

GERMINAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE CACTOS NATIVOS DA BAHIA

EVA P.S. BÁRBARA¹, ADIELLE A. SILVA¹, MAÍRA M.O.R. SOUZA^{1,2}, ZAFIRA E.R. GURGEL^{1,3},
MARIA N.G. MARCHI^{1,4} & MOEMA C. BELLINTANI^{1,2,*}

¹ Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. *E-mail: moemabellintani@gmail.com.

² Programa de Pós-Graduação em Genética e Biodiversidade, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.

³ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brasil.

⁴ Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brasil.

Recebido em Março de 2015. Aceito em Abril de 2015. Publicado em Maio de 2015.

RESUMO – O leste do Brasil é o terceiro centro de diversidade de cactáceas, sendo a Bahia um centro de endemismo e diversificação. Porém, as populações estão ameaçadas com a coleta indiscriminada e destruição de habitats, sendo necessárias ações de conservação. A conservação *ex situ*, através do estabelecimento *in vitro* e da criação de criobancos de sementes, pode ser uma estratégia viável na conservação do germoplasma das espécies. Objetivou-se neste trabalho estabelecer a metodologia ideal para quebra de dormência em sementes de *Melocactus azureus* e avaliar a qualidade fisiológica de sementes criopreservadas por até 360 dias de *Pilosocereus pachycladus*. Para potencializar a germinação de *M. azureus*, as sementes foram submetidas a oito tratamentos, utilizando imersão em água, ácido sulfúrico e giberelina em diferentes concentrações e períodos. Quanto à criopreservação, sementes de *P. pachycladus* foram armazenadas em criotubos e imersas diretamente em nitrogênio líquido por diferentes períodos. O melhor tratamento para a quebra de dormência de sementes do *M. azureus* foi giberelina 1000 mg L⁻¹ por duas horas. Já na criopreservação, não houve diferença estatística entre as variáveis na análise das sementes de *P. pachycladus*, o que demonstra esta espécie pode ser conservadas em nitrogênio líquido (-196°C) sem a utilização de crioprotetores e mantendo a sua qualidade fisiológica.

PALAVRAS-CHAVE: *cacto, conservação, dormência, estabelecimento in vitro, germinabilidade.*

SEED GERMINATION AND CRYOPRESERVATION OF NATIVE CACTI FROM BAHIA

ABSTRACT – Eastern Brazil is the third center of cactus diversity, where Bahia is the center of endemism and diversity. However, populations are threatened, such as the indiscriminating collection and destruction of habitats, requiring conservation action. The *ex situ* conservation, by establishing *in vitro* establishment and the creation of seed cryopreservation banks, can be viable strategies in the conservation of germplasm of the species. The aim of this study was to determine the ideal methodology to break seed dormancy of *Melocactus azureus* and evaluate the physiological quality of cryopreserved seeds for up to 360 days of *Pilosocereus pachycladus*. To encourage the germination *M. azureus* seeds, were subjected to eight treatments using immersion in water, sulfuric acid and gibberellic acid in different concentrations and periods. For cryopreservation, seeds of *P. pachycladus* were stored in cryovials and directly immersed in liquid nitrogen for different periods. The best treatment for *M. azureus* seed dormancy breaking was gibberellin 1000 mg L⁻¹ for two hours. Regarding to cryopreservation, there was no statistical difference between the variables at different stages of *P. pachycladus* seed storage, which shows that this species can be preserved in liquid nitrogen (-196°C) without the use of cryoprotectants and maintaining its physiological quality.

KEYWORDS: *cactus, conservation, dormancy, in vitro establishment, germination.*

GERMINACIÓN Y CRIOPRESERVACIÓN DE SEMILLAS DE CACTUS NATIVOS DE BAHIA

RESUMEN – El este de Brasil es considerado el tercer centro de diversidad de cactáceas, siendo Bahia un centro de endemismo y diversificación del género. Sin embargo, las poblaciones han sufrido amenazas, como la recolecta indiscriminada y destrucción de hábitats, siendo necesarias acciones de conservación. La conservación *ex situ*, a través del establecimiento *in vitro* y de la creación de bancos de semillas criopreservadas, pueden ser estrategias viables para la conservación del germoplasma de las especies. Se objetivó investigar la presencia de dormición de semillas y evaluar métodos de superación en las semillas de *Melocactus azureus*, además de establecer protocolos de criopreservación para semillas de *Pilosocereus pachycladus*. Para la evaluación de la dormición, se sometieron semillas de *M. azureus* a ocho tratamientos utilizando inmersión en agua, ácido sulfúrico y giberelina en diferentes concentraciones y períodos. Para evaluar la criopreservación, se almacenaran semillas de *P. pachycladus* en criotubos y se sumergieron las semillas directamente en nitrógeno líquido durante diferentes períodos. El mejor tratamiento para la superación de la dormición en semillas de *M. azureus* fue giberelina 1000 mg L⁻¹ durante dos horas. En relación a la criopreservación, no se observó diferencia estadística entre las variables analizadas durante los diferentes períodos de almacenamiento de semillas de *P. pachycladus* y esto demuestra que a esta especie se puede conservar en nitrógeno líquido (-196°C) sin el uso de crioprotectores y mantener su calidad fisiológica.

PALABRAS CLAVE: *cactus, conservación, dormición, establecimiento in vitro, germinación.*

INTRODUÇÃO

A família Cactaceae apresenta cerca de 100 gêneros e 1400 espécies distribuídas em uma ampla diversidade de climas e ecossistemas do Novo Mundo, do norte do Canadá à Patagônia, com exceção de *Rhipsalis baccifera* (J.M. Muell.) Stearn, que também ocorre na África tropical, Madagascar, ilhas no Oceano Índico e Sri Lanka (Anderson, 2001; Judd *et al.*,

2009). Representa a segunda família em ordem de tamanho entre as plantas vasculares endêmicas das Américas, com as Bromeliaceae em primeiro lugar (Zappi *et al.*, 2011).

No continente americano, a família possui quatro centros geográficos de diversidade. O leste do Brasil é o terceiro em ordem de importância, sendo apenas precedido pelo México, Sudoeste dos Estados Unidos e cadeia dos Andes, Peru e Bolívia (Taylor e Zappi, 2004; Zappi *et al.*, 2011).

No território brasileiro, o Nordeste e a maior parte do Sudeste, exceto o sul do Rio de Janeiro e São Paulo, abrigam 28 dos 39 gêneros nativos, dentre os quais 12 são endêmicos (Taylor e Zappi, 2004; Zappi *et al.*, 2011). A Bahia é um dos centros de dispersão das cactáceas (Barroso *et al.*, 2002) e um dos estados do Brasil que apresenta o maior número de espécies endêmicas. Na Bahia, a Chapada Diamantina, principalmente nas regiões de Caatinga, é local de ocorrência das cactáceas. O bioma Caatinga apresenta características desérticas, com índices pluviométricos baixos e solos mineralmente ricos, pobres em nutrientes e ácidos, formando depósitos arenosos ou pedregosos (Leal *et al.*, 2003). Esse bioma tem sofrido diversas ameaças que, ao longo dos anos, está comprometendo o tamanho das populações naturais e colocando algumas espécies de cactos em risco de extinção (Zappi *et al.*, 2011). As principais ameaças relatadas para a cactáceas estão relacionadas à fragmentação do hábitat, principalmente ocasionado pelo desmatamento, desenvolvimento agrícola e diversos tipos de distúrbios ambientais, como o trânsito de pessoas, expansão urbana, pisoteio por animais e invasão do substrato por Poaceae. Além desses fatores ainda existe a coleta ilegal de grandes quantidades de sementes e plantas para o abastecimento do mercado de horticultura, ornamental e mineração, com a destruição dos afloramentos rochosos (Zappi *et al.*, 2011). Essas ameaças tornam-se mais agravantes no caso de espécies que são endêmicas e com distribuição restrita, como *Melocactus azureus* Buining & Brederoo. As características morfológicas que despertam o interesse para sua utilização ornamental, bem como o seu hábito de vida em afloramento rochosos aplanados e rasos, cujo substrato é muito procurado para utilização na fabricação de cimento, são motivos que contribuem para sua ameaça de extinção (Lone *et al.*, 2007; Zappi *et al.*, 2011) e inclusão na *redlist* da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN) e no Apêndice II da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e da Flora Silvestres Ameaçadas de Extinção (CITES). Além de ser endêmica e de distribuição restrita, outro fator que torna essa espécie ainda mais vulnerável é o fato dela não estar inserida em nenhuma unidade de conservação.

Pilosocereus pachycladus F.Ritter é endêmico do Nordeste brasileiro e possui ocorrência mais ampla em relação ao *M. azureus* e, assim como outras espécies desta família, contribui para a sustentabilidade do bioma Caatinga (Correia *et al.*, 2011). É comumente chamado de facheiro e, juntamente com outras espécies do gênero, como o *Pilosocereus gounellei* (F.A.C. Weber) Byles & Rowley subsp. *gounellei* (xique-xique), apresenta importância econômica para as comunidades onde ocorrem. Essa espécie, atualmente, não está listada como ameaçada de extinção, embora o seu habitat venha sendo drasticamente destruído (Zappi *et al.*, 2011).

A conservação *ex situ* apresenta algumas vantagens em relação à conservação *in situ*, como a redução da necessidade de espaço, diminuição de despesas e custos de trabalho, facilidade no intercâmbio de germoplasma e redução da erosão genética (Engelmann, 1991). A cultura de tecidos vegetais é um eficiente método para a conservação *ex situ* da diversidade genética, permitindo a multiplicação rápida a partir de pouco material,

podendo, portanto, reduzir o impacto sobre as populações nativas (Zappi *et al.*, 2011). Para tanto, o estabelecimento *in vitro* das culturas assépticas é um passo fundamental para a propagação massal das plantas e a utilização de sementes como material inicial das culturas, além de apresentar menores taxas de contaminação que explantes (Mercier e Kerbauy, 1994; Medeiros *et al.*, 2006; Chávez *et al.*, 2006), introduz a variabilidade genética, fator importante quando se utiliza essa técnica para fins de conservação (Mercier e Nievola, 2003).

A criopreservação tem sido considerada a maneira mais promissora de conservação em longo prazo para células, tecidos e órgãos vegetais, pois a técnica é capaz de interromper todo o metabolismo celular e pode ser uma alternativa para manutenção da integridade genética dos recursos fitogenéticos (Carvalho e Vidal, 2003). Além da manutenção da integridade genética, o pequeno espaço necessário para a instalação do banco de germoplasma, bem como o baixo custo associado ao armazenamento dos materiais biológicos e a proteção contra a contaminação, têm sido vantagens frequentemente associadas à técnica criogênica (Almeida *et al.*, 2002; Engelmann, 2011). A conservação de sementes é a forma mais fácil, comum e eficiente de conservação *ex situ*, pois garante a variabilidade genética, são fáceis de coletar e ocupam um pequeno espaço (Santos, 2001; Li e Pritchard, 2009; Goldfarb *et al.*, 2010; Pence, 2010). Além disso, o tamanho reduzido das sementes possibilita um congelamento mais eficiente, uma vez que a desidratação e o congelamento ocorrem de forma mais rápida e uniforme em estruturas menores (Carvalho e Vidal, 2003). Essa técnica tem sido muito aplicada em bancos de germoplasma, em espécies de propagação vegetativa, com sementes recalcitrantes ou ameaçadas de extinção (Engelmann, 2011).

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para quebra de dormência de sementes de *M. azureus* e avaliar a qualidade fisiológica de sementes de *P. pachycladus* armazenadas por 360 dias no nitrogênio líquido (-196°C).

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Foram coletados frutos maduros de *M. azureus* e *P. pachycladus* em Itaguaçu da Bahia e Morro do Chapéu – BA, respectivamente. Após a coleta, as sementes foram beneficiadas e armazenadas em sacos de papel até a realização do experimento.

Teste de tetrazólio para análise da viabilidade de sementes

O teste de tetrazólio para análise da viabilidade de sementes de *M. azureus* foi realizado segundo Veiga-Barbosa *et al.* (2010). Dez sementes tiveram o seu opérculo removido com o auxílio de um bisturi e, em seguida, foram submetidas à embebição em água por 24h. Posteriormente, as sementes foram imersas em solução de 2,3,5 trifênil cloreto de tetrazólio a 0,6% por 24h, a temperatura ambiente. No dia seguinte, as sementes tiveram suas testas rompidas com o auxílio de um bisturi para análise da coloração do embrião a olho nu. Foram consideradas viáveis as sementes cujo embrião apresentou coloração avermelhada e rosada.

Superação de dormência de sementes de *M. azureus*

Para avaliar o método mais adequado para potencializar a germinação de *M. azureus* sementes da espécie foram submetidas a oito tratamentos: controle (sem pré-tratamento), embebição em água e em giberelina (GA_3) a 500 mg L⁻¹ e 1.000 mg L⁻¹, durante 2 horas ou 24 horas, e imersão em ácido sulfúrico H₂SO₄, por 5 minutos.

Criopreservação de *P. pachycladus*

Antes do congelamento das sementes em nitrogênio líquido (-196°C) foi realizado o teste de teor de umidade de acordo com método da estufa a 105°C (Brasil, 2009) para sementes de *P. pachycladus*. Em seguida, lotes de 100 sementes foram armazenadas em criotubos e imergidas diretamente no nitrogênio líquido, sem a utilização de crioprotetores. As sementes ficaram armazenadas por 1, 7, 30, 90, 180 e 360 dias, exceto o controle, que não foi submetido ao congelamento. Após o período de armazenamento, as sementes foram descongeladas por uma hora em temperatura ambiente e inoculadas.

Meio nutritivo, desinfestação de sementes e inoculação

Após o pré-tratamento para superação de dormência para sementes de *M. azureus* ou o término do período de armazenamento estabelecido para *P. pachycladus*, as sementes foram desinfestadas quimicamente por 1 minuto em álcool absoluto e 15 minutos em hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) e, em seguida, foram lavadas três vezes em água estéril. Posteriormente, as sementes foram inoculadas em frascos de vidro de 250 mL, contendo 50 mL de meio Murashigue e Skoog (1962), com metade das concentrações salinas (MS/2) suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 6,5 g L⁻¹ de ágar, teve o pH aferido para 5,6 - 5,8 e foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C.

Condições de cultura

Os tratamentos foram mantidos em câmaras de germinação, sob irradiância de 60 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas, à temperatura de 25 ± 2°C.

Variáveis analisadas, delineamento e análise estatística

Foram consideradas germinadas as sementes que originaram plântulas com radícula de comprimento igual ou maior que um milímetro (Brasil, 2009). As variáveis analisadas foram germinabilidade (G%), tempo médio de germinação (Tm), índice de velocidade de germinação (IVG) e o coeficiente de uniformidade de germinação (CUG) (Santana e Ranal, 2000). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento de 25 sementes cada. Em todos os tratamentos foi realizada a análise de variância e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR 5.1 (Ferreira, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Superação da dormência de sementes de *M. azureus*

Estudos prévios visando o estabelecimento *in vitro* de *M. azureus* revelou uma baixa germinabilidade de suas sementes (dados não apresentados). A baixa germinabilidade pode indicar sementes inviáveis ou dormentes (Ferreira *et al.*, 2004) e o teste de tetrazólio pode ser uma alternativa para compreensão do estado fisiológico do embrião. Desta forma, o teste de tetrazólio revelou que 50% dos embriões apresentaram coloração vermelha ou rosada e 50% não foram corados, ou seja, pelo menos metade das sementes de *M. azureus* apresentou-se viáveis. Estes resultados, em conjunto com a baixa germinabilidade constatada em estudos anteriores, sugerem que sementes de *M. azureus* devem apresentar algum tipo de dormência.

A germinação *in vitro* de *M. azureus* se estendeu do 3º ao 24º dia e ocorreu de forma dispersa ao longo do tempo. De acordo com a **Tabela 1**, a germinabilidade apresentou diferenças significativas entre os tratamentos analisados.

TABELA 1. Germinabilidade (%G), tempo médio de germinação (TMG), índice de velocidade de germinação (IVG) e coeficiente de uniformidade de germinação (CUG) de sementes de *Melocactus azureus* Buining & Brederoo (Cactaceae) submetidas a diferentes tratamentos de superação de dormência.

Tratamento	G(%)	TMG	IVG	CUG
Controle	3 b	4.25 a	0.13 a	0.01 a
Embebição em água (2h)	14 ab	12.79 a	0.39 a	1.01 a
Embebição em água (24h)	15 ab	11.31 a	0.45 a	0.05 a
GA_3 500 mg L ⁻¹ (2h)	5 b	13.25 a	0.11 a	0.02 a
GA_3 500 mg L ⁻¹ (24h)	8ab	10.75 a	0.33 a	0.01 a
GA_3 1000 mg L ⁻¹ (2h)	20 a	10.75 a	0.66 a	0.02 a
GA_3 1000 mg L ⁻¹ (24h)	6 b	4.25 a	0.27 a	1.12 a
Ácido sulfúrico (5 min)	3 b	6.50 a	0.09 a	0.01 a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p > 0,05).

A giberelina a 1000 mg L⁻¹ por duas horas aumentou significativamente a germinação de 3% (controle) para 20%. Este resultado pode indicar que a dormência é do tipo fisiológica (Kerbaui, 2004), estando relacionada a fatores endógenos ou hormonais, pois a giberelina atua de forma intracelular. Trabalhos realizados com representantes da mesma família obtiveram resultados similares, onde a pré-embebição por duas horas em ácido giberélico na maior concentração, 1000 mg L⁻¹, aumentou a germinabilidade de sementes de *Discocactus zehntneri* Britton & Rose subsp. *zehntneri* de 7 para 24%. (Marchi *et al.*, 2013) e *Opuntia tomentosa* Salm-Dyck (Olvera-Carillo *et al.*, 2003). Contudo, para *Mammillaria hamata* Lehmann ex Pfeiff., *Mammillaria sphaelata* Mart. (Carbajal *et al.*, 2008), *Mammillaria pectinifera* F.A.C. Weber (Navarro e Deméneghi, 2007), *Ferocactus robustus* (Pfeiff.) Britton & Rose (Navarro e González, 2007), *Cylindropuntia leptocaulis* F.M. Knuth, *Opuntia rastrera* F.A.C. Weber, *Opuntia macrocentra* Engelm. (Rojas-Aréchiga *et al.*, 2011) e *Echinopsis terscheckii* (Britton & Rose) H. Friedrich &

G.D. Rowley (Ortega-Baes e Rojas-Aréchiga, 2007) tratamentos com ácidos giberélico e/ou sulfúrico não afetaram a germinabilidade das espécies. Tratamentos envolvendo diferentes concentrações de putrescina, regulador cujo modo de ação é similar ao GA₃, também não potencializaram a germinação de *Turbinicarpus lophophoroides* (Werderm.) Buxb. & Backeb. e *Turbinicarpus pseudopectinatus* (Backeb.) Glass & R.C. Foster (Flores et al., 2008).

No entanto, o melhor resultado para potencializar a germinação da espécie não diferiu significativamente dos tratamentos com giberelina com 500 mg L⁻¹ (por 24 horas) e embebição de água por 2 e 24 horas. Isso demonstra que o aumento do tempo de exposição a uma concentração menor do regulador parece ter um efeito fisiológico similar a concentrações mais elevadas com o tempo reduzido. A concentração de 1000 mg L⁻¹ por 24h reduziu significativamente a germinação, sugerindo que concentrações mais elevadas por um tempo superior a 2h podem ter efeito tóxico para a espécie, apesar de concentrações de giberelina utilizadas na germinação de cactos poder variar de 10 a 2000 mg L⁻¹ (Reis et al., 2012; Rojas-Aréchiga e Vázquez-Yanes, 2000). Além disso, a simples embebição em água pode ser suficiente para potencializar a germinação da espécie, provavelmente por causa efeito físico da lixiviação que pode vir a retirar inibidores solúveis de crescimento presentes na testa das sementes, se esse for o caso (Ferreira et al., 2004).

Além do tratamento de 1000 mg L⁻¹ por 24h, o tratamento com ácido sulfúrico apresentou resultados similares ao controle, demonstrando que *M. azureus* não apresenta dormência causada por impermeabilidade do tegumento ou que o tempo de exposição ao ácido pode ter sido prejudicial.

Quanto às outras variáveis analisadas não foram observadas diferenças significativas. O tempo médio variou de 4,25 dias para 13,25 dias, o IVG de 0,09 a 0,66, e o CUG de 0,01 e a 1,12 (Tabela 1).

Os resultados são apenas sugestivos e os tratamentos relacionados à superação de dormência podem variar entre luminosos, térmicos e químicos e as causas das dormências não são mutuamente exclusivas (Ferreira et al., 2004).

Criopreservação de *P. pachycladus*

Muitas espécies selvagens de cactáceas possuem elevado conteúdo de lipídeos e apresentam uma testa fina, com a presença de grânulos de amido que, mantidas sob condições ideais de armazenamento, favorece o processo de germinação (Nobel, 2002). Os principais fatores responsáveis, no nível celular, pela redução na viabilidade das sementes são o aumento na peroxidação de lipídeos, a deterioração das membranas, o aumento de radicais livres e a redução da atividade de enzimas específicas (Graham, 2008). Quando as condições ambientais são inadequadas e o teor de água de equilíbrio das sementes se eleva a determinados níveis que passam a ser impróprios para a conservação desse material, inicia-se, nessas condições, a perda acentuada da qualidade fisiológica (Goldfarb et al., 2008).

As sementes de *P. pachycladus* apresentaram baixo teor de umidade (12,7%), o que as caracteriza como sementes ortodoxas, isto é, sementes que toleram a desidratação e o

armazenamento a temperaturas abaixo de 0°C (Roberts, 1973). Abud et al. (2010) encontraram valor semelhante para o teor de umidade em *P. pachycladus* (10,3%) e Marchi et al. (2013), analisando o teor de umidade de sementes de *D. zehntneri*, *Stephanocereus luetzelburgii* (Vaupel) N.P. Taylor & Egli e *P. gounellei* subsp. *gounellei*, outras espécies de cactos nativas da Bahia, também constatou o baixo teor de umidade para essas espécies. As sementes de muitos cactos são predominantemente ortodoxas, mantendo altas taxas de germinação após longos períodos de armazenamento (Flores et al., 2008).

De acordo com Cunha (1996), o teor de água da semente é, provavelmente, o fator mais crítico para o sucesso da criopreservação. Quando a semente possui um elevado teor de umidade pode ocorrer a formação de cristais de gelo intracelular durante o congelamento podendo causar a ruptura do sistema de endomembranas e resultar na perda da semipermeabilidade e da compartimentalização celular (Kaviani et al., 2009). Desta forma, o baixo teor de umidade nas sementes de *P. pachycladus* torna viável a aplicação da técnica de criopreservação de maneira simples e a baixo custo, visto que não há necessidade da utilização de crioprotetores.

Na Tabela 2 é possível observar os resultados da criopreservação de sementes de *P. pachycladus* por até 360 dias. Não houve diferenças significativas para nenhuma das variáveis analisadas. A germinabilidade (G%) variou de 21 a 36%, o tempo médio (TMG) de 8,7 a 12,8 dias, o índice de velocidade de germinação de 0,8050 a 1,0800 e o coeficiente de uniformidade de germinação de 0,0425 a 0,1875.

TABELA 2. Germinabilidade (%G), tempo médio de germinação (TMG), índice de velocidade de germinação (IVG) e coeficiente de uniformidade de germinação (CUG) de sementes de *Pilosocereus pachycladus* F. Ritter (Cactaceae) submetidas à criopreservação.

Período de armazenamento (dias)	G(%)	TMG	IVG	CUG
0	30 a	9,3 a	0,8575 a	0,0750 a
1	34 a	8,7 a	1,0800 a	0,1875 a
7	36 a	11,0 a	1,0150 a	0,1875 a
30	21 a	9,5 a	0,9966 a	0,0666 a
60	35 a	11,5 a	0,9250 a	0,0575 a
180	33 a	12,8 a	0,8050 a	0,0425 a
360	34 a	10,0 a	0,9525 a	0,1175 a

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

Esses resultados demonstram que tanto a qualidade fisiológica quanto a cinética da germinação mantiveram um comportamento estável ao longo do tempo. A criopreservação de sementes de diferentes espécies de cactos nativas do Nordeste brasileiro (*P. gounellei* subsp. *gounellei*, *Cereus jamacaru* DC. subsp. *jamacaru*, *Melocactus concinnus* Buining & Brederoo, *Melocactus paucispinus* Heimeb & R.J. Paul e *Micranthocereus flaviflorus* Buining & Brederoo) por 120 dias também não alterou a qualidade fisiológica das sementes após a exposição ao

nitrogênio líquido (Veiga-Barbosa *et al.*, 2010). Isso corrobora a utilização da técnica de criopreservação como uma alternativa de conservação *ex situ* para espécies da família Cactaceae. De acordo com Goldfarb *et al.* (2008), na maioria dos bancos, as sementes são mantidas a uma temperatura de 10°C e umidade relativa do ar de 40%. No entanto, esse tipo de banco de germoplasma não evita a erosão genética das espécies e é recomendada a utilização de bancos criogênicos para a conservação das espécies vegetais (Gonzaga *et al.*, 2003).

A sobrevivência e a regeneração de material criopreservado dependem de numerosos fatores tais como tamanho e estágio de desenvolvimento do material, desidratação, congelamento, descongelamento e regeneração (Santos, 2002). Geralmente, as sementes possuem vantagem em relação à sobrevivência e regeneração quando criopreservadas, pois estruturas de tamanho reduzido são mais apropriadas para o congelamento, uma vez que a desidratação e congelamento ocorrem de forma mais rápida e uniforme em estruturas menores, além de ser um material jovem, em estágio meristemático, que apresentam células pequenas e citoplasma denso com poucos vacúolos, o que significa que contém pouca água (Santos, 2002; Engelmann, 1991).

O processo de regeneração ideal é aquele que propicia a recuperação da maior quantidade de células vivas e que induz a formação de uma nova planta e a única evidência inquestionável da viabilidade do material submetido ao congelamento em nitrogênio líquido é a retomada do crescimento e a regeneração de um novo indivíduo (Santos, 2002). Após a germinação, as sementes de *P. pachycladus* apresentaram crescimento e desenvolvimento normais, o que demonstra que, além de não interferir na qualidade fisiológica das sementes, a criopreservação não causou danos morfológicos nas plantas recém-formadas.

CONCLUSÕES

A baixa germinabilidade de sementes de *M. azureus* pode estar associada à dormência fisiológica e pode ser superada pela utilização de ácido giberélico a 1000 mg L⁻¹ por duas horas. As sementes de *P. pachycladus* possuem baixo teor de umidade, sendo consideradas ortodoxas, e podem ser criopreservadas por até 360 dias sem comprometer sua qualidade fisiológica e sem a presença de crioprotetores. Desta forma, a criopreservação pode ser um eficiente método indicado para a conservação *ex situ* e, quando associada às técnicas de cultura de tecidos, possibilitarão a conservação e multiplicação de espécies nativas, ameaçadas e com potencial ornamental.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsas de estudos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abud HF, Pereira DS, Gonçalves NR, Reis RGE, Pereira DS e Bezerra AME. 2010. Germinação e expressão morfológica de frutos, sementes e plântulas de *Pilosocereus pachycladus* Ritter, **Revista Ciência Agrônoma**, 41(3): 468-474.
- Abud HF, Pereira DS, Gonçalves NR, Pereira MS e Bezerra AME. 2012. Armazenamento de sementes de xique-xique. **Revista Brasileira de Sementes**, 34(3): 473-479.
- Almeida FAC. 2002. Crioconservação das sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 6(2): 295-302.
- Anderson EF. 2001. **The Cactus Family**. Portland: Timber Press, 776p.
- Barroso GM et al. 2002. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**, vol. 1. 2ª ed. Editora UFV, Viçosa, 309p.
- Brasil – Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. 2009. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária, 365p.
- Carbajal MCN, Olvera GC e Castellanos JOL. 2008. Efecto de la escarificación de semillas en la germinación de dos especies de *Mammillaria*. **Zonas Áridas**, 12(1): 97-105.
- Carvalho JMFC e Vidal MS. 2003. **Crioconservação no Melhoramento Vegetal**. Campina Grande: Embrapa, 22p.
- Chávez LC et al. 2006. La germinación *in vitro* una alternativa para obtener explantes en cactáceas. **Zonas Áridas**, 10(1): 129-133.
- CITES. 2015. Apêndice 2. [on line]. Disponível em: <<http://www.cites.org/eng/app/appendices.php>>. Acessado em 20 de janeiro 2015.
- Correia D, Nascimento EHS, Araújo JDM, Anselmo GC e Coelho PJA. 2011. Germinação de sementes Cactáceas *in vitro*. **Comunicado técnico 181 – Embrapa**. Fortaleza: Embrapa.
- Cunha R. 1996. Métodos alternativos para conservação de germoplasma-semente. In: Puignau JP (Ed.). **Conservación de germoplasma vegetal**. Montevideo: IICA, p. 123-128. (IICA- PROCISUR. Dialogo, 45).
- Engelmann F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm- a review. **Euphytica**, 57(3): 227-243.
- Engelmann F. 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, 47(1): 5-16.
- Ferreira AG e Borghetti F. 2004. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 323 p.
- Ferreira DF. 2008. Sisvar: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Científica Symposium**, 6(2): 36-41.
- Flores J, Jurado E e Jiménez-Bremont JF. 2008. Breaking seed dormancy in specially protected *Turbincarpus lophophoroides* and *Turbincarpus pseudopectinatus* (Cactaceae). **Plant Species Biology**, 23(1): 43-46.
- Goldfarb M, Duarte MEM e Mata MERM. 2010. Armazenamento criogênico de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) Euphorbiaceae. **Biotemas**, 23(1): 27-33.
- Goldfarb M, Martins MED, Mata MERM, Pimentel LW e Severino LS. 2008. Teor de água limite para crioconservação das sementes de pinhão manso

- (*Jatropha curcas* L.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, 10(2): 121-129.
- Gonzaga TWC, Cavalcanti Mata MERM, Silva H e Duarte MEM. 2003. Crioconservação de sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* Engl.) e barafina (*Schinopsis brasiliensis* Engl.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, 5(2): 145-154.
- Graham IA. 2008. Seed storage oil mobilization. **Annual Review of Plant Biology**, 59(1): 115-142.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF e Donoghue MJ. 2009. **Sistemática Vegetal: Um enfoque filogenético**. 3ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 612p.
- Kaviani B, Safari-Motlagh MR, Padasht-Dehkaei MN, Darabi AH e Rafizadeh A. 2009. Cryopreservation of seeds of lily [*Lilium ledebourii* (Baker) Bioss]: use of sucrose and dehydration. **African Journal of Biotechnology**, 8(16): 3809-3810.
- Kerbaux GB. 2004. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 452 p.
- Leal IR, Tabarelli M e Silva JMC. 2003. **Ecologia e conservação da Caatinga**. Recife: Editora Universitária da UFPE, 822 p.
- Li D e Pritchard HW. 2009. The science and economics of ex situ plant conservation. **Trends in Plant Science**, 14(11): 614-621.
- Lone AB, Takahashi LSA, Faria RT, Unemoto LK. 2007. Germinação de *Melocactus bahiensis* (cactaceae) em diferentes substratos e temperaturas. **Scientia Agraria**, 8(4): 365-369.
- Lüthy JM e Lüthy J. 2001. **The Cacti of CITES**. Appendix I. Switzerland: Bundesamt für Veterinärwesen, p. 47.
- Marchi MNG, Civatti LM, Viana CM, Assis JGA, Bellintani MC, Santana JRF. 2013. Seed cryopreservation of the native cacti *Discocactus zehntneri*, *Pilosocereus gounellei* and *Stephanocereus luetzelburgii* from Bahia, Brazil. **African Journal of Biotechnology**, 12(21): 3250-3254.
- Marcos-Filho J. 2005. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 495p.
- Medeiros LA et al. 2006. *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 84(2): 165-169.
- Mercier H, Kerbaux GB. 1994. *In vitro* culture of *Vriesea hieroglyphica*, an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic Forest. **Journal Bromeliad Society**, 44(3): 120-124.
- Mercier H e Nievola CC. 2003. Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. **Vidalia**, 1(1): 57-62.
- Murashige T e Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, 15(1): 473-497.
- Navarro MC e Deméneghi AP. 2007. Germinación de semillas y efecto de las hormonas en el crecimiento de *Mammillaria pectinifera*. **Zonas Áridas**, 11(1): 233-239.
- Navarro MC e González EM. 2007. Efecto de la escarificación de semillas en la germinación y crecimiento de *Ferocactus robustus* (Pfeiff.) Britton & Rose (Cactaceae). **Zonas áridas**, 11(1): 195-205.
- Nobel PS. 2002. **Cacti: biology and uses**. California: University of California Press, 304 p.
- Olvera-Carrillo Y et al. 2003. Germination of the hard seed coated *Opuntia tomentosa* S.D., a cacti from the México valley. **Journal of Arid Environments**, 55(1): 29-42.
- Ortega-Baes P e Rojas-Aréchiga M. 2007. Seed germination of *Trichocereus terscheckii* (Cactaceae): light, temperature and gibberellic acid effects. **Journal of Arid Environments**, 69(1): 169-176.
- Pence VC. 2010. The possibilities and challenges of in vitro methods for plant conservation. **Key Bulletin**, 65(4): 539-547.
- Reis MV et al. 2012. Germinação in vitro e desenvolvimento pós-seminal de plântulas de *Pilosocereus aurisetus* (Werderm.) Byles & G.D. Rowley (Cactaceae) **Revista Ceres**, 59(6): 739-744.
- Roberts EH. 1973. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, 1: 499-514.
- Rocha MS et al. 2009. Crioconservação de sementes de algodão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 13(3): 312-318.
- Rojas-Aréchiga e Vázquez-Yanes. 2000. Cactus seed germination: a review. **Journal of Arid Environments**, 44(1): 85-104.
- Rojas-Aréchiga M et al. 2011. Effect of gibberellic acid on germination of seeds of five species of cacti from the Chihuahuan Desert, Northern Mexico. **The Southwestern Naturalist**, 56(3): 393-435.
- Salomão AN. 2002. Tropical seed species' responses to liquid nitrogen exposure. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 14(2): 133-138.
- Santana DG e Ranal MA. 2000. Análise estatística na germinação. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 12(4): 205-237.
- Santos IRI. 2001. Crioconservação do germoplasma vegetal. **Biociência & Desenvolvimento**, 20(1): 60-65.
- Santos IRI. 2002. Crioconservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 12(Edição Especial): 70-84.
- Taylor NP e Zappi D. 2004. **Cacti: of Eastern Brazil**. Kew: Royal Botanic Gardens, 499 p.
- Taylor NP, Machado M, Zappi D e Braun P. 2013. *Melocactus azureus*. **Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN**. Versão 2014.3, IUCN. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Página visitada em 23 de janeiro de 2015.
- Veiga-Barbosa L, González-Benito ME, Assis JGA e Pérez-García AF. 2010. Germination and cryopreservation of several cactus species from NE Brazil. **Seed Science and Technology**, 38(1): 218-224.
- Zappi D et al. 2011. **Plano de ação nacional para conservação das Cactáceas**. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 113 p.