

MICROPROPAGAÇÃO E ENDORREDUPLICAÇÃO EM PITAYA VERMELHA, *Hylocereus undatus* HAW

MICROPROPAGATION AND ENDOREDUPLICATION IN RED PITAYA, *Hylocereus undatus* HAW

Thatiane Padilha de MENEZES¹; Wiara de Assis GOMES²; Leila Aparecida Salles PIO³; Moacir PASQUAL⁴, José Darlan RAMOS⁵

1. Doutoranda em Agronomia/Fitotecnia pela Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, MG, Brasil. thatiagro@yahoo.com.br; 2. Doutoranda em Agronomia/Fitotecnia – UFLA, Lavras, MG, Brasil; 3. Doutora em Agronomia/Fitotecnia – UFLA, Lavras, MG, Brasil; 4. Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, Professor Titular – UFLA, Lavras, MG, Brasil; 5. Doutor em Agronomia/Fitotecnia, Professor Permanente – UFLA, Lavras, MG, Brasil

RESUMO: A micropropagação facilita a obtenção de mudas de pitaya, *Hylocereus undatus* Haw; porém, pode propiciar alterações genéticas, como a polissomatia, endopoliploidia ou endorreduplicação. Neste trabalho, objetivou-se desenvolver protocolo para micropropagação e verificar a endorreduplicação em pitaya vermelha. Cladódios de pitaya foram micropropagados em meio de cultura MS, com 0,1 mg L⁻¹ de ANA, acrescido de BAP e cinetina, nas dosagens 0, 1, 5 e 10 mg L⁻¹, sendo o meio MS sem reguladores de crescimento utilizado como tratamento controle. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em fatorial 2x8 (ausência e presença de luz e 8 diferentes meios de cultura), totalizando 16 tratamentos, sendo 4 repetições de 3 explantes. O experimento foi conduzido na presença e ausência de luz em sala de crescimento a 25 ± 2°C, irradiância média de 42 W m⁻² e fotoperíodo de 16 horas, por 120 dias. A análise de citometria de fluxo foi utilizada em 3 explantes por tratamento. Amostras de cladódios, juntamente com o padrão interno (ervilha) foram triturados com 1 mL de tampão de extração LB01 e 25 mL de iodeto de propídeo, analisados em citômetro de fluxo. Os explantes submetidos à ausência de luz não responderam aos tratamentos. O meio de cultura que proporciona melhor crescimento e desenvolvimento *in vitro* é o MS acrescido de 0,1 mg L⁻¹ de ANA e BAP ou cinetina nas concentrações de 1 ou 5 mg L⁻¹. O meio de cultura que proporciona aos explantes maior variação na quantidade de DNA é MS com 10 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de ANA. O fenômeno da endorreduplicação é observado em todos os tratamentos analisados.

PALAVRAS - CHAVE: *Hylocereus undatus* Haw. Citometria de fluxo. Fitohormônios.

INTRODUÇÃO

O cultivo da pitaya, no Brasil, concentra-se no Estado de São Paulo, onde existe o maior consumo de frutas exóticas (BASTOS et al., 2006). A cultura também possui grande potencial econômico para regiões semi-áridas por suportar secas prolongadas (MOHAMED-YASSEEN, 2002).

A propagação de pitaya é comumente realizada através de sementes ou estaquia. Essas técnicas possuem muitas desvantagens para uma produção comercial, como por exemplo, as plantas propagadas por sementes possuem longo período juvenil e existe grande risco de proliferação de pragas e doenças na propagação por estaquia. A cultura de tecidos possibilita obtenção de plantas sadias e produção de mudas em larga escala, a partir de pequena quantidade de material propagativo. Dentre os poucos trabalhos com a cultura da pitaya *in vitro*, pode-se citar Mohamed-Yasseen (2002), que relata um método de multiplicação utilizando tidiazuron (TDZ) e ácido naftalenoacético (ANA) e usando como explantes brotos novos de pitaya provenientes de plantas maduras.

Em algumas culturas, a micropropagação pode proporcionar alterações genéticas nos explantes, como por exemplo, polissomatia e endopoliploidia ou endorreduplicação.

Durante o desenvolvimento de algumas plantas o ciclo celular normal pode ser substituído por um ciclo celular alterado, onde não ocorre a mitose (CHEVALIER et al., 2011). Este ciclo modificado chamado de ciclo de endorreduplicação ou endociclo consiste em um ou vários ciclos de síntese de DNA na ausência de mitose, e participa do controle do processo de expansão celular, contribuindo assim para o crescimento de órgãos vegetais e pode ocorrer em mais de 90% das angiospermas (SLIWINSKA; LUKASZEWSKA, 2005). Este fenômeno pode acontecer em várias células da planta, especialmente aquelas submetidas ao envelhecimento ou diferenciação (SABELLI; LARKINS, 2009). O motivo que provoca a saída do ciclo celular clássico para o início do ciclo de endorreduplicação, ainda é pouco compreendido. Daí o estudo do papel funcional de endorreduplicação durante o desenvolvimento de

plantas tornou-se um campo de estudos de grande interesse (CHEVALIER et al., 2011).

A endorreduplicação pode contribuir para a adaptação a fatores ambientais adversos, permitindo a manutenção do crescimento sob condições de estresse, atuando como um mecanismo para gerar quantidade suficiente de DNA, prevendo um futuro aumento na massa do tecido. O aumento no conteúdo de DNA nuclear pode fornecer um meio de proteger o DNA genômico de condições prejudiciais, tais como danos provocados por irradiação UV (YAMASAKI et al., 2010), ou prevenir a segregação cromossômica desigual durante a mitose, contribuindo para adaptação da planta à alta concentração de sais (CECCARELLI et al., 2006), ao déficit hídrico (COOKSON et al., 2006) e à baixas temperaturas (BAROW, 2006).

O conteúdo de DNA nuclear de plantas pode ser estimado pela técnica de citometria de fluxo que é um método eficiente, rápido e confiável. A citometria de fluxo é um processo no qual características físicas e/ou químicas de uma única partícula podem ser medidas. Nesta técnica, as medidas são feitas enquanto inúmeras partículas em suspensão passam individualmente através de um foco de luz, gerando pulsos de luz refletida e fluorescência, que são coletadas e convertidas em pulsos de corrente elétrica por sensores ópticos. Esta medida em fluxo permite análises em alta velocidade (10^2 - 10^3 partículas/s), com seleção aleatória de partículas de uma população inteira sem nenhuma tendência. Desta forma, populações grandes podem ser avaliadas em um curto espaço de tempo (DOLEZEL; BARTOS 2005).

Poucos estudos existem sobre a pitaya e, logo, faz-se necessário desenvolver protocolos que viabilizem a multiplicação *in vitro*, bem como o entendimento do processo de endorreduplicação. Tal fenômeno já foi verificado em plantas tetraplóides de milho (SETTER; FLANNIGAN, 2001), tomateiro (CHEVALIER et al., 2011), de portulaca (*Portulaca grandiflora*) (MISHIBA; MII, 2000), as quais foram previamente estabelecidas *in vitro* e avaliadas por meio da técnica de citometria de fluxo. O presente estudo teve como objetivos desenvolver um protocolo para micropropagação e verificar a endorreduplicação de cladódios de pitaya vermelha durante o crescimento de plantas *in vitro*, utilizando citometria de fluxo.

MATERIAL E MÉTODOS

Estabelecimento do material em meio de cultura

Sementes de pitaya foram germinadas *in vitro* em meio de cultura MS (MURASHIGE;

SKCOOG, 1962) e após 120 dias, os cladódios (caule modificado, típico de cactáceas) foram segmentados em explantes de aproximadamente 1 cm de comprimento, e inoculados em tubos de ensaio contendo 12 mL de meio de cultura MS acrescido de 5,5 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftaleno acético); 1,0; 5,0 e 10,0 mg L⁻¹ de BAP (benzilaminopurina) e cinetina (CIN). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C e 1,0 atm por 20 minutos.

Após a inoculação em câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas, os tubos foram vedados com tampas plásticas e mantidos em sala de crescimento em ausência e presença de luz ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, irradiância média de 42 W m⁻² e fotoperíodo de 16 horas), por 120 dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em fatorial 2x8 (ausência e presença de luz e 8 meios de culturas com diferentes doses e tipos de reguladores: Meio 1= MS; Meio 2= MS + 0,1 mg L⁻¹ ANA; Meio 3= MS + 1 mg L⁻¹ BAP + 0,1 mg L⁻¹ ANA; Meio 4= MS + 5 mg L⁻¹ BAP + 0,1 mg L⁻¹ ANA; Meio 5= MS + 10 mg L⁻¹ BAP + 0,1 mg L⁻¹ ANA; Meio 6= MS + 1 mg L⁻¹ CIN + 0,1 mg L⁻¹ ANA; Meio 7= MS + 5 mg L⁻¹ CIN + 0,1 mg L⁻¹ ANA; Meio 8= MS + 10 mg L⁻¹ CIN + 0,1 mg L⁻¹ ANA, totalizando 16 tratamentos com 4 repetições e 3 explantes por parcela.

Análise fitotécnica

Após o período de incubação foram avaliados os seguintes parâmetros: número e comprimento de brotos, comprimento da maior raiz, massa fresca da planta e presença ou ausência de calo. Os dados obtidos foram transformados pela fórmula \sqrt{x} e submetidos à análise de variância com o uso do programa estatístico SISVAR.

Análise de citometria de fluxo

Após avaliação fitotécnica, amostraram-se 3 explantes (cladódios) de cada tratamento *in vitro* e de plantas mantidas no campo (testemunha) submetendo-as a análise de citometria de fluxo, para verificar a estabilidade genética, bem como observar a presença de endorreduplicação dos explantes submetidos a altas concentrações de reguladores de crescimento e influência da luz.

Os cladódios oriundos do campo são jovens, retirados de plantas adultas com 4 anos de idade. As plantas são tutoradas perpendicularmente ao solo, em mourões de eucalipto até 1,80 m. Os cladódios são sustentados por uma estrutura tipo latada, feita de bambu, acima dos mourões.

Para a determinação do conteúdo de DNA, aproximadamente 50 mg de cladódios de pitaya, juntamente com *Pisum sativum* (padrão de referência interno) (DOLEŽEL et al., 1998) foram triturados em placa de Petri contendo 1 mL de tampão LB01 gelado para a liberação dos núcleos. A suspensão de núcleos foi aspirada através de duas camadas de gaze, com auxílio de pipeta plástica e filtrada através de malha de 50 µm. Os núcleos foram corados pela adição de 25 µL de solução de 1 mg/1 mL de iodeto de propídeo, sendo adicionados, ainda, 5 µL de RNase a cada amostra. As amostras foram analisadas imediatamente após o preparo (protocolo adaptado de GALBRAITH et al., 1983). Para cada amostra, 10 mil núcleos foram analisados utilizando-se 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).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise fitotécnica

Tabela 1. Número e comprimento de brotações (cm), comprimento de raízes (cm) e biomassa fresca (g) na propagação de Pitaya vermelha (*Hylocereus undatus* Haw) cultivada sob diferentes concentrações de reguladores de crescimento. UFLA, Lavras, MG, 2011.

Tratamentos	Meio de Cultivo	Brotações		Raiz	biomassa fresca	Prese nça de calos
		Número	Comprimento (cm)	Comprimento (cm)	Brotação + raiz (g)	
1	MS	1,49 b*	1.65 a	2.39 a	0.63 b	não
2	MS + 0,1 mg L ⁻¹ ANA	1.36 b	1.87 a	2.15 a	0.91 a	não
3	MS + 1 mg L ⁻¹ BAP + 0,1 mg L ⁻¹ ANA	2.55 a	1.47 a	1.51 b	1.09 a	sim
4	MS + 5 mg L ⁻¹ BAP + 0,1 mg L ⁻¹ ANA	2.33 a	1.27 a	0.68 d	1.09 a	sim
5	MS + 10 mg L ⁻¹ BAP + 0,1 mg L ⁻¹ ANA	1.66 b	0.69 b	0.23 e	0.35 b	sim
6	MS + 1 mg L ⁻¹ CIN + 0,1 mg L ⁻¹ ANA	2.00 a	1.57 a	1.92 b	0.81 a	não
7	MS + 5 mg L ⁻¹ CIN + 0,1 mg L ⁻¹ ANA	2.39 a	1.74 a	1.93 b	0.85 a	não
8	MS + 10 mg L ⁻¹ CIN + 0,1 mg L ⁻¹ ANA	1.17 b	0.93 b	1.19 c	0.35 b	não
CV		28.24	21,99	19.93	35.98	-

Os explantes não demonstraram qualquer desenvolvimento na ausência de luz, concluindo-se que luminosidade é fator determinante na proliferação de brotos nesta espécie.

O maior número de brotações (Tabela 1), foi observado no tratamento 3 (1 mg.L⁻¹ de BAP + 0,1 mg.L⁻¹ de ANA), não diferindo, estatisticamente, dos tratamentos 4, 6 e 7 que tiveram respectivamente, além de 0,1 mg.L⁻¹ de ANA, adição de 5 mg.L⁻¹ BAP e 1 e 5 mg.L⁻¹ de cinetina. A utilização de auxinas e citocininas no estabelecimento *in vitro* de cactáceas também foi alvo de estudo de Ojeda-Zacarías et al. (2008) com a espécie *Astrophytum capricorne*. Esses autores concluíram que o uso dos reguladores favorece a formação de calos e que a associação de 6-benzilaminopurina (BAP) e cinetina favorece o desenvolvimento de brotações, superando estatisticamente o tratamento com o uso isolado de BAP. Martínez-Cárdenas et al. (2007) também observaram maior produção de brotos e de melhor qualidade em meio de cultura acrescido de 0,1 mg.L⁻¹ de ácido indol acético (AIA) juntamente com 0,1 mg.L⁻¹ de BAP. Neste trabalho, apenas os tratamentos 3, 4 e 5, ou seja, os que tiveram adição de BAP (1, 5 e 10 mg.L⁻¹), foram eficientes na formação de calos.

Os tratamentos, de modo geral, apresentaram comportamento similar no que diz respeito ao comprimento de brotações, exceto os tratamentos que tiveram adição de 10 mg.L⁻¹ de BAP ou cinetina.

* Médias seguidas pela mesma letra na vertical pertencem a um mesmo grupo, não diferindo entre si pelo teste Skott-Knott, a 5% de probabilidade.

Seemann et al. (2007) avaliaram o estabelecimento *in vitro* de onze espécies de cactáceas e concluíram que o uso de ANA e BAP foi eficiente na indução de brotações, porém menos efetivo na formação de calos e raízes. Oliveira et al. (2008) realizaram estudo visando desenvolver metodologia para multiplicação e enraizamento *in vitro* de mandacaru (*Cereus jamacaru*) e obtiveram maior número de brotações com a utilização de BAP ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) e 2-iP ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$).

Quando foi usado apenas o meio MS para o cultivo dos segmentos caulinares de pitaya obteve-se maior comprimento de raízes, igualando-se, estatisticamente, apenas ao tratamento com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA e, superando os demais. Martínez-Cárdenas et al. (2007) verificaram o enraizamento de brotações de pitayas em meio MS, independente da adição de reguladores de crescimento. Oliveira et al. (2008) obtiveram os melhores resultados para comprimento de raiz quando utilizaram o meio MS com 100% dos sais e diferentes concentrações de AIB e a maior massa radicular quando reduziu-se concentração dos sais componentes do meio MS.

Os maiores valores para peso da matéria fresca das plantas foram observados nos tratamentos 3 e 4 (BAP 1 e 5 mg.L^{-1}) não diferindo estatisticamente dos tratamentos 2, 6 e 7 ($0,1$ de

ANA e 1 e 5 mg.L^{-1} de cinetina, respectivamente, sendo superiores aos tratamentos 1, 5 e 8.

Análises de citometria de fluxo

As análises de citometria de fluxo foram realizadas para verificar a influência de doses de reguladores de crescimento na quantidade de DNA do material mantido *in vitro*, bem como na ocorrência de endorreduplicação nos tecidos. No histograma da Figura 1 foram observados três picos da amostra e um pico do padrão de referência. Este resultado comprova que cladódios de pitaya em condições *in vitro* apresentam 3 níveis de ploidia distintos, acontecendo nestes tecidos o fenômeno da endorreduplicação, que foi observado em todos os tratamentos, exceto o material submetido a condições de campo, em que não foi possível visualizar os picos no histograma.

A quantidade de DNA nuclear de uma determinada espécie só pode ser obtida por citometria de fluxo, por meio de uma comparação com núcleos pertencentes a um padrão de referência, cujo o conteúdo de DNA é previamente conhecido. A ervilha foi utilizada como padrão de referência porque não sobrepôs seu pico nos demais picos fornecidos pela amostra.

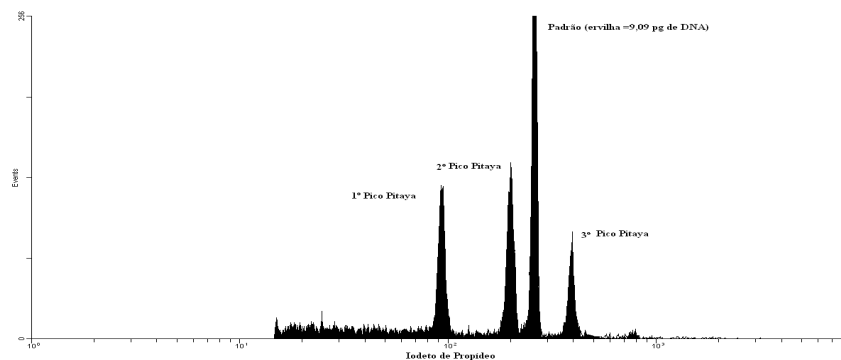


Figura 1. Histograma de citometria de fluxo de Pitaya vermelha (*Hylocereus undatus* Haw), juntamente com a ervilha (*Pisum sativum* L.) utilizada como padrão de referência. UFLA, Lavras, MG, 2011.

Na Figura 2 é possível verificar que as plantas submetidas a diferentes condições ambientais apresentaram comportamentos diferentes. As plantas de campo não apresentaram picos, o pico observado no primeiro histograma se refere ao padrão. Provavelmente isso se deve a acúmulo de metabólitos secundários presentes nas plantas sob essa condição.

Segundo Robinson (2006), a existência de metabólitos secundários pode interferir no conteúdo de DNA celular. Os materiais cultivados *in vitro*

tanto em ambiente escuro, quanto claro, não apresentaram diferenças significativas entre si (Tabela 2).

Houve diferença significativa entre os meios de cultura e a estimativa da quantidade de DNA. Todos os histogramas obtidos apresentaram 3 picos distintos e em todos eles o resultado foi semelhante: explantes mantidos em meio de cultura MS contendo 10 mg L^{-1} BAP e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ANA, apresentaram menores índices de DNA e maiores coeficientes de variação dos picos. Este foi o

tratamento mais severo, que provocou perda de DNA. O coeficiente de variação está diretamente ligado à precisão do experimento e qualidade do histograma obtido. Os explantes cultivados em meio MS contendo 5 mg L⁻¹ de CIN e 0,1 mg L⁻¹ ANA e MS com 10 mg L⁻¹ CIN e 0,1 mg L⁻¹ ANA,

apresentaram estimativas intermediárias de conteúdo de DNA. As plantas cultivadas nos demais tratamentos tiveram maiores conteúdos de DNA e coeficientes de variação com valores muito baixos, justificando que não ocorreu perda de DNA da espécie (Tabela 3).

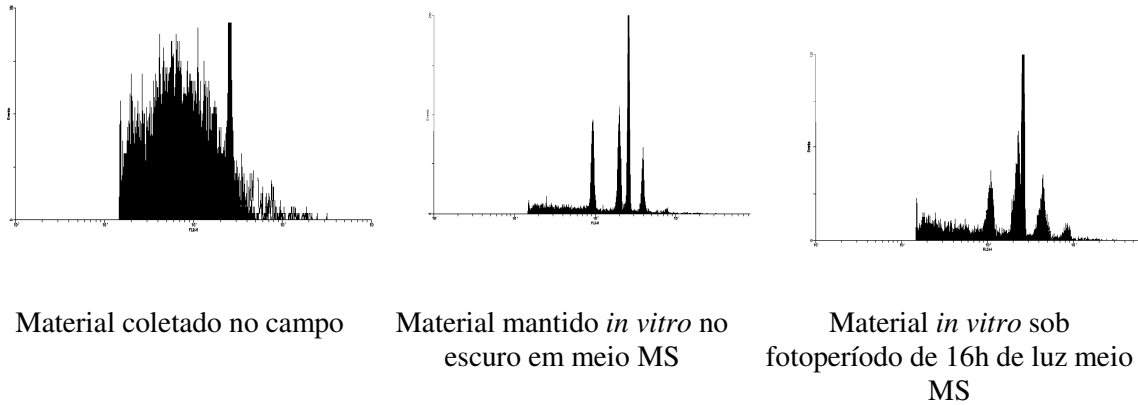


Figura 2. Histogramas de citometria de fluxo de cladódios de Pitaya vermelha (*Hylocereus undatus* Haw) submetidos a diferentes condições ambientais. UFLA, Lavras, MG, 2011.

Tabela 2. Índice de DNA (ID) e coeficiente de variação (CV) de cladódios de pitaya vermelha (*Hylocereus undatus* Haw) cultivada sob diferentes concentrações de reguladores de crescimento e analisadas em citômetro de fluxo. UFLA, Lavras, MG, 2011.

Tratamento	ID (Pico G1)	CV (Pico G1)
Campo	2.65 *ns	12.35 b
MS escuro	7.9	0.51 a
MS claro	8.9	0.99 a

*Médias seguidas pela mesma letra pertencem a um mesmo grupo, não diferindo entre si pelo teste de médias Scott-Knott, nível de 5% de probabilidade. *ns- não significativo.

Tabela 3. Índice de DNA (ID) e coeficiente de variação (CV) de cladódios de Pitaya Vermelha (*Hylocereus undatus* Haw) cultivada sob diferentes concentrações de reguladores de crescimento e analisadas em citômetro de fluxo. UFLA, Lavras-MG, 2011.

Meios de cultivo	ID (Pico 1)	ID (Pico 2)	ID (Pico 3)	CV (Pico1)	CV (Pico2)	CV (Pico3)
1)MS	3.55 a	7.42 a	14.60 a	1.31 b	1.08 b	0.83 b
2)MS + 0,1 mg L ⁻¹ ANA	3.96 a	8.22 a	16.18 a	0.73 b	0.54 b	0.50 b
3)MS + 1 mg L ⁻¹ BAP + 0,1 mg L ⁻¹ ANA	3.76 a	7.88 a	14.96 a	0.81 b	0.70 b	0.50 b
4)MS + 5 mg L ⁻¹ BAP + 0,1 mg L ⁻¹ ANA	3.86 a	8.06 a	15.56 a	0.59 b	0.47 b	0.40 b
5)MS + 10 mg L ⁻¹ BAP + 0,1 mg L ⁻¹ ANA	2.62 c	5.63 c	11.39 c	2.30 a	2.21 a	1.64 a
6)MS + 1 mg L ⁻¹ CIN + 0,1 mg L ⁻¹ ANA	3.96 a	8.24 a	16.21 a	0.97 b	0.92 b	0.66 b
7)MS + 5 mg L ⁻¹ CIN + 0,1 mg L ⁻¹ ANA	3.29 b	6.93 b	13.36 b	1.45 b	1.28 b	1.13 a
8)MS + 10 mg L ⁻¹ CIN + 0,1 mg L ⁻¹ ANA	3.31 b	6.89 b	13.59 b	2.35 a	1.89 a	1.52 a
CV	8.43	7.97	7.15	28.70	32.98	31.91

Médias seguidas pela mesma letra na vertical pertencem a um mesmo grupo e não diferem entre si pelo teste de médias Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Em todos os histogramas foi possível observar que os três picos apresentam valores que são múltiplos entre si (Tabela 3), comprovando assim que está acontecendo endorreducação, o que leva a crer que as ploidias sejam 2C no primeiro pico, 4C, no segundo e 8C no terceiro, porém para confirmação, testes citogenéticos deverão ser realizados. Na Figura 3 estão os histogramas dos tratamentos analisados e em todos eles apresentam três picos da pitaya e um pico do padrão de referência interno (representado pelo pico mais

alto), que foi usado para calcular os índices de DNA.

Os tratamentos 5 e 8 (meios de cultura com 10 mg L⁻¹ de BAP) apresentaram histogramas de pior qualidade, representados pelos coeficientes de variação mais altos, demonstrando assim, que doses muito altas deste regulador de crescimento além de provocar alterações na quantidade de DNA, apresentaram também efeito na qualidade do histograma. No entanto, todos os tratamentos apresentaram o mesmo nível de endopoliploidia, independentemente da aplicação de fitohormônios.

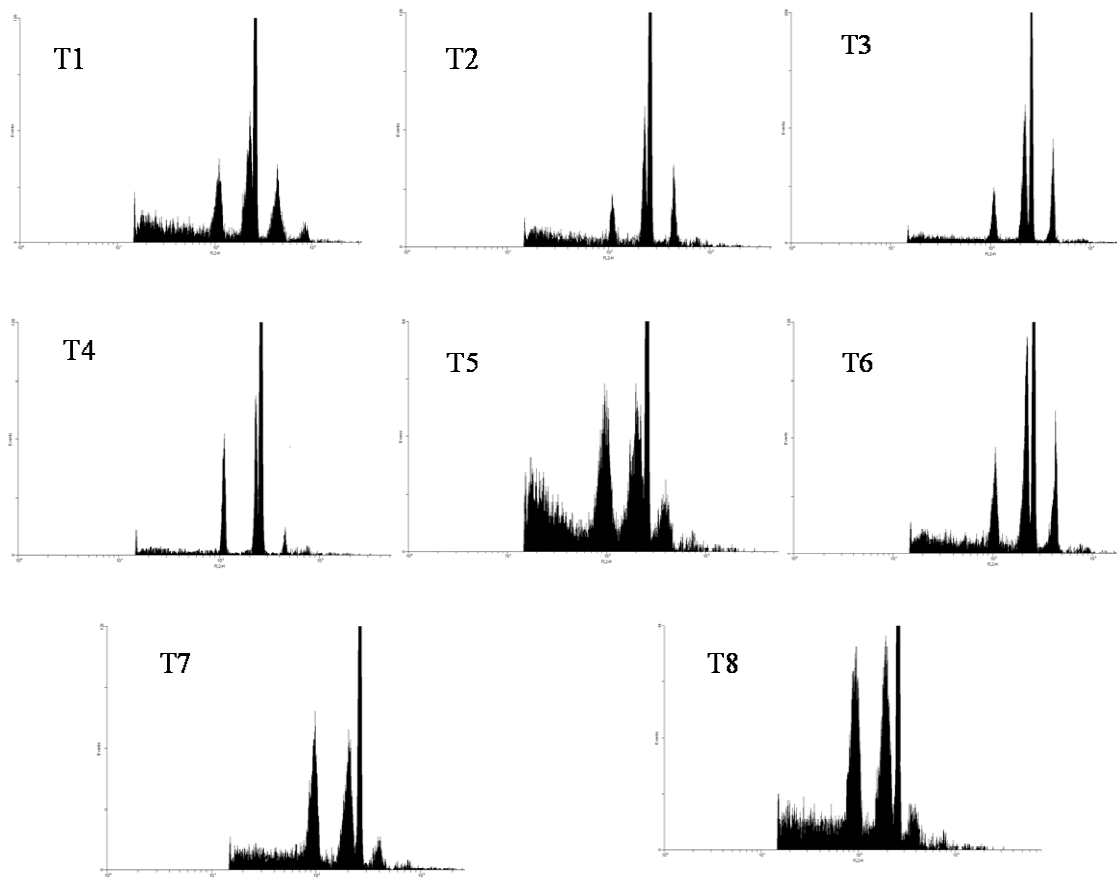


Figura 3. Histograma de citometria de fluxo de pitaya vermelha (*Hylocereus undatus* Haw) submetidos a diferentes meios de cultura. UFLA, Lavras, MG, 2011.

Para Chevalier et al. (2011) o processo de endorreducação provavelmente foi selecionado durante a evolução para o benefício de plantas e desenvolvimento dos órgãos. De acordo com as diferentes situações encontradas em diversas espécies, em relação à planta, órgão ou fisiologia celular, vários papéis funcionais foram relatados para tentar explicar a relevância da endorreducação.

A endorreducação muitas vezes ocorre durante a diferenciação de células que são altamente especializadas em sua morfologia, como é o caso do cladódio, que é uma modificação caulinar, típica de cactáceas, em que o caule modificado armazena grande quantidade de água internamente. A influência da endorreducação na diferenciação de células metabolicamente especializadas também foi relatada em endosperma de grãos de milho que

acumulam grandes quantidades de amido e proteínas de armazenamento (SABELLI; LARKINS, 2009), durante a formação de nódulos fixadores de nitrogênio em raízes de leguminosas como resposta à interação com a bactéria simbiótica *Sinorhizobium meliloti* e, também, nas células que hospedam o fungo simbiótico *Rizobium* (VINARDELL et al., 2003; GONZÁLEZ-SAMA et al., 2006).

Em *Arabidopsis*, a influência da endorreduplicação foi observada em tricomas unicelulares de folhas (LARKIN et al., 2007).

Há evidências em milho (*Zea mays* L.) que mitose e endorreduplicação são diferencialmente regulados (SETTER; FLANNIGAN, 2001). Estudos de grande variedade de células e tecidos vegetais sugerem que endorreduplicação é modulada pelos níveis de auxina, citocinina, ácido abscísico e giberelina (VALENTE et al., 1998). De fato, há evidências de que estes reguladores de crescimento afetam diretamente a expressão de genes responsáveis pela regulação do endociclo (FRANK; SCHMÜLLING, 1999). Porém, neste trabalho tanto o meio de cultura sem reguladores de crescimento, quanto os meios com reguladores proporcionaram endorreduplicação nos explantes. No entanto, as estimativas de conteúdo de DNA foram afetadas pelos reguladores.

Portanto, os reguladores de crescimento influenciam no estabelecimento *in vitro* de pitaya vermelha, assim como na estimativa da quantidade de DNA.

CONCLUSÕES

Explantes de pitaya vermelha cultivados *in vitro* na ausência de luz não desenvolvem.

O meio de cultura que proporciona melhor crescimento e desenvolvimento *in vitro* é o MS acrescido de 0,1 mg L⁻¹ de ANA e BAP ou CIN nas concentrações de 1 ou 5 mg L⁻¹.

A endorreduplicação foi observada em todos os tratamentos, exceto no material coletado no campo. O meio de cultura que proporciona aos explantes maior variação na quantidade de DNA é MS com 10 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de ANA.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e a Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro dado para realização deste trabalho.

ABSTRACT: Micropropagation makes the obtaining of seedlings of red pitaya easier, but, it can cause genetic mutations such as polysomaty, endopolyploidy or endoreduplication. In this work, it was aimed to develop a protocol for micropropagation and check the endoreduplication in red pitaya. Pitaya cladodes were micropropagated in MS culture medium with 0.1 mg L⁻¹ of ANA added of BAP and kinetin at the dosages of 0, 1, 5 and 10 mg L⁻¹, the MS medium without any growth regulators being used as the control treatment. The experimental design utilized was the completely randomized in factorial 2 x 8 (absence and presence of light and 8 different culture media), amounting to 16 treatments, namely, 4 replications of 3 explants. The experiment was conducted in the presence and absence of light in a growth room at 25 ± 2 °C, average irradiance of 42W m⁻² and photoperiod of 16 hours for 120 days. The flow cytometry analysis was utilized on three explants per treatment. Cladode samples, along with the internal pattern (pea) were ground with 1 ml of extraction buffer LB 01 and 25 mL of propide iodide, analyzed in flow cytometer. The explants submitted to the absence of light did not respond to the treatments. The culture medium which brings about the best *in vitro* growth and development is the MS added of 0.1 mg L⁻¹ of ANA and BAP or kinetin at the concentrations of 1 or 0.5 mg L⁻¹. The culture medium which provides to the explants greatest variation in the amount of DNA is MS with 10 mg L⁻¹ of BAP and 0.1 mg L⁻¹ of ANA. The phenomenon of endoreduplication is found in all the treatments investigated.

KEYWORDS: *Hylocereus undatus* Haw. Flow cytometry. Plant hormones.

REFERÊNCIAS

BASTOS, D. C.; PIO, R.; SCARPARE FILHO, J. A.; LIBARDI, M. N.; ALMEIDA, L. F. P.; GALUCHI, T. P. D.; BAKKER, S. T. Propagação da pitaya 'vermelha' por estaquia. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1106-1109, 2006.

BAROW, M. Endopolyploidy in seed plants. **BioEssays**, Massachusetts, USA, v. 28, p. 271-281, 2006.

- CECCARELLI, M; SANANTONIO, E; MARMOTTINI, F; AMZALLAG, G. N; CIONINI, P. G. Chromosome endoreduplication as a factor of salt adaptation in *Sorghum bicolor*. **Protoplasma**, California, v. 227, p. 113-118, 2006.
- CHEVALIER, C.; NAFATI, M.; MATHIEU-RIVET, E.; BOURDON, M.; FRANGNE, N.; CHENICLET, C.; RENAUDIN, J.P.; GÉVAUDANT, F.; HERNOULD, M. Elucidating the functional role of endoreduplication in tomato fruit development. **Annals of Botany**, Oxford, v. 107, p. 1159-1169, 2011.
- COOKSON S. J.; RADZIEJWOSKI A.; GRANIER C. Cell and leaf size plasticity in *Arabidopsis*: what is the role of endoreduplication? **Plant Cell & Environment**, Oxford, v. 29, p. 1273-1283, 2006.
- DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, Oxford, v. 95, n. 1, p. 99-110, Jan. 2005.
- DOLEZEL, J. et al. Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison. **Annals of Botany**, Oxford, v. 82, p. 17-26. 1998.
- FRANK, M.; SCHMÜLLING, T. *Researchnews: cytokinin cycles cells*. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 4, p. 243-244, 1999.
- GONZALEZ-SAMA A.; DE LA PEÑA T. C.; KEVEI Z. Nuclear DNA endoreduplication and expression of the mitotic inhibitor Ccs52 associated to determinate and lupinoid nodule organogenesis. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Missouri, v. 19, p. 176-180, 2006.
- GALBRAITH, D. W. et al. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in the intact plant tissues. **Science**, Washington, v. 220, p. 1049-1051, 1983.
- LARKIN, J. C.; BROWN, M. L.; CHURCHMAN, M. L. Insights into the endocycle from trichome development. In: Inze D. ed. Cell cycle control and plant development. **Annual Plant Reviews**. Oxford, Blackwell Publishing, v. 32, p. 249-268, 2007.
- MISHIBA, K.; MII, M. Polysomaty analysis in diploid and tetraploid *Portulaca grandiflora*. **Plant Science**, Ireland, v. 156, p. 213-219, 2000.
- MARTÍNEZ-CÁRDENAS, M. L., VICENTE-SOLANO, R.; MARTÍNEZ-HERRERA, A.; CARMONA, A.; VARELA, G.H. Survival and growth on soil of micropropagated pitaya de mayo plants. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 748, p. 237-240, 2007.
- MOHAMED-YASSEEN, Y. Micropropagation of pitaya (*Hylocereus undatus* Britton et Rose). **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, North Carolina, USA, v. 38, p. 427-429, 2002.
- MURASHIGUE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- OJEDA-ZACARÍAS, M. C., RODRÍGUEZ-FUENTES, H., GUTIÉRREZ-DIÉZ, A. Micropropagación de Cactáceas. **Anais...VII SIMPOSIUM-TALLER "PRODUCCIÓN Y APROVECHAMIENTO DEL NOPAL EN EL NORESTE DE MÉXICO"**. Facultad de Agronomía, UANL y Museo Bernabé de las Casas. Mina, Nuevo León, México, 2008.
- OLIVEIRA, A. B., DINIZ, J. N., ALMEIDA, J. L. Multiplicação e enraizamento *in vitro* do mandacaru (*Cereus jamacaru* P. DC.). **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v. 4, n. 1, p. 48-54, 2008.
- ROBINSON, J. P. Introduction to flow cytometry. Flow cytometry talks. USA: Purdue University Cytometry Laboratory. Disponível em: <http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/educate/pptslide.html>. 2006. Acesso em: 26 jun 2011.

SABELLI, P. A.; LARKINS, B. A. The contribution of cell cycle regulation to endosperm development. **Sexual Plant Reproduction**, Oklahoma, v. 22, p. 207-219, 2009.

SEEMANN, P., RODRÍGUEZ, C., JARA, G. Cultivo *in vitro* de cactáceas con fines de conservación *ex situ*. **Agro Sur**, Valdivia, v. 35, n. 2, p. 24-26, 2007.

SETTER, T. L.; FLANNIGAN, B. A. Water deficit inhibits cell division and expression of transcripts involved in cell proliferation and endoreduplication in maize endosperm. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 52, p. 1401-1408, 2001.

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

YAMASAKI, S.; SHIMADA, E.; KUWANO, T.; KAWANO, T.; NOGUCHI, N. Continuous UV-B irradiation induces endoreduplication and peroxydase activity in epidermal cells surrounding trichomes on cucumber cotyledons. **Journal of Radiation Research**, Oxford, v. 51, p. 187-196, 2010.

VALENTE, P.; TAO, W.; VERBELEN, J. P. Auxins and cytokinins control DNA endoreduplication and deduplication in single cells of tobacco. **Plant Science**, Ireland, v. 134, p. 207-215, 1998.

VINARDELL, J. M.; FEDOROVA, E.; CEBOLLA, A.; ZOLTAN, K.; HORVATH, G.; KELEMEN, Z.; TARAYRE, S.; ROUDIER, F.; MERGAERT, P.; KONDOROSI, A.; KONDOROSI, E. Endoreduplication mediated by the Anaphase-Promoting Complex Activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules. **The Plant Cell**, Maryland, v. 15, p. 2093-2105, 2003.