicação, se caracteriza por células com várias ploidias dentro de um tecido e também foi observado em segmentos de caule de pitaias cultivados *in vitro*, por Menezes et al. (2012).

A planta micropropagada, usada como testemunha, (Figura 2.4A) como também os calos que apresentaram coloração amarelada obtidos em meio de cultura suplementado de 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ de TDZ obtiveram quatro picos, ou seja quatro níveis de ploidia, (Figura 2.4 B,C) enquanto calos promovidos com 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D obtiveram cinco picos, (cinco níveis de ploidia), (Figura 2.4 D).

Figura 2.4- Histograma de citometria de fluxo



Legenda: A) Histograma de citometria de fluxo do tratamento controle de pitaias *in vitro* exibindo quatro picos B) Histograma de citometria de fluxo em calos e órgãos obtidos com a concentração 2,0 mg.L⁻¹ de TDZ, exibindo 4,0 picos. C) Histograma de citometria de fluxo em calos e órgãos obtidos com a concentração 4,0 mg.L⁻¹ de TDZ, exibindo quatro picos. D) Histograma de citometria de fluxo em calos obtidos com a concentração 4,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D, exibindo cinco picos.

Fonte: Do Autor (2016)

Lopes et al. (2016) em seus trabalhos com calos de pitaias obtidos com a adição de 2,4-D e glutamina, observou que calos amarelos apresentaram seis picos, enquanto calos com coloração roxa e a planta micropropagada apresentaram quatro picos.

4 CONCLUSÕES

O 2,4-D na concentração de 4,0 mg L⁻¹ gera a maior porcentagem de cobertura por calos nos explantes, em segmentos medianos, porém esse tratamento não se mostrou viável a regeneração de calos

Os segmentos medianos são os mais viáveis como fonte de explante para a espécie.

A individualidade de plantas advindas de sementes germinadas *in vitro* não gera variabilidade genética nos calos obtidos *in vitro*.

Tanto a testemunha quanto os calos e os órgãos formados por organogênese indireta apresentam endoreduplicação.

O regulador de crescimento TDZ e sua concentração 2,0 mg L⁻¹ são indicados para a indução de organogênese indireta de pitaia, comprovada pela presença de estruturas características de órgãos visualizadas por microscopia eletrônica de varredura.

REFERÊNCIAS

- ALI, M.; ABBASI, B. H. Thidiazuron-Induced changes in biomass parameters, total phenolic content, and antioxidant activity in callus cultures of *Artemisia absinthium* L. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 2363-2376, 2014.
- AMMIRATO, P. V. Embryogenesis. **Handbook of plant cell culture**, v. 1, p. 82-113, 1983.
- ÂNGELO, C. da S. et al. Histological analysis and transcription profiles somatic embryogenesis in interspecific hybrids of *Elaeis guineenses* x *Elaeis oleifera*. **Agricultural Sciences**, v. 4, p. 1-11, 2013.
- BARTHLOTT, W. D.; HUNT, D. Cactaceae. In: K. KUBITZKI (Ed.). The families and genera of vascular plants. **Springer-Verlag**, Alemanha, v 2, p. 161-19, 1993.
- BOTREL, P. P. **Micropropagação, teor e composição química volátil de Hyptis marrubioides Epl. e atividade inseticida**. 2012. 119 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- BOTREL, P. P. et al. Factors affecting *in vitro* propagation and chromatographic analysis of compounds in *Hyptis marrubioides* epl., a threatened medicinal plant. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON IN VITRO CULTURE AND HORTICULTURAL BREEDING, 8., **Actahort**. v. 1083, p. 319-32, 2015.
- BROWN, D.C.W., ATANASSOV, A. Role of genetic background in somatic embryogenesis in *Medicago*. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 4, p. 111-122, 1985.
- CAETANO NUNES, D. G. et al. Estandarización de un protocolo de regeneración *in vitro* para pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus* (k. schum. ex vaupel) moran). **Acta Agronómica**, v. 63, n. 1; p. 31-41, 2014.
- CAI, Y.; SUN, M.; CORKE, H. Atividade antioxidante de betalainas de plantas da Amaranthaceae. **J. Agric. Food Chem**, v. 51, p. 2288-2294, 2003.
- CHOFFE, K. L. et al. In vitro regeneration of *Echinacea purpurea* L.: Direct somatic embryogenesis and indirect shoot organogenesis in petiole culture. **In Vitro Cell. Dev. Biol**, v. 36, n. 1, p. 30-36, 2000.
- DAHANAYAKE, N., RANAWAKE, A. L. Regeneration of Dragon Fruit (*Hylecereus undatus*) Plantlets from Leaf and Stem Explants. **Tropical Agricultural Research and Extension**, v. 14, n. 4, 2012.

- DE FIGUEIREDO CARVALHO, M. A. et al. Morphogenetic potential of native passion fruit (*Passiflora gibertii* NE Brown.) calli. **Brazilian Journal of Botany**, v. 36, n. 2, p. 141-151, 2013.
- DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 40, n. 3, p. 173-289, 2000.
- ELIAS, H. et al. The effects of plant growth regulators on shoot formation, regeneration and coloured callus production in *Echinocereus cinerascens* *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 120, n. 2, p. 729-739, 2015.
- FERNANDO, J. A. et al. New insights into the *in vitro* organogenesis process: the case of *Passiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 91, n. 1, p. 37-44, 2007.
- FIGUEIREDO, M. A. et al. Indução *in vitro* de calos em duas espécies de maracujazeiro nativo. **Revista Brasileira de Biociências** v. 5, p. 288-290, 2007.
- GEORGE, E. F. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Part 1, 2. ed. Edington: Exegetics, v. 1, p. 121-345, 1993.
- GÓMEZ, P.; CASTELLANOS-JUÁREZ, M. Micropropagación de pitahaya, *Hylocereus undatus* (HAWORTH), **Revista Salud Pública y Nutrición**, n. 4 p. 119- 128, 2012. (Edición Especial).
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. et al. Micropropagação. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, v. 1, p. 183-260, 1998.
- GUO, B. et al. Changes in endogenous hormones and H₂O₂ burst during shoot organogenesis in TDZ-treated *Saussurea involucre* explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 128, n. 1, p. 1-8, 2017.
- HERNÁNDEZ, Y. D. O. **Hacia el conocimiento y la conservación de la pitahaya**. Oaxaca: IPN-SIBEJ-CONACYT-FMCN, p. 124, 2000.
- JOY IV, R.W., THORPE, T. A. Shoot morphogenesis: structure, physiology, biochemistry and molecular biology. In: **Morphogenesis in plant tissue cultures**. Springer Netherlands, p. 171-214, 1999.
- LAMEIRA, O. A. et al. Effects of thidiazuron on callus induction and maintenance of *Cordia verbenacea* L. **Ciência Rural**, v. 27, n. 1, p. 47-49, 1997.
- LE BELLEC, F; VAILLANT, F; IMBERT, E. Pitahaya (*Hylocereus* spp.): a new fruit crop, a market with a future. **Fruits**, v. 61, n. 4, p. 237-250, 2006.
- LOPES, C. A. et al. Indução de calos, potencial embriogênico e estabilidade genética em pitaiá vermelha. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária)**, v. 11, n. 1, p. 21-25, 2016.

MENEZES, T. P. de; et al. Micropropagação e endoreduplicação em pitaya vermelha, *Hylocereus undatus* haw. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 6, p. 868–876, 2012.

NAKASHIMA, K. K. **Estudo do mecanismo de ação antirradicalar de betalainas**. 2015. 141 p. Dissertação (Mestrado Programa de Pós Graduação em Química) - Universidade de São Paulo, 2015.

PÁDUA, Marlúcia Souza. **Embriogênese somática e transformação genética em dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.)** 2015. 135 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

PELAH, D. et al. Organogenesis in the vine cactus *Selenicereus megalanthus* using thidiazuron. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 71, n. 1, p. 81-84, 2002.

PHILLIPS, G. C.; COLLINS, G. B. Red clover and other forage legumes. **Handbook of plant cell culture**, v. 2, p. 169-210, 1984.

PICKENS, K. A. et al. Effects of Colchicine and Oryzalin on Callus and Adventitious Shoot Formation of *Euphorbia pulcherrima* Winter Rose'. **HortScience**, v. 41, n. 7, p. 1651-1655, 2006.

PIERIK, R.L.M. **In vitro culture of higher plants**. 4th ed. Dordrecht: Kluwer Academic, p. 348, 1997.

SILVA R. de C. et al. Proteomic identification of differentially expressed proteins during the acquisition of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Journal of Proteomics**, v. 104, p. 112-127, 2014.

SILVA, C. V. da et al. **Germinação *in vitro*, organogênese em explantes radiculares e transformação genética de *Passiflora cincinnata* e *P. edulis***. 2009. 99 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

STUDIO, R. R. Studio: integrated development environment for R. RStudio Inc, Boston, Massachusetts, 2012.

SUÁREZ ROMÁN, R. S. et al. Multiplication of *Selenicereus megalanthus* (yellow pitahaya) and *Hylocereus polyrhizus* (red dragon fruit) by somatic organogenesis view. **Acta Agronómica**, v. 63, n. 3, p. 272-281, 2014.

SUGIYAMA, M. Organogenesis *in vitro*. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 61-64, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

THINESH, A.; SERAN, T. H. *In vitro* callogenesis from bud and stem explants of dragon fruit (*Hylocereus undatus*). **Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology**. v. 5, p. 253-256, 2015.

VENTURIERI, G. A., VENTURIERI, G. C. Callogenesis of *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum* hibrid (Sterculiaceae). **Acta amazônica**, v. 34, n. 4, p. 507-511, 2004.

CAPÍTULO 3

INFLUÊNCIA DAS DIFERENTES DENSIDADES DE FLUXO DE FÓTONS SOBRE PLÂNTULAS DE PITAIA *IN VITRO*

RESUMO

As pitaias são frutíferas que tem sido cultivadas em diversas partes do mundo devido a um crescente nicho no mercado de frutos exóticos e a sua tolerância a seca por possuir metabolismo CAM. Sua propagação é realizada por sementes ou de forma vegetativa, por estacas, porém por meio destas formas de propagação não se obtém um grande número de mudas. Neste contexto a micropropagação, uma técnica de multiplicação rápida, onde se produz um alto número de plantas geneticamente e fisiologicamente uniformes, pode ser uma alternativa promissora. Por meio dessa técnica pode-se estudar e controlar o efeito da luz e suas intensidades sobre as plantas, um parâmetro importante no cultivo *in vitro*. Assim este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a influência das diferentes intensidades luminosas (densidades de fluxo de fótons) sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas, anatomia e pigmentos fotossintéticos de *Hylocereus undatus* cultivadas *in vitro*. Sendo este, um trabalho pioneiro neste sentido. Os tratamentos consistiram em cinco densidades de fluxo de fótons (20,0; 57,0; 78,0; 102,0 e 139,0 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) com cinco repetições (4 tubos /repetição) dispostos em delineamento inteiramente casualizado. Após 45 dias foram avaliados os parâmetros: comprimento do cladódio, largura do cladódio na metade da altura, número de brotos e raiz, comprimento raiz principal e matéria seca de parte aérea e as plantas foram submetidas a análises anatômicas e de pigmentos fotossintéticos. A intensidade luminosa de 102,0 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ demonstra ser a mais indicada para o cultivo de pitaias de polpa branca (*H. undatus*) *in vitro* gerando um bom crescimento, com acúmulo de matéria seca de parte aérea, comprimento da raiz principal e largura na metade do cladódio desejáveis. Como também, proporciona plantas com características anatômicas e quantidade de pigmentos satisfatórios.

Palavras chave: intensidades de luz, caracterização anatômica, clorofila

ABSTRACT

The pitayas are fruit trees that have been grown in several parts of the world due to a growing niche in the exotic fruit market and their tolerance to drought by having CAM metabolism. Its propagation is carried out by seeds or vegetatively by cuttings, but by means of these forms of propagation, one does not obtain a large number of seedlings. In this context micropropagation, a technique of fast multiplication, where a high number of genetically and physiologically uniform plants is produced, can be a promising alternative. Through this technique studied and control the effect of light and its intensities on plants, an important parameter *in vitro* cultivation. The objective of this work was to evaluate the influence of different luminous intensities (photon flux densities) on the growth and development of plants, anatomy and photosynthetic pigments of (*Hylocereus undatus*) grown *in vitro*. This being a pioneering work in this regard. The treatments consisted of five photon flux densities (20.0, 57.0, 78.0, 102.0 and 139.0 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) with five replicates (4 tubes / replicate) arranged in completely randomized design. After 45 days, the following parameters were evaluated: cladode length, cladode width at half height, number of shoots and root, main root length and shoot dry matter, and plants were submitted to anatomical and photosynthetic pigment analyses. The luminous intensity of 102.0 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ is shown to be the most suitable for the cultivation of white pitaya (*H. undatus*) *in vitro* yielding a good growth, with an accumulation of shoot dry matter, main root length, and width at the middle of the desirable cladode. As well, it provides plants with anatomical characteristics and a satisfactory amount of pigments.

Key words: light intensity, anatomical characterization, chlorophyll

1 INTRODUÇÃO

As pitaias são frutíferas que tem sido cultivadas em diversas partes do mundo devido a um crescente nicho no mercado de frutos exóticos na Europa e Estados Unidos. No Brasil a região sudeste tem se destacado como maior produtora, mas existem diversos plantios distribuídos pelo país (CAETANO NUNES et al., 2014).

Outro aspecto que tem chamado a atenção, é a sua tolerância a seca devido ao seu metabolismo ácido das crassuláceas, um atributo importante para a agricultura em ambientes com secas prolongadas (MIZRAHI; NERD, 1999) elevando assim seu potencial econômico. Esse metabolismo é característico na família das cactáceas, família na qual a frutífera está inserida. Ela também pertence a subfamília Cactoideae, tribo Hylocereeae, gênero *Hyleocereus* (BARTHLOTT; HUNT, 1993).

A pitiaia (*Hylocereus undatus*), possui polpa branca e casca vermelha-rosa e sementes escuras (CAETANO NUNES et al., 2014), ocorrendo espontaneamente em ambientes sombreados de florestas tropicais no México, Índia, Vietnã e Américas Central e do Sul (BARTHLOTT; HUNT, 1993; INTA, 1994).

A sua propagação é feita por meio de sementes ou propagação vegetativa por frações de caule, enxertos ou até mesmo *in vitro* (meristemas ou óvulos) (ORTIZ-HERNÁNDEZ; CARRILLO-SALAZAR, 2012). Embora muitos cactos são de grande interesse comercial, existem poucos relatos da utilização de cultura de tecidos em comparação com outras famílias de plantas (MOEBIUS-GOLDAMMER; MATA-ROSAS; CHÁVEZ-AVILA, 2003).

A micropropagação é uma técnica de multiplicação, rápida onde se produz um alto número de plantas geneticamente e fisiologicamente uniformes. (HAZARIKA, 2006). O ambiente no qual essas plantas são submetidas é caracterizado por uma alta umidade relativa do ar, pequena troca de gases com o ambiente externo, baixa densidade de fluxo fotônico fotossintético entre outros (KOZAI; KUBOTA; JEONG, 1997). Essas condições de baixas intensidades de luz são comparadas a ambientes sombreados (SHIN; PARK; PAEK, 2013).

Segundo Macedo et al. (2011) a intensidade e a qualidade de luz são relevantes para o desenvolvimento e crescimento das plantas *in vitro*, sendo o mais importante dos desafios da cultura de tecidos fornecer quantidade e qualidade de luz suficientes para o desenvolvimento das plantas (DONG et al., 2014; SAMUELIENE et al., 2013).

Assim este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a influência das diferentes intensidades luminosas (densidades de fluxo de fótons) sobre o crescimento, anatomia e os

pigmentos fotossintéticos de *Hylocereus undatus* cultivadas *in vitro*. Sendo este, um trabalho pioneiro neste sentido.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Análises fitotécnicas

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Os explantes utilizados foram advindos de plântulas previamente germinadas e estabelecidas *in vitro*, e constituídos por segmentos de tecido meristemático (aréolas laterais) de cerca de um centímetro, cultivados em meio Phillips e Collins (1984) semissólido, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar e o pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem, 121°C durante 20 minutos. Os explantes foram inoculados em tubos contendo 15 mL de meio de cultura.

Os tratamentos consistiram em cinco densidades de fluxo de fótons (20,0; 57,0; 78,0; 102,0 e 139,0 $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) com cinco repetições (4 tubos /repetição) dispostos em delineamento inteiramente casualizado. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento, com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 45 dias. Após esse período foram avaliados os seguintes parâmetros: comprimento do cladódio, largura do cladódio na metade da altura, número de brotos e raiz, comprimento raiz principal e matéria seca de parte aérea.

2.2 Análise de pigmentos fotossintéticos

Os pigmentos fotossintéticos analisados foram clorofila a, clorofila b, clorofila total e carotenoides. A extração foi realizada, conforme metodologia descrita por Lichtenthaler e Buschmann (2001). Os tubos foram acondicionados em papel alumínio e transportados do Laboratório de Cultura de Tecidos até o Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Plantas (Departamento de Biologia/UFLA), para imediata extração e quantificação dos pigmentos.

Para a extração dos pigmentos, foram pesados 0,2g de matéria fresca dos cladódios e homogeneizadas com 10 mL de acetona 80% (v/v), filtrados em lã de vidro, completando-se o volume para 40 mL de acetona 80%. Imediatamente após este procedimento, foi realizada a leitura da absorbância a 663,2 nm, 646,8 nm e 470nm. Todo o procedimento foi realizado no escuro para evitar a degradação das clorofilas. Os teores clorofila e carotenoides foram

calculados seguindo as seguintes equações: clorofila a $[(12,25 \times A663,2) - (2,79 \times A646,8)]$; clorofila b $[(21,5 \times A646,8) - (5,1 \times A663,2)]$; clorofila total (a+b) e carotenoides $[(1000 \times A470) - (1,82 \times A663,2) - (85,02 \times A646,2)]/198$, sendo os resultados expressos em mg de pigmento por g de matéria fresca de tecido do cladódio.

2.3 Análises anatômicas

Foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia. As amostras do terço médio dos cladódios e das raízes, foram coletadas de quatro plantas diferentes por tratamento, previamente fixada em FAA 70% (formaldeído - ácido acético glacial - álcool etílico 70%) (JOHANSEN, 1940), por 72 horas e, posteriormente, conservada em etanol 70% (v/v-1). As secções transversais foram obtidas em micrótomo de mesa tipo LPC e as secções paradérmicas à mão livre, com uso de lâmina de aço, em seguida submetidas a clarificação com hipoclorito de sódio (1%-1,25% de cloro ativo), tríplice lavagem em água destilada e posteriormente os cortes foram corados com solução safrablau (azul de astra 0,1% e safranina 1%), para as secções transversais e secções paradérmicas e safranina 1% para a secções de raízes, sendo, posteriormente, montadas em lâminas semipermanentes com água glicerizada (KRAUS; ARDUIN, 1997).

As lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio óptico, modelo Olympus BX 60, acoplado à câmera digital Canon A630. As imagens foram analisadas em software, para análise de imagens UTHSCSA ImageJ, com cinco repetições, para cada variável analisada. As variáveis estudadas na parte radicular: espessura da epiderme da raiz, espessura do xilema e córtex, área do cilindro, área do xilema, quantidade de xilemas e área total da raiz. Na parte aérea foram consideradas: a área do cilindro e a espessura da epiderme do cladódio.

Para a caracterização dos estômatos, foram avaliados os parâmetros: densidade estomática (número de estômatos por mm^2), e a funcionalidade estomática, obtidos em microscópio Olympus CBB e Ken-a-vision 2100.

2.4 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística de variância e regressão pelo programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

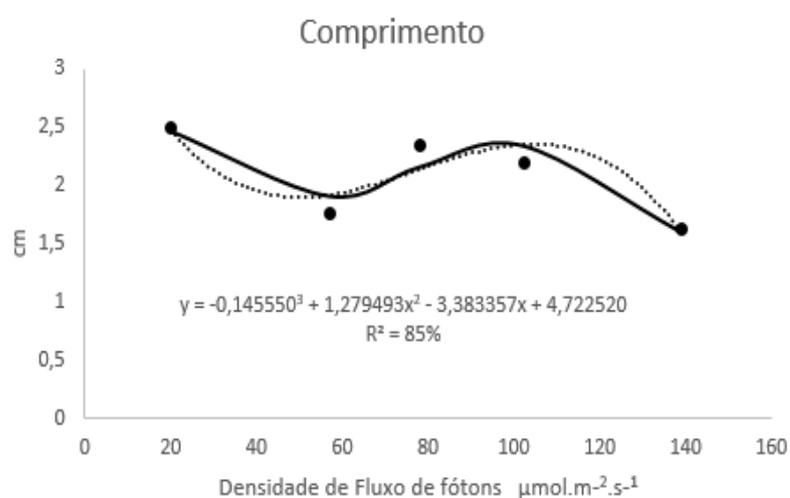
3.1 Análises fitotécnicas

As pitaias que foram submetidas a menor densidade de fluxo de fótons ($20,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), obtiveram maiores comprimentos dos cladódios (Figura 1). As plantas, apresentaram cor verde clara, finas e compridas, que lembravam estiolamento (Figura 2) para Merten (2003) cactáceas estioladas, cultivadas em ambientes sombreados, apresentam cladódios estreitos e alongados, similares aos observados neste estudo.

As plantas submetidas a segunda intensidade de luz ($57,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) demonstraram um menor crescimento (Figura 3.1) e coloração verde mais intenso comparados ao tratamento anterior (Figura 2). Já na intensidade ($78,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) as plantas alcançaram um maior tamanho (2,74 cm) (Figura 1) e uma cor que variava entre o verde escuro e o arroxeado (Figura 2). Nas seguintes intensidades, ($102,0$ e $139,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a cor roxa foi cada vez mais acentuada (Figura 2) e o comprimento diminuiu até atingir seu menor valor (2,24 cm), na maior intensidade de $139,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 3.1).

Foi observado a presença de muitos espinhos nas plantas e estes que foram se intensificando em quantidade à medida que a intensidade foi maior (Figura 3.2).

Figura 3.1- Comprimento de plântulas de pitaiia submetidas a diferentes densidades de fluxo de fótons ($20,0$; $57,0$; $78,0$; $102,0$ e $139,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) *in vitro*.



Fonte: Do autor (2016)

Figura 3.2- Plântulas de pitaia (*Hylocereus undatus*) submetidas a diferentes densidades de fluxo de fótons (20,0; 57,0; 78,0; 102,0 e 139,0 $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) *in vitro* aos 45 dias.



Fonte: Do autor (2016)

Em seus estudos, Cavalcante (2011) observou a influência das intensidades luminosas no crescimento e desenvolvimento inicial em pitaias em campo no Piauí, onde cerca de 50% de cobertura no mínimo, contra a incidência direta de sol geraram maior crescimento de plantas.

Segundo Donadio (2009) a pitaia se adapta melhor a climas subúmidos e meia sombra, mais pode se adaptar a climas de tipos diversos, desde os tropicais aos subtropicais até aos áridos. Moraes Neto et al. (2000) comentam que a habilidade de crescer rapidamente em ambientes moderadamente sombreados é um artifício significativo de adaptação da espécie que propicia uma artimanha para evadir-se das condições com baixas intensidades luminosas.

Quando considerado o aumento expressivo de espinhos nas maiores intensidades, De La Rosa-Manzano, Flores e Delgado-Sánchez (2016), comentam que o sombreamento dos espinhos é um mecanismo de proteção da exposição a luz.

Já o aumento da pigmentação roxa pode estar associado a presença de betalaínas, mais especificamente betacianinas, grupo de coloração vermelho-violeta (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000) presentes em algumas famílias da ordem Caryophyllales, que parecem ter funções adicionais nas plantas ligadas à inativação de espécies reativas, sendo ineficazes na absorção no espectro UV, podendo gerar mais reflexão

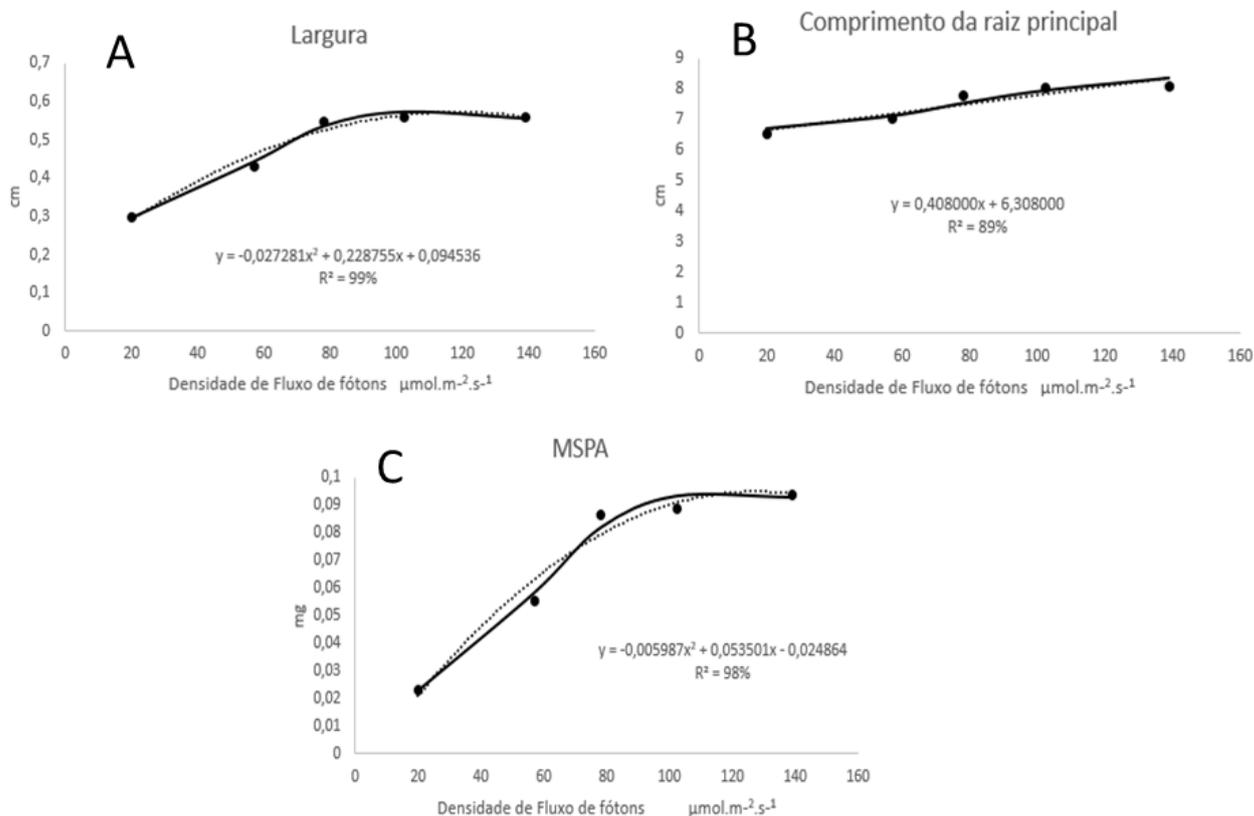
(BROCKINGTON et al., 2011).e, assim, pode ter potencializado a cor do pigmento nessas plantas.

Para a variável largura na metade do cladódio houve um engrossamento à medida que a intensidade aumentou até obter uma estabilidade a partir de 102,0 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Figura 3.3A).

Cavalcante (2011) observou menores diâmetros do cladódio à medida que se aumentou a intensidade de luz em pitaias cultivadas em campo.

Comportamento semelhante foi observado para a análise de comprimento da raiz principal que atingiu uma extensão maior em maiores intensidades até ficar constante 8,07 cm (102,0 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) e 8,1 cm (139,0 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (Figura 3.3B). Esse comportamento também foi observado na matéria seca de parte aérea com uma resposta significativa a medida que a densidade foi aumentada, até que nas duas maiores intensidades se manteve em equilíbrio (Figura 3.3C).

Figura 3.3- Parâmetros largura na metade do cladódio, comprimento da raiz principal e matéria seca de parte aérea de plântulas de pitaia submetidas a diferentes densidades de fluxo de fótons (20,0; 57,0; 78,0; 102,0 e 139,0 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) *in vitro*.



Legenda: A) Largura na metade do cladódio B) Comprimento da raiz principal C) Matéria seca de parte aérea

Fonte: do autor (2016)

Para as variáveis número de brotos e raiz não houve diferença significativa (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Parâmetros não significativos

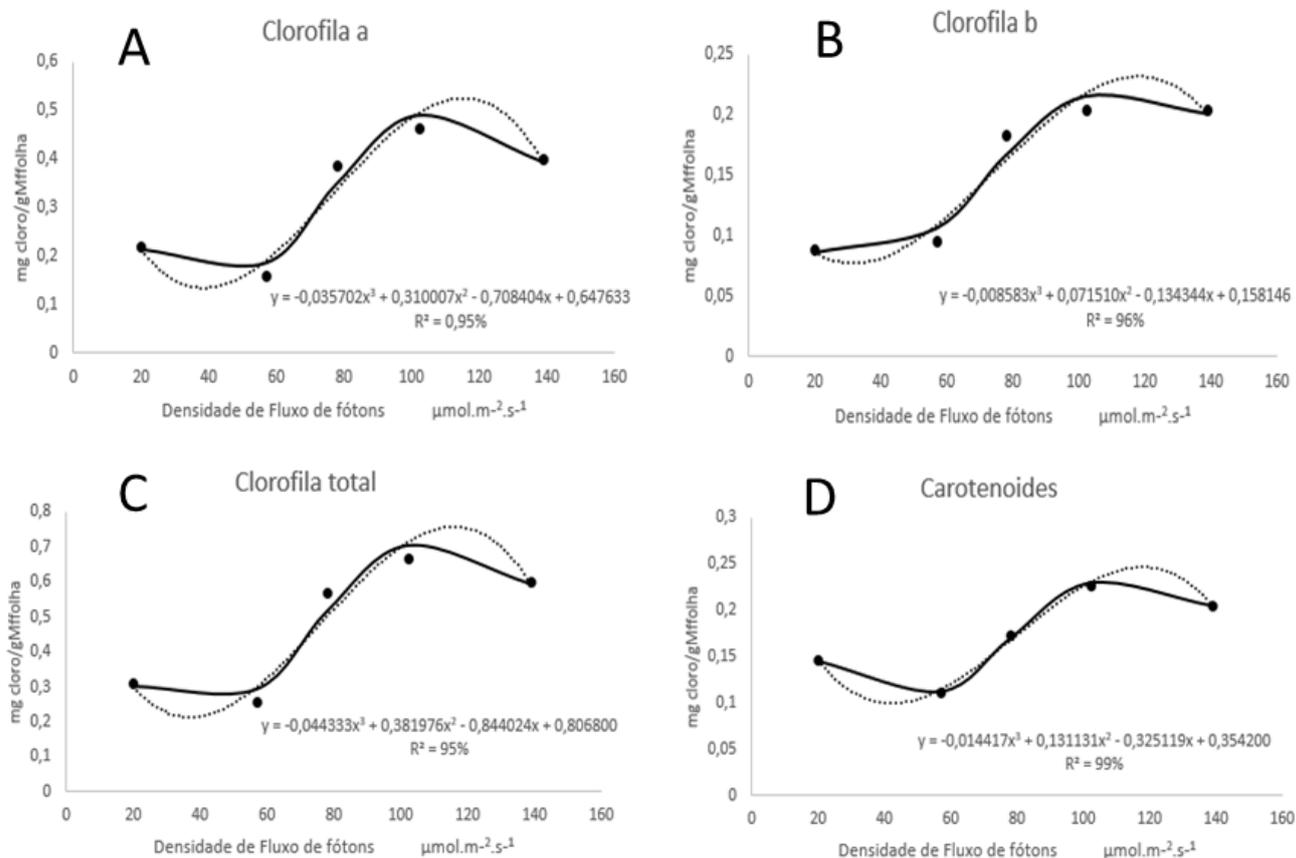
Variáveis	Intensidade Luminosa ($\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)				
	20	57	78	102	139
Número de brotos	1,65	2,2	1,9	2,1	2,45
Número de raiz	1,65	1,5	1,55	1,7	1,45

Fonte: Do autor (2016)

3.2 Análise de pigmentos fotossintéticos

Foi observado o mesmo comportamento em todos os pigmentos fotossintéticos estudados. Um aumento da produção destes foi evidenciada com o aumento da intensidade luminosa de ($20,0 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) para ($102,0 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), onde o auge foi observado na intensidade $102,0 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. (Figura 3.4 A,B,C,D).

Figura 3.4: Teores de pigmentos fotossintéticos em plântulas de pitaia submetidas a diferentes densidades de fluxo de fótons (20,0; 57,0; 78,0; 102,0 e 139,0 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) *in vitro*.



Legenda: A) Teores de clorofila, B) Teores de clorofila b, C) Teores de clorofila total, D) Teores de carotenoides

Fonte: Do autor (2016)

Almeida (2015) estudando o efeito do sombreamento sobre a pitaia vermelha em campo, observou que as plantas cultivadas em sombreamentos de 65% e 80% apresentavam maiores quantidades de clorofila total. Também encontrou maiores quantidades de clorofila a, à medida que a intensidade de luz diminuía até chegar a 65% onde, a partir daí a clorofila b se tornou mais expressiva.

Raveh, Nerd e Mizrahi (1998), ao estudar as respostas de dois cactos hemiepícticos (*Selenicereus megalanthus* e *Hylocereus polyrhizus*) submetidas a diferentes graus de sombra, descreveram aumento de quantidade de clorofila total e de carotenoides com o aumento do sombreamento.

Em três bromeliáceas, das quais duas delas possuíam ciclo CAM, submetidas a 3 irradiancias: baixa (30 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$), média (95 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) e alta (340 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$), Keller

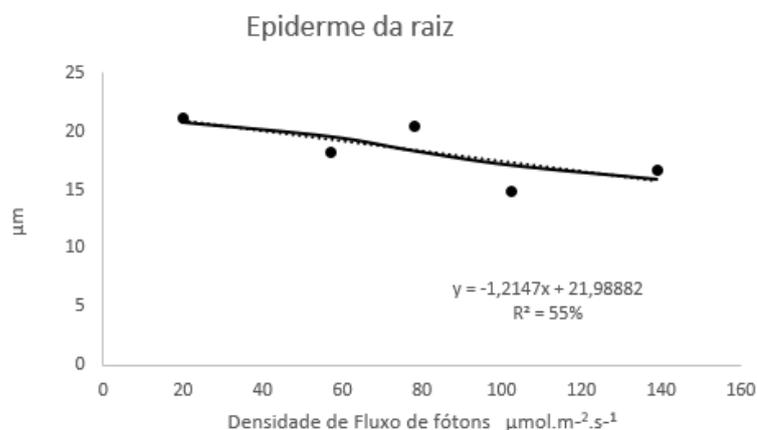
e Lüttge (2005) observaram que na transferência da menor para a maior irradiância as plantas puderam usar esse aumento para a fotossíntese no seu ciclo CAM, o que provavelmente pode estar ocorrendo neste trabalho.

À medida que as intensidades sofreram acréscimo a planta pode ter investido mais em fotossistema II, podendo assim ter gerado mais ATP para consumo no seu metabolismo ácido crassuláceo.

3.3 Análises anatômicas

As análises anatômicas de pitaia permitiram observar que para espessura da epiderme da raiz, houve um comportamento linear no qual demonstra que essa camada de células foi diminuindo a medida que a intensidade de luz foi se intensificada (Figura 3.5).

Figura 3.5- Espessura da epiderme da raiz de plântulas de pitaia submetidas a diferentes densidades de fluxo de fótons (20,0; 57,0; 78,0; 102,0 e 139,0 $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) *in vitro*



Fonte: Do autor (2016)

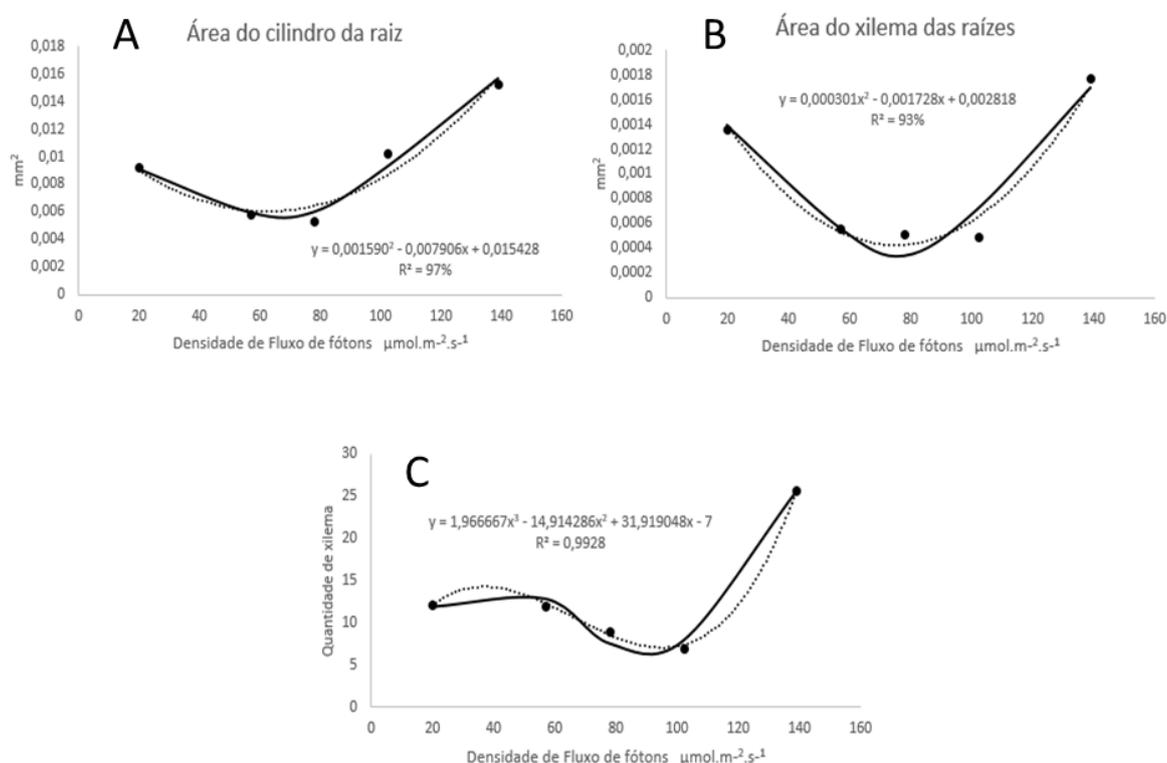
Sugere-se que ambiente *in vitro* mesmo com a alteração de intensidades de luz não foi hostil por ter alta umidade, assim a planta não sentiu necessidade de espessamento da epiderme radicular, além de que a planta já possuiu diversos outros mecanismos de sobrevivência, como exemplo a modificação do caule para o armazenamento de água, a redução ou ausência de folhas e a superfície cerosa que a permitem tolerar condições adversas (LUDERS; MCMAHON, 2006).

Considerando a área do cilindro da raiz, que engloba floema e xilema (TAIZ; ZEIGER, 2013). é observado um aumento relevante nos dois últimos tratamentos (102,0 e 139,0 $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) como é demonstrado na Figura 3.6 A.

Para a variável área do xilema das raízes o ápice de área é também evidenciado na maior intensidade (139,0 $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)(Figura 3.6 B).

Quando se trata da quantidade de xilemas nas raízes houve uma expressiva progressão em sua quantia, (Figura 3.6 C), saltando de 7 no quarto tratamento (102,0 $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) para 25,8 no quinto tratamento/menor intensidade (139,0 $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). O xilema transporta água e solutos para a parte aérea (TAIZ; ZEIGER, 2013) e parece haver uma ligação entre a maior intensidade e o número elevado de xilemas, expressando uma maior necessidade da parte aérea de receber esses produtos.

Figura 3.6-Parâmetros Área do cilindro da raiz, área do xilema das raízes e quantidade de xilemas.

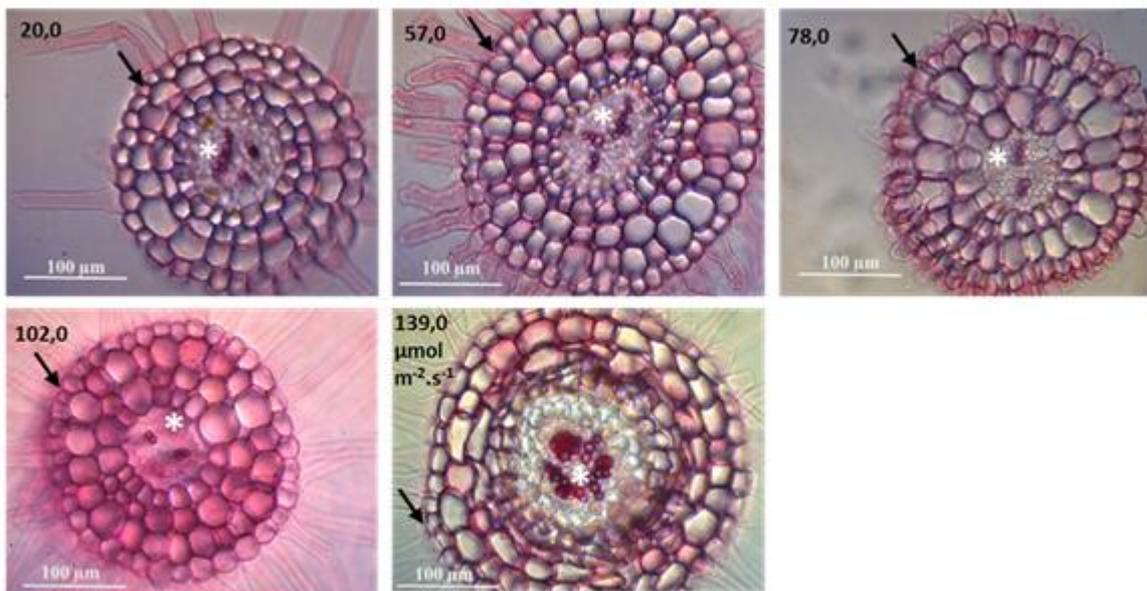


Legenda: A) Área do cilindro da raiz B) Área do xilema das raízes e C) Quantidade de xilemas em plântulas de pitaia submetidas a diferentes densidades de fluxo de fótons (20,0; 57,0; 78,0; 102,0 e 139,0 $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) *in vitro*.

Fonte: Do autor (2016)

Na maior intensidade de luz a planta obteve maior quantidade de recurso (energia luminosa) e assim conseguiu sintetizar uma maior quantidade e maior área de xilemas, como também uma maior área de cilindro vascular; (Figura 3.7) convergindo seus recursos para essas estruturas que lhe proporcionariam um melhor desenvolvimento.

Figura 3.7- Fitomicrografias de secções transversais de raízes de pitaia submetidas a diferentes densidades de fluxo de fótons (20,0; 57,0; 78,0; 102,0 e 139,0 $\mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) *in vitro*,

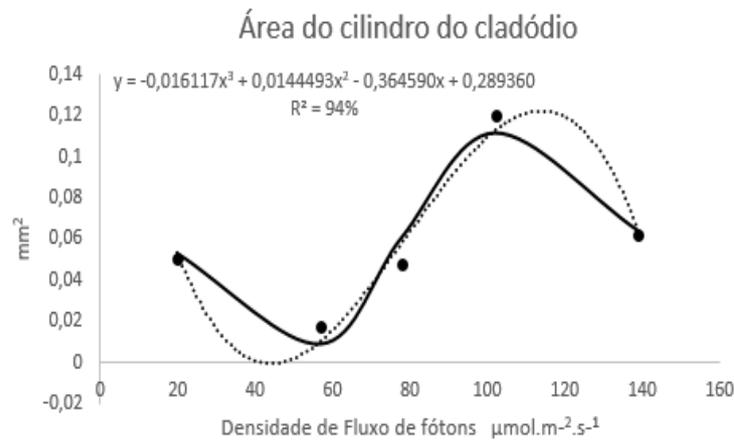


Legenda: Setas demonstram a epiderme e (*) o cilindro central com seus feixes vasculares.

Fonte: Do autor (2016)

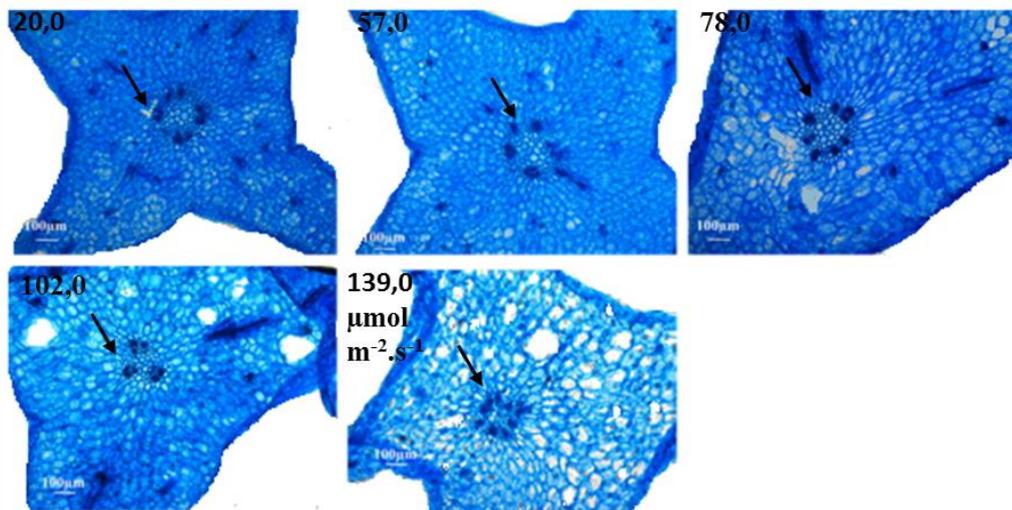
Avaliando-se a área do cilindro do cladódio percebe-se que essa estrutura teve uma maior área quando as plantas foram submetidas a uma intensidade ($102,0 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) (Figuras 3.8 e 3.9) ou seja houve ganho em tecido de condução. O Cladódio é um órgão fotossintetizante, um aumento da espessura desse tipo de órgão destina-se a equilibrar os níveis internos de luz e CO_2 , proteger o aparato fotossintético e possibilitar, que um maior número de células sejam resguardadas ao ressecamento e desidratação pelo sol (GONÇALVES et al., 2010); (SARIJEVA et al., 2007).

Figura 3.8- Área do cilindro do cladódio de plântulas de pitaia submetidas a diferentes densidades de fluxo de fótons (20,0; 57,0; 78,0; 102,0 e 139,0 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) *in vitro*.



Fonte: Do autor (2016)

Figura 3.9- Fitomicrografias de seções transversais de cladódios de pitaia submetidas a diferentes densidades de fluxo de fótons (20,0; 57,0; 78,0; 102,0 e 139,0 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) *in vitro*.



Legenda: Setas demonstram o cilindro do cladódio

Fonte: Do autor (2016)

A Densidade estomática obteve valores constantes em todos tratamentos, exceto para tratamento com a intensidade luminosa de 102,0 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ onde expressou seus maiores valores (22,42 μm) (Figura 3.10). Ou seja, nesse tratamento houve mais estômatos por área (Figura 3.11).

Figura 3.10- Densidades de estômatos de plântulas de pitaia submetidas a diferentes densidades de fluxo de fótons (20,0; 57,0; 78,0; 102,0 e 139,0 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) *in vitro*.

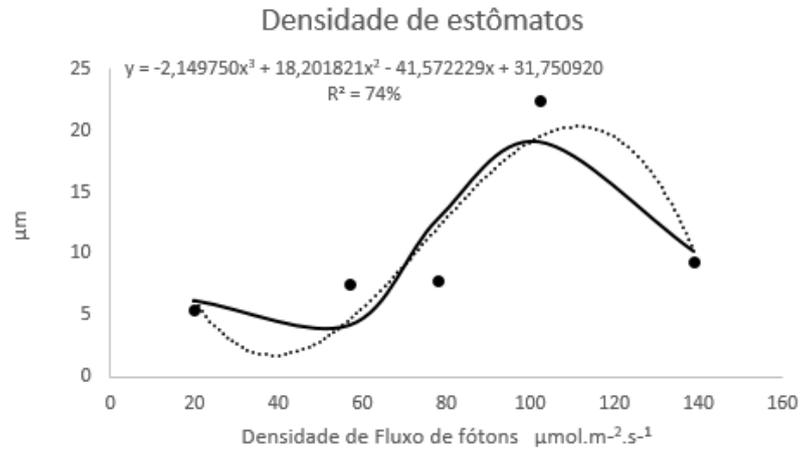
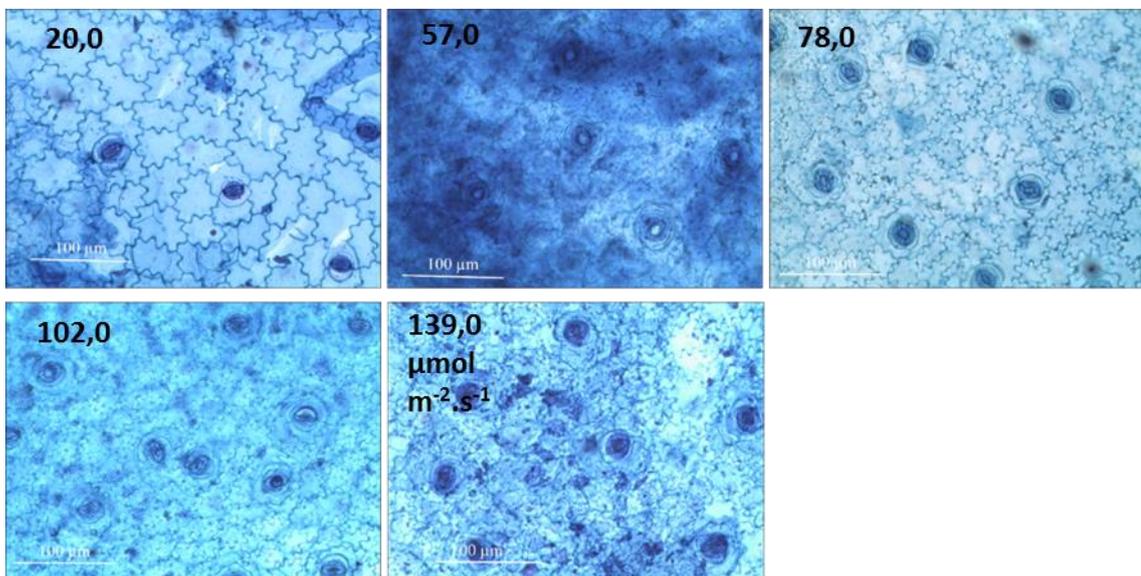


Figura 3.11. Fitomicrografias de secções paradérmicas evidenciando número de estômatos por área em plântulas de pitaia submetidas a diferentes densidades de fluxo de fótons (20,0; 57,0; 78,0; 102,0 e 139,0 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) *in vitro*.



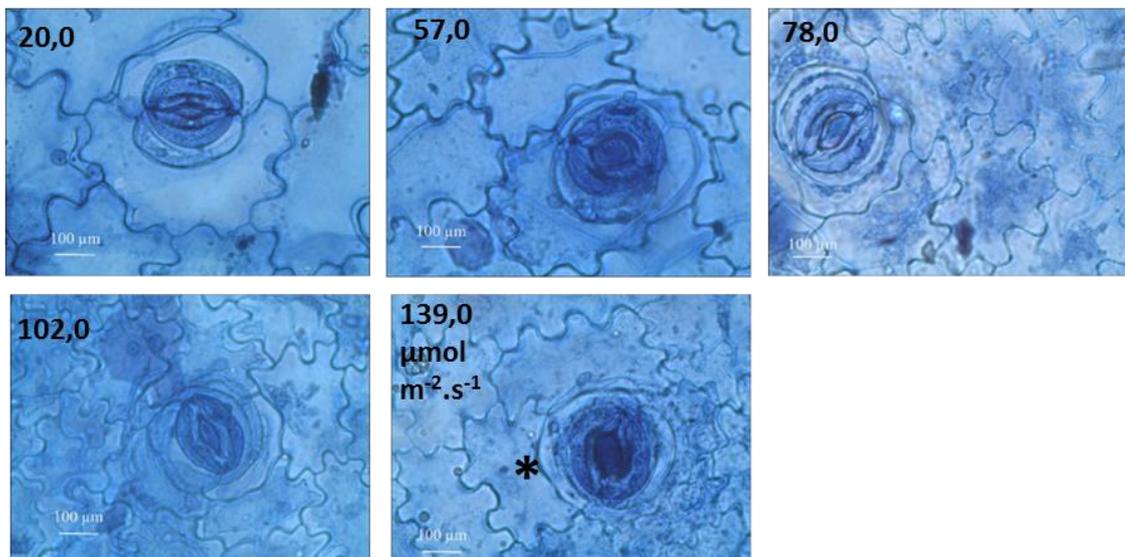
Fonte: Do autor (2016)

Garcia (2011) ao estudar a morfologia funcional de duas espécies epífitas de cactáceas *Lepismium lumbricoides* (Lem.) Barthlott e *Rhipsalis floccosa* Salm-Dyck ex Pfeiff, observou em seus estudos que baixa incidência luminosa e alta umidade geraram baixa densidade estomática.

As diferentes irradiâncias podem atingir o controle e a abertura dos estômatos (TAIZ; ZEIGER, 2013), quando há uma baixa disponibilidade de luz, os estômatos são afetados por perda na atividade fotossintética e na quantidade de água, além de um mau funcionamento (APÓSTOLO; BRUTTI; LLORENTE, 2005).

Foi possível observar que a espécie possui estômatos paralelocíticos e observar a presença de estômatos bastante elipsoides tratamento com $102,0 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Figura 3.13).

Figura 3.13- Fitomicrografias de secções paradérmicas evidenciando estômatos em plântulas de pitáia submetidas a diferentes densidades de fluxo de fótons ($20,0$; $57,0$; $78,0$; $102,0$ e $139,0 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) *in vitro*.



Legenda: Estômatos elipsoides no tratamento com $102,0 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e (*) demonstram a presença de estômatos paralelocíticos.

Fonte: Do autor (2016)

É importante considerar que não houve diferença significativa quanto a funcionalidade dos estômatos, porém, os estômatos do tratamento com $102,0 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ apresentaram um formato aparentemente mais elipsoide, podendo ser considerados mais funcionais.

Também não houve diferença significativa para as variáveis: espessura do xilema e do córtex da raiz, área total das raízes, espessura da epiderme do cladódio, (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 – Parâmetros não significativos

Variáveis	Intensidade Luminosa ($\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)				
	20	57	78	102	139
Espessura do xilema (μm)	7,854	7,2282	7,5108	7,344	8,018
Espessura do córtex (μm)	82,5226	75,1586	79,0956	70,607	81,3254
Área total da raiz (μm^2)	0,0492	0,0512	0,0514	0,056	0,0464
Espessura da epiderme do cladódio (μm)	23,7206	35,7962	30,3474	25,5148	35,2842
Funcionalidade (μm)	1,264	1,086	1,3946	1,4196	1,3538
Diametro polar (μm)	38,6319	43,1724	39,4649	41,4521	41,6139

Fonte: Do autor (2016)

O tratamento onde as plantas foram submetidas a densidade de fluxo de fótons 102,0 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ obteve resultados satisfatórios para a maioria das variáveis analisadas.

4 CONCLUSÕES

A intensidade luminosa de 102,0 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ demonstra ser a mais indicada para o cultivo de pitaias de polpa branca (*H. undatus*) *in vitro*, nesta obteve-se um bom crescimento e características desejáveis

Como também, essa intensidade proporciona plantas com características anatômicas e quantidade de pigmentos satisfatórios.

REFERÊNCIAS

- APÓSTOLO, N.; BRUTTI, C. B.; LORENTE, B. E. Leaf anatomy of *Cynara scolymus* L. in successive micropropagation stages. **In: *Vitro Cellular & Developmental***, n. 3, v. 41, p. 307-313, 2005.
- BARTHLOTT, W., D.R. HUNT. Cactaceae. En: K. Kubitzki(ed.).The families and genera of vascular plants. **Springer-Verlag**, Alemanha. p. 161-19, 1993.
- BROCKINGTON, S. F. et al. Complex pigment evolution in the Caryophyllales. **New Phytologist**, v. 190, n. 4, p. 854-864, 2011.
- CAETANO NUNES, D. G. et al. Estandarización de un protocolo de regeneración *in vitro* para pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus* (k. schum. ex vaupel) moran). **Acta Agronómica**; v. 63, n. 1, p. 31-41, 2014.

- CAVALCANTE, I. H. L. et al. Adubação orgânica e intensidade luminosa no crescimento e desenvolvimento inicial da pitaya em Bom Jesus-PI. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 970-982, 2011.
- DE LA ROSA-MANZANO, E.; FLORES, J.; DELGADO-SÁNCHEZ, P. Effects of spine-shading on aspects of photosynthesis for three cactus species. **Botanical Sciences**, v. 94, n. 2, p. 301-310, 2016.
- DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 40, n. 3, p. 173-289, 2000.
- DONADIO, L. C. Pitaya. **Revista Brasileira de fruticultura**, v. 31, n. 3, p. 637-929, 2009.
- DONG, C. et al., **Advances in Space Research**, v. 53, p. 1557-1566, 2014.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez, 2011.
- GARCIA, S. L. F. P. **Morfologia funcional de duas espécies epífitas de Cactaceae**. 2011.
- GONÇALVES, J. F. C. et al. Análise dos transientes da fluorescência da clorofila a de plantas jovens de *Carapa guianensis* e de *Dipteryx odorata* submetidas a dois ambientes de luz. **Acta Amazônica**, v. 40, p. 89-98, 2010.
- HAZARIKA B. N. Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants. **Sci Hort**, v. 108, p. 105–120, 2006.
- INTA. Instituto Nicaraguense de Tecnología Agropecuária. **Guía técnica para la producción de pitahaya**. San Marcos: INTA, 1994. 52p.
- JOHANSEN, D.A.. **Plant microtechnique**. 1. ed. New York: McGraw Hill, 1940. p. 523.
- KELLER, P.; LÜTTGE, U. Photosynthetic light-use by three bromeliads originating from shaded sites (*Ananas ananassoides*, *Ananas comosus* cv. Panare) and exposed sites (*Pitcairnia pruinosa*) in the medium Orinoco basin, Venezuela. **Biologia plantarum**, v. 49, n. 1, p. 73, 2005.
- KOZAI T, KUBOTA C, JEONG B. R. Environmental control for the large-scale production of plants through in vitro techniques. **Plant Cell Tiss Org Cult**, v. 51, p. 49–56, 1997.
- KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: UFRRJ, 1997. p. 198.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C.. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. **Current protocols in food analytical chemistry**, 2001.

LUDERS, L.; MCMAHON, G. The pitaya or Dragon Fruit (*Hylocereus undatus*). Austrália: Northern Territory Government. **Department of Primary Industry, Fisheries and Mines**, n. D42, p. 4, 2006 (Relatório técnico).

MACEDO A. F. et al. The effect of light quality on leaf production and development of *in vitro*-cultured plants of *Alternanthera brasiliana* Kuntze. **Environ Exp Bot** 70:43–50, 2011.

MERTEN, S. A review of *Hylocereus* production in the United States. **Journal of the Professional Association for Cactus Development**, Davis, v. 5, p. 98-105. 2003.

MIZRAHI, Y.; NERD, A. Climbing and columnar cacti: new arid land fruit crops. In: JANICK, J (Ed.) Perspective on new crops and new uses. **ASHS Press**, Alexandria, p. 358-366, 1999.

MOEBIUS-GOLDAMMER, K. G.; MATA-ROSAS, M.; CHÁVEZ-AVILA, V.N. M. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lem.) K. Schum. (Cactaceae), an endemic and endangered Mexican species. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 39, n. 4, p. 388-393, 2003.

MORAES NETO, S. P. et al. Crescimento de mudas de algumas espécies arbóreas que ocorrem na mata atlântica em função do nível de luminosidade. **Revista Árvore**, v. 24, n. 1, p. 35-45, 2000.

ORTIZ-HERNÁNDEZ, Y. D.; CARRILLO-SALAZAR, J. A. Pitahaya (*Hylocereus* spp.): A short review. **Comunicata Scientiae**, v. 3, n. 4, p. 220-237, 2012.

PHILLIPS, G. C.; COLLINS, G. B. Red clover and other forage legumes. **Handbook of plant cell culture**, v. 2, p. 169-210, 1984.

RAVEH, E.; NERD, A.; MIZRAHI, Y. Responses of two hemiepiphytic fruit crop cacti to different degrees of shade. **Scientia Horticulturae**, v. 73, n. 2, p. 151-164, 1998.

SAMUOLIENĖ, G., et al. **Central European Journal of Biology**, v. 8, P. 1241-1249, 2013.

SARIJEVA, G. et al. Differences in photosynthetic activity, chlorophyll and carotenoid levels, and in chlorophyll fluorescence parameters in green sun and shade leaves of Ginkgo and Fagus. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 950-955, 2007.

SHIN, K. S.; PARK, P. K. Y. Sugar metabolism, photosynthesis, and growth of in vitro plantlets of *Doritaenopsis* under controlled microenvironmental conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 49, n. 4, p. 445-454, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.