

Proliferação e enraizamento *in vitro* de brotos de palma forrageira - *Opuntia ficus-indica* (L.) MILL

Hamilton Melo Frota¹, Maria Socorro de Souza Carneiro^{1*}, Rômulo Marino Llamoca Zárate³, Francisco de Assis Paiva Campos² e Márcio José Alves Peixôto¹

¹Departamento de Zootecnia e ²Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, 60355-970, Fortaleza, Ceará, Brasil. ³Departamento de Zootecnia, Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande, Paraíba, Brasil.
*Author for correspondence. e-mail: msocorro@ufc.br

RESUMO. O trabalho foi conduzido no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará com o objetivo de avaliar o efeito do 6-benzilaminopurina (BAP) e do ácido indolacético (AIA) na proliferação e no enraizamento *in vitro* de brotos da palma forrageira. Os explantes foram incubados no meio de cultura com sais e vitaminas MS, suplementados com 5% de sacarose, 0,8% de ágar e pH 5,85. Para a proliferação, os brotos foram inoculados em placas de Petri contendo o meio de cultura em diferentes concentrações de BAP. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial de 10 x 3, com 3 repetições. No enraizamento, os brotos foram inoculados no meio de cultura contendo diferentes concentrações de AIA. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial de 10 x 3, com 3 repetições. Concluiu-se que os melhores protocolos para a proliferação e o enraizamento de brotos foram, respectivamente, BAP 1,00mg/L e AIA 5,00mg/L.

Palavras-chave: broto, cladódio, explante, meio de cultura.

ABSTRACT. Proliferation and rooting *in vitro* of buds of palm grass *Opuntia ficus-indica* (L.) MILL. The work was carried out in the Biochemistry and Molecular Biology Department of Ceará Federal University. The aim was to evaluate the effects of 6-benzylaminopurine (BAP) and indolacetic acid (IAA) on proliferation and rooting *in vitro* of buds of palm grass. The samples were incubated in the culture environment with salts, vitamins MS, 5% of sucrose, 0.8% of agar and pH of 5.85. For the proliferation, the buds were inoculated in Petri plates, and the culture environment was contained in different BAP concentrations. The experimental delineation was entirely randomly in an arrangement factorial of 10 x 3 and three replications. In the rooting, the buds were inoculated in the culture environment and they had different concentrations of indoacetic acid (IAA). Results showed that the best protocols for proliferation and buds of rooting were, respectively: BAP to 1.00mg/L and IAA to 5.00mg/L.

Key words: bud, cladodio, culture environment, explant.

Introdução

Na região Nordeste do Brasil, a falta de água e a baixa produtividade das forrageiras nativas dificultam e oneram os custos para os pecuaristas ao longo dos anos (Carneiro *et al.*, 1989), daí a procura por forrageiras adaptadas a essas condições. A palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.), pertencente à família das Cactaceae, é cultivada em ambientes diversos que possuem clima quente e seco, como a zona da mata, o agreste, a caatinga e as serras, estimando-se em 400.000 ha implantados no Nordeste brasileiro (Santos *et al.*, 1997). Para o

plântio de grandes áreas, nem sempre os propágulos são suficientes, sendo usados cladódios doentes, desuniformes e sem a suculência adequada para o enraizamento. Por esta razão, foram iniciadas pesquisas para micropropagação *in vitro* dessa forrageira, a exemplo de Llamoca-Zárate *et al.* (1999) que, utilizando as técnicas da cultura de tecidos, proliferaram e enraizaram uma cultivar de palma gigante, obtendo melhores resultados quando foi acrescentado ao meio de cultivo MS (Murashige e Skoog, 1962), 6-benzilaminopurina (BAP) a 1,00mg/L para a proliferação e Ácido indolacético (AIA) a 5,00mg/L para enraizamento.

Com base nos dados acima, esta pesquisa visou avaliar o efeito do BAP e do AIA na proliferação e no enraizamento *in vitro* de brotos de 10 clones da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.).

Material e métodos

O experimento foi conduzido no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, utilizando-se 10 clones da espécie *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Tabela 1), cedidos pela Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, em Arco Verde, Pernambuco, plantados em vasos plásticos com capacidade para 20L, contendo areia e adubo orgânico na proporção de 1:1, e acondicionados em casa de vegetação. Após 6 meses em casa de vegetação, foram coletados cladódios jovens dos 10 clones de palma forrageira com tamanhos variando entre 8-12 cm, descontaminados em solução de cloreto de sódio a 2% e água destilada autoclavada, e, em seguida, foram colocados em meio para crescimento.

Tabela 1. Identificação dos clones de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.

Clone	Identidade	Procedência
C14	Gigante	Estação experimental de Arco Verde – IPA
C19	IPA-20	Estação experimental de Arco Verde – IPA
C33	F-2	Copena V-1 Nopalera UACH, Chapingo – México
C34	F-4	Atlixco Nopalera UACH, Chapingo – México
C43	F-7	Negro Michocán Nopalera UACH, Chapingo – México
C44	F-8	Blanco Michocán Nopalera UACH, Chapingo – México
C61	F-15	Redondo chico Nopalera UACH, Chapingo – México
C63	F-17	Liso forrageiro(s) Nopalera UACH, Chapingo – México
C64	Redonda	Estação experimental de Arco Verde – IPA
C81	F-25	Durasnillo La Pila – San Luis Potosi

Na preparação do meio de cultura, foram utilizados sais e vitaminas MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementados com 5% de sacarose, 0,8% de ágar e pH de 5,85. A este meio de cultura, foram adicionadas diferentes concentrações ou combinações dos reguladores de crescimento, 6-benzilaminopurina (BAP) e Ácido indolacético (AIA).

Para o experimento sobre proliferação, foram utilizados brotos que estavam no laboratório, em meio de cultura de crescimento, com tamanhos variando entre 1,5-4,0 cm. Estes foram postos em placas de Petri estéreis, seccionados transversalmente na base para retirada de calos ou tecido suberizado e, no ápice para a quebra da dominância apical. Em seguida, foram postos em

outra placa estéril, seccionados transversalmente em cilindros com tamanhos entre 0,5-0,8 cm e longitudinalmente, dando origem a dois explantes com média de sete aréolas cada, os quais foram inoculados em placas de Petri; as quais foram identificadas com os nomes dos clones, com a data da indução e com os tratamentos. A seguir, foram incubados na câmara de crescimento por 4 semanas, a uma temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, intensidade luminosa de $25,3\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial de 10×3 , com 3 repetições, onde foram avaliados 10 clones de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. em 3 diferentes concentrações de BAP: 0,50mg/L; 1,00mg/L e 1,50mg/L. A unidade experimental foi composta por 10 explantes por placa de Petri. Semanalmente, foi observada e anotada a quantidade de brotos proliferados em cada tratamento por um período de 30 dias.

Terminada a pesquisa sobre proliferação, os brotos foram transferidos para o meio de cultura para enraizamento. Inicialmente, os brotos com tamanhos entre 1,0-2,0 cm foram levados para câmara de fluxo laminar em condições assépticas, postos em placa de Petri estéril e seccionados transversalmente na base para a retirada de calos ou tecidos suberizados. Esses explantes foram seccionados novamente para ficar apenas uma aréola por explante, os quais foram distribuídos, individualmente, em 90 tubos de ensaio contendo o meio de cultura dos tratamentos. Nesses tubos, foram feitas as identificações dos clones e dos tratamentos. A seguir, foram incubados na câmara de germinação, onde ficaram por 4 semanas em temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $25,3\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial de 10×3 , com 3 repetições, onde utilizaram-se brotos dos 10 clones de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. e 3 diferentes concentrações de ácido indolacético (AIA): 0,00mg/L; 5,00mg/L e 10,00mg/L. Após 30 dias de incubação, foi feita a contagem do número de raízes dos explantes.

Resultados e discussão

Os resultados da análise de proliferação de brotos indicaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre clones e tratamentos pelo teste de Tukey (Tabela 2).

Tabela 2. Percentual médio de proliferação de brotos *in vitro* da palma forrageira - *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.

Clone	Tratamentos			Média
	BAP ^{0,50} mg/L	BAP ^{1,00} mg/L	BAP ^{1,50} mg/L	
C14	18	26	18	20 ^{F*}
C19	32	38	21	30 ^{CDE}
C33	27	46	48	40 ^{BCD}
C34	43	66	46	52 ^A
C43	40	54	39	44 ^{BC}
C44	60	75	80	72 ^A
C61	48	62	30	47 ^{BC}
C63	30	63	21	38 ^{BCDE}
C64	37	38	34	36 ^{BCDE}
C81	23	31	18	24 ^{DE}
Média	36 ^b	50 ^a	36 ^b	-

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula (na coluna) e minúscula (na linha) não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O meio de cultura proposto, suplementado com BAP 1,00mg/L, proporcionou as melhores médias da proliferação de brotos para os 10 clones de palma forrageira pesquisados. O meio de cultura suplementado com BAP 0,50mg/L e 1,50mg/L não proporcionaram diferenças entre si ($p > 0,05$) quanto ao número de brotos formados entre os clones avaliados.

Esses resultados foram semelhantes aos relatos de Llamoca-Zárate *et al.* (1999) quando pesquisaram a palma forrageira cv. gigante nas mesmas condições. Entretanto diferem da pesquisa de Pasqual e Hoshika (1992) os quais proliferaram *in vitro* dois cactos, conseguindo os melhores resultados para *Gymnocalycium buldiamur* (L.) ao suplementar o meio de cultura MS completo com 4,00mg/L de BAP e, para *Mammillaria bocassana* (L.) a brotação não foi influenciada pelas diferentes combinações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0mg/L) e NAA (0,0; 0,1; 1,0 mg/L) testadas.

Skoog e Miller (1957) afirmaram que a proliferação de brotos de inúmeras plantas depende de citocininas e auxinas, o que não ocorreu neste trabalho, pois a proliferação foi conseguida sem o uso de auxinas. Observando os resultados entre os clones estudados, a maior média de proliferação de brotos foi obtida através do clone 44 com 72%, diferindo estatisticamente dos demais ($p < 0,05$). O clone 14 foi o que atingiu menor média, com apenas 20% de proliferação de brotos, não diferindo ($p > 0,05$) dos clones 19, 63, 64 e 81, com 30%, 38%, 36% e 24%, respectivamente.

Na pesquisa sobre enraizamento de brotos, foi verificada diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, quando se associaram os fatores clone e tratamento (Tabela 3).

Tabela 3. Número médio de raízes nos brotos *in vitro* da palma forrageira - *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.

Clone	Tratamentos		
	AIA ^{0,00} mg/L	AIA ^{5,00} mg/L	AIA ^{10,00} mg/L
C14	0,43Ab *	16,07Aba	1,93CDb
C19	2,40Ac	18,13Aa	10,70Ab
C33	2,13Aa	5,03Ea	0,97Da
C34	0,77Ab	15,90Aba	3,53BCDb
C43	0,83Ab	8,13CDEa	0,93Db
C44	2,03Ac	14,50Aba	9,90Ab
C61	1,43Ab	7,87Dea	7,13ABCa
C63	1,03Ab	11,40BCDa	3,53BCDb
C64	0,90Ab	13,13ABCa	3,30BCDb
C81	4,73Ab	11,30BCDEa	8,80Abab

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula (na coluna) e minúscula (na linha) não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O meio de cultura constituído da mistura basal de sais e de vitaminas MS completo, suplementado com Ácido indolacético (AIA) 5,00mg/L, proporcionou os melhores resultados do enraizamento de brotos para os 10 clones de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. inquiridos. Por outro lado, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os clones testados quando não se utilizou o regulador de crescimento.

O clone 19 foi o mais representativo no tratamento (AIA) 5,00mg/L, com a média de 18,2 raízes/broto, com uma diferença de 360,4% a mais que o clone 33, que apresentou o menor número de raízes.

Esses resultados corroboram com as descrições de Llamoca-Zárate *et al.* (1999) que enraizaram palma forrageira cv. gigante utilizando o meio de cultura MS completo adicionando AIA 5,00mg/L. Mauseth (1979) obteve o melhor resultado para proliferação de brotos de *Opuntia basilaris* L. ao suplementar o meio com NAA na concentração de 10,00mg/L, enquanto Escobar *et al.* (1986) suplementaram o meio de cultura com Ácido 3-indolbutírico (IBA) 10,00 mg/L para *Opuntia amyclaea* L., otimizando os resultados. Já Mohamed-Yasseen *et al.* (1995), quando adicionaram ao meio de cultura MS o regulador de crescimento IBA na concentração de 2,00mg/L, para uma cultivar americana, não descrita, de palma forrageira, obtiveram os melhores resultados no enraizamento. Nessa pesquisa, houve uma tendência à diminuição do número de raízes, tanto no meio desprovido de AIA como no meio em que a concentração deste foi muito elevada. Pasqual e Hoshika (1992) relataram que as raízes são mais evidentes nos meios desprovidos de 6-benzilaminopurina.

Desse modo, pode-se afirmar que o melhor resultado para proliferação de brotos de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. foi conseguido através de BAP 1,00 mg/L, no qual o clone 44 apresentou 72% de brotação. O uso de AIA 5,00 mg/L proporcionou a

melhor média de raízes, sendo o clone 19 o mais relevante, com 18,13 raízes.

Referências

- CARNEIRO, M. S. S. *et al.* Manejo de corte em palma forrageira - *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill e palma doce - *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dick. *Rev. Soc. Bras. Zootec.*, Viçosa, v.18, n.6, p.526-531, 1989.
- ESCOBAR, H. A. *et al.* *Opuntia* micropropagation by axillary proliferation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, Dordrecht, v.7, p.269-277, 1986.
- LLAMOCA-ZÁRATE, R. M. *et al.* Whole Plant Regeneration from the Shoot Apical Meristem of *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae). *J. Appl. Bot.-Angewandte Botanik*, Berlin, v.73, p.83-85, 1999.
- MAUSETH, J. D. A new method for the propagation of cacti: Sterile culture of axillary buds. *Cactus Succul. J.*, Reseda, v.51, p.186-187, 1979.
- MOHAMED-YASSEEN Y. *et al.* Rapid propagation of tuna (*Opuntia ficus-indica*) and plant establishment in soil. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, Dordrecht, v.42, p.117-119, 1995.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- PASQUAL, M.; HOSHIKA, E. Efeito do Ácido Naftaleno Ácético e 6-benzilaminopurina sobre a proliferação *in vitro* de *Cactos Gymnocidium buldianum* L. e *Mammillaria bocassana* L. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, n.27, v.4, p.589-593, 1992.
- SANTOS, D. C. dos *et al.* dos; ARRUDA, G. P. de. *A palma forrageira (Opuntia ficus-indica Mill e Nopalea cochenillifera Salm Dyck) em Pernambuco: Cultivo e Utilização*. Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, Recife. Instruções Técnicas do IPA. Documento n.25, p.23, 1997.
- SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, Cambridge, v.11, p.118-131, 1957.

Received on August 29, 2003.

Accepted on March 02, 2004.