

AGRÁRIA

Revista Brasileira de Ciências Agrárias
v.2, n.1, p.28-31, jan.-mar., 2007
Recife, PE, UFRPE. www.agrariaufrpe.com
Protocolo 69 - 19/12/2006

Andréa G. V. de Vasconcelos²

Mario de A. Lira³

Vanildo A. L. Cavalcanti³

Mercia V. F. dos Santos⁴

Terezinha Câmara⁴

Lilia Willadino⁴

Micropropagação de palma forrageira cv. Miúda (*Nopalea cochenillifera* - Salm Dyck)¹

RESUMO

Propõe-se, neste trabalho, estabelecer protocolos de micropropagação para a cv. Miúda (*Nopalea cochenillifera*- Salm Dyck), considerando-se ser esta espécie resistente à praga cochonilha do carimim. Cladódios jovens, entre 5 e 8cm, foram esterilizados em álcool etílico a 70% e em solução de hipoclorito de sódio a 2%. Explantes de 5 mm³ foram cultivados em meio de cultura Murashige e Skoog (MS) completo, em um tratamento com três níveis de AIA (0,0; 0,1 e 0,25mg.L⁻¹); após seis semanas, os brotos foram transferidos para um meio de crescimento MS básico, suplementado com 3 ou 5% de sacarose, 1,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ AIA; metade do total de brotos foi cortada longitudinalmente antes da transferência e a outra metade foi transferida intacta; após oito semanas, os brotos foram repicados para meio MS básico sem reguladores de crescimento e, posteriormente, aclimatizados. Não se constatou diferenças em relação a utilização do AIA, na primeira fase. Foi verificada diferença significativa tanto para o corte longitudinal como para o nível de sacarose. O corte proporcionou uma multiplicação 70% maior e o nível de sacarose de 3%, uma multiplicação 50% maior para os explantes não cortados.

Palavras-chave: biotecnologia, cultura de tecidos, melhoramento de plantas

Micropropagation of prickly-pear cv. Miúda (*Nopalea cochenillifera*- Salm Dyck)

ABSTRACT

The objective of this study was to establish micropropagation protocols for cv. Miúda (*Nopalea cochenillifera*- Salm Dyck), considering that this variety presents resistance to the plague carmine cochineal. In this experiment, young prickly-pear cladodes (measuring between 5 to 8 cm) were sterilized in 70% alcohol and in solution of sodium hypochlorite (2%). Explants measuring 5 mm³ were cultivated in complete Murashige and Skoog.(MS) culture medium, in a treatment with three levels of AIA (0; 0.1; 0.25 mg L⁻¹). Six weeks later, the shoots were changed to a basic culture medium supplemented with 3 or 5% of sucrose, with 1.0 mg L⁻¹ BAP and 0.5 mg L⁻¹ AIA. Half of them were longitudinally sectioned before the transference, while the other remained intact. Eight weeks later, the shoots were put in a MS medium without growth regulators and posteriorly acclimatized. In "phase one" no differences among the three levels of AIA were observed. Significant difference was verified in the longitudinal cut and in the sucrose level. The cut increased multiplication by 70%, while the best sucrose level (3%) showed a 50% increase in multiplication compared to shoots without cut.

Key words: biotechnology, tissue culture, plant breeding

² Banco do Nordeste do Brasil, Rua do Futuro, 305/1101 CEP 52050-010, Recife, PE.

Fone: (81) 3427-0468, agvrural@yahoo.com.br

³ Pesquisador do IPA, Av Gal San Martin 1371, CEP50761-000. Fone: 2122-7111 Recife, PE.

mariolira@terra.com.br, vanildo@ipa.br

⁴ Prof. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, d/n, CEP 52171-900, Recife, PE, lilia@pesquisador.cnpq.br, tkrcamara@pesquisador.cnpq.br, mercia@dz.ufrpe.br

¹ Parte da dissertação da primeira autora apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFRPE

INTRODUÇÃO

A estacionalidade da produção de forragem no semi-árido é provocada principalmente pela distribuição irregular das chuvas, associada a outras características climáticas e a deficiências no manejo das forrageiras. A palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) tem sido largamente utilizada no Nordeste, visando à suplementação dos animais nos períodos críticos do ano. A palma é uma forrageira bem adaptada às condições do semi-árido, suportando grande período de estiagem, devido às propriedades fisiológicas, caracterizadas por processo fotossintético eficiente (Santos et al., 2006).

Atualmente, algumas regiões do estado de Pernambuco onde a palma é cultivada vêm sendo atacadas pela cochonilha do carmim (*Dactylopius* sp - Hemiptera, Dactylopiidae), provocando perda significativa para o pecuarista do semi-árido.

Uma alternativa de cultivo para a palma, em regiões atacadas por esse inseto, é o plantio de clones resistentes. Em trabalhos de seleção de clones resistentes à cochonilha do carmim, a palma forrageira cv. Miúda (*Nopalea cochenillifera* Salm Dyck) vem se destacando como resistente (Vasconcelos et al., 2002).

A palma miúda ou doce, como também é conhecida, apresenta um valor nutritivo melhor, quando comparada com as cultivares mais plantadas no Estado, Redonda e Gigante. A cultivar Miúda é capaz de produzir, a cada ano, 68 t ha⁻¹ de matéria verde, com densidade de 20 mil plantas por hectare (Santos et al., 2006). Em razão de apresentar uma multiplicação mais rápida que as cultivares Redonda e Gigante, é possível realizar colheitas com intervalos de 1 ano, o que não é recomendado para as demais cultivares.

Na propagação convencional a implantação da cultura requer grande quantidade de material. A palma pode ser propagada por cladódio inteiro ou metade do cladódio, em corte transversal ou longitudinal; contudo, a aquisição e o transporte de mudas, mesmo fracionadas, se torna um problema principalmente quando o plantio é realizado em locais distantes da produção da palma semente. A fonte de material vegetativo para implantação da palma constitui as plantações comerciais, apesar dessas apresentarem as desvantagens de propagação de doença e falta de certificação genética.

Para a implantação de um hectare de palma utilizando um espaçamento convencional (2,0 x 1,0m), são necessários 5.000 cladódios. No caso do plantio em espaçamento adensado (1,0 x 0,25m) são necessários 40.000 cladódios para se implantar um hectare com a cultura; este número elevado de cladódios inviabiliza ou atrasa, muitas vezes, o lançamento de novas cultivares, em virtude da dificuldade em disponibilizar material de plantio suficiente para os produtores interessados. Além disso, o sistema convencional de propagação da palma é lento, dificultando também o lançamento das novas cultivares.

Embora a propagação clonal natural para a cultivar Miúda seja utilizada tradicionalmente, a necessidade de grande quantidade de material demandada por grandes plantações é um sério problema prático; a limitação desse sistema de propagação pode ser superada pela utilização de novas tecnologias atualmente disponíveis, como a cultura de tecidos vege-

tais.

As técnicas de cultivo *in vitro* de tecidos vegetais têm sido empregadas de diferentes formas, no desenvolvimento de cultivares superiores de plantas. Escobar et al. (1986) desenvolveram um método de micropropagação muito eficiente para *Opuntia amyloacea*, de acordo com o qual em 100 dias foi possível obter 25.000 plantas provenientes de um cladódio de cerca de 5 cm.

Não foram encontrados, na literatura, trabalhos de multiplicação *in vitro* para o gênero *Nopalea*. Existem alguns registros de trabalhos do gênero *Opuntia* (Llamoca-Zarate et al., 2006; Villalobos, 2001; Villalobos, et al., 1995); desta forma, se objetivou, com o este trabalho estabelecer um protocolo de micropropagação para a palma forrageira cv. Miúda (*Nopalea cochenillifera* – Salm Dyck).

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE. Realizaram-se dois ensaios de multiplicação representando as diferentes fases de desenvolvimento da palma, conforme descrito a seguir.

Ensaio 1

Cladódios jovens de palma forrageira cv. Miúda (*Nopalea cochenillifera*- Salm Dyck) foram utilizados, medindo entre 5 e 8 cm de comprimento; os cladódios foram coletados de plantas mantidas no Campus da UFRPE.

Os cladódios jovens foram desinfestados com álcool etílico a 70%, durante um minuto e, em seguida, com hipoclorito de sódio a 2%, durante 10 minutos; após a desinfestação, eles foram lavados três vezes, em câmara de fluxo laminar, com água destilada estéril.

Dos cladódios se retiraram explantes de aproximadamente 5mm³, contendo uma auréola. Os explantes foram estabelecidos no meio de indução, que consistiu no meio de cultura MS completo (Murashige & Skoog 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 2,0 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) e três diferentes níveis de AIA (ácido 3-indolacético): 0,0; 0,1 e 0,25 mg L⁻¹; fase em que o meio de cultura diferiu apenas quanto à concentração de AIA; o meio foi gelificado com 6,5 g L⁻¹ de ágar-ágar. Utilizado-se delineamento experimental inteiramente casualizado, com 15 repetições. Esta etapa de indução foi realizada duas vezes, em dois períodos distintos: a primeira serviu de parâmetro para o estabelecimento do nível de AIA a ser empregado na etapa de multiplicação e a segunda serviu de fontes de explantes para a etapa de multiplicação.

Os explantes foram mantidos em sala de crescimento, a uma temperatura de 27 + 2°C, sob luz fluorescente com intensidade de 50 a 60 mmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas. Após seis semanas, os brotos oriundos das auréolas inoculadas no meio de indução, que apresentavam comprimento superior a 1,0 cm foram transferidos para um meio de multiplicação, o qual consistiu do meio MS completo, suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BAP, 0,1 mg L⁻¹ AIA e dois níveis de sacarose 30 g L⁻¹ e 50 g L⁻¹ (3% e 5%).

Ensaio 2

Para esta etapa do processo de multiplicação o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em fatorial 2 x 2, sendo dois níveis de sacarose (3% e 5%) e dois tipos de explante (com e sem corte), com 15 repetições. A unidade experimental se constituiu de um tubo de ensaio contendo um explante; os dados foram analisados estatisticamente e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

As plantas formadas oito semanas após a inoculação, foram separadas e transferidas para meio de cultura MS básico, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose para desenvolvimento, enraizamento e posterior aclimatização, a qual foi realizada 25 dias após esta transferência. As plantas foram aclimatizadas em bandeja com substrato comercial Plant Mix ou areia lavada, conforme o tratamento. A rega das plantas se deu três vezes por semana, utilizando-se 20 mL de solução nutritiva, composta do fertilizante solúvel Kristalon® (742,86 mg.L⁻¹) e Barco Viking® (840 mg.L⁻¹). A solução de irrigação continha a seguinte composição: 18% de N, 11% de P₂O₅, 38% de K₂O, 4% de MgO, 11% de S, 19% de Ca e micronutrientes; nesta etapa não foram realizadas análises estatísticas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos três meios utilizados para estabelecimento *in vitro* não se constataram diferenças significativas, de acordo com o teste F; entretanto, destacou-se o meio suplementado com 0,1 mg.L⁻¹ AIA. Os explantes submetidos a este tratamento apresentaram maior número de brotações e menor índice de necrose ou de explantes sem brotação. Definiu-se a concentração de 0,1 mg L⁻¹ de AIA para ser utilizada na etapa de multiplicação, haja vista que este regulador de crescimento participa diretamente do crescimento e da diferenciação dos tecidos.

Segundo Skoog & Miller (1957), as auxinas (representadas no trabalho pelo AIA) e as citocininas (BAP), são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura de tecido. A formação de raiz, parte aérea e calo em cultura de tecidos, é regulada pela disponibilização e interação dessas duas classes de reguladores.

Na fase de multiplicação ocorreu diferença significativa, tanto entre os distintos níveis de sacarose quanto em relação à realização ou não do corte longitudinal (Tabela 1).

No que se refere à concentração de sacarose, observaram-se as maiores percentagens de multiplicação no material cultivado com 30 g L⁻¹ de sacarose, porém, diversos autores

(Llamoca-Zarate, 1999; Villalobos et al., 1995; Escobar et al., 1986) relatam que, para cactáceas do gênero *Opuntia*, a concentração ideal de sacarose é de 50 g L⁻¹. A concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose é a mais utilizada para a micropropagação das diversas espécies vegetais, servindo de referência para o estabelecimento de novos protocolos de multiplicação, uma vez que, além de fornecer energia metabólica e esqueleto carbônico para uma diversidade de compostos orgânicos, ela desempenha importante papel como componente do potencial osmótico do meio de cultura; sozinha, a sacarose contribui com 50 a 80% do potencial osmótico do meio (Trigiano & Gray, 2000). A redução do potencial osmótico do meio nutritivo em função da concentração de sacarose, de 30 para 50 g.L⁻¹, pode ter contribuído para a redução da taxa de multiplicação, uma vez que a palma forrageira cv. Miúda, comparada com outras cultivares, apresenta elevado potencial osmótico (-0,3 a -0,6 MPa) no cladódio (Nobel, 2001). A elevação da concentração de sacarose pode ter acarretado paralelamente, redução na capacidade de metabolização de carboidratos, como sugerem Brow & Thorpe (1980).

A realização do corte longitudinal proporcionou aumento em torno de 70% no número de brotos obtidos; esta maior multiplicação do material se justifica pela exposição de uma área maior do broto ao BAP, facilitando o desenvolvimento de novos brotos a partir das gemas axilares preexistentes; além disso, o corte também possibilita a quebra da dominância apical favorecendo uma brotação maior das gemas laterais.

Utilizando-se o nível de 3% de sacarose, seja na etapa de indução ou na de multiplicação se realizando cortes longitudinais nos explantes, é possível a obtenção de 8.910 plantas enraizadas em seis meses de cultivo, considerando-se uma contaminação de 10% e uma indução de 60% dos explantes inoculados e 60% dos brotos cortados. Sem se levar em conta perdas nos processos de multiplicação, como no trabalho de Escobar (1986), é possível a obtenção de 24.300 plantas.

Obteve-se o maior número médio de brotos (15/explante) a partir de explantes cortados e mantidos em meio com 30 g.L⁻¹ de sacarose. Escobar (1986), trabalhando com *Opuntia amyloacea*, obteve também uma média de 15 brotos por cada explante inoculado em meio MS com 50 g L⁻¹ de sacarose e 10 mM de BA, 25 dias após o corte longitudinal dos brotos iniciais; assim, partindo-se de uma raquete de 5 cm e inoculando 30 gemas, obtiveram-se 25.000 plantas em 85 dias de cultivo. Para a *Opuntia ficus-indica* cv. Gigante, Llamoca-Zarate (1999) obtiveram 1.258 plantas em um ciclo de cultivo (120 dias), partindo de uma raquete com aproximadamente 50 explantes.

Os brotos transferidos para meio MS sem adição de reguladores de crescimento e com 30 g L⁻¹ de sacarose, apresentaram raízes em quantidade e com grau de desenvolvimento compatíveis com a aclimatização, 25 dias após essa transferência.

Trinta dias após a aclimatização a altura média das plantas era 6,06 cm para areia lavada e 5,11 cm no substrato comercial, período em que não ocorreu morte de nenhuma planta totalizando, enfim, uma eficiência de 100% na aclimatização; após esta primeira medição, as plantas foram transferidas para copos plásticos com capacidade para 300 mL contendo areia

Tabela 1. Número médio de brotos de palma forrageira obtidos após 60 dias de incubação com e sem corte em meio MS com dois níveis de sacarose

Table 1. Mean number of sprouts of prickly-pear after 60 days of incubation with and without cut in MS medium with two levels of sucrose

Explante	Níveis de sacarose	
	30 g L ⁻¹	50 g L ⁻¹
Com corte	15,00 A a	9,00 B a
Sem corte	4,66 A b	2,66 B b

Média com letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si (Tukey 5%)

lavada e pó de coco (3:1); decorrido meses quanto dessa transferência, as plantas apresentavam comprimento médio de 11,71 cm. Não se realizaram testes estatísticos para a fase de aclimatização haja vista que todas as plântulas aclimatizadas sobreviveram e cresceram de maneira uniforme.

CONCLUSÕES

1. O estabelecimento *in vitro* de segmentos de cladódios jovens de palma forrageira cv. Miúda visando à micropropagação, foi mais promissor em meio MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 1,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de AIA.

2. O corte longitudinal dos cladódios na fase de multiplicação, favoreceu a emissão de brotos no cultivo em meio MS com 30 g L⁻¹ de sacarose, 1,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de AIA.

3. O meio de cultura MS básico suplementado com 30g L⁻¹, sem reguladores de crescimento, promove bom enraizamento do explantes.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo apoio financeiro na realização deste trabalho e pelas bolsas de pesquisa, concedidas aos professores: Lilia Willadino; Mário de Andrade Lira; Mércia Virgínia Ferreira dos Santos e Terezinha Câmara.

LITERATURA CITADA

- Brown, M.P.; Thorpe, T.A. Changes in water potential and its components during shoot formation in tobacco callus. *Physiologia plantarum*, Suécia, v. 49, p. 83-87, 1980.
- Escobar, A.; Villalobos, A.; Villegas M.A. *Opuntia* micropopagation by axillary proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Berlin, v. 7, p.269-277, 1986.
- Llamoca - Zárate, R.M. Cultura de tecidos e transformação genética da palma forrageira *Opuntia ficus-indica* Mill. Fortaleza, Universidade Federal do Ceará, 1999. 178p. Tese Doutorado.
- Llamoca - Zarate, R.M.; Landsann, J.; Campos. Isolation and culture of protoplasts from cell suspensions of cactus pears (*Opuntia ficus-indica* Mill.). In International Congress on Cactus Pear and Cochineal. V, 2006, Chapingo, Mexico F.A.P. Acta Hort. (ISHS) 728:93-96 http://www.actahort.org/books/728/728_11.htm
- Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plant.*, v. 15, p. 473-497, 1962.
- Nobel, P.S. *Biologia Ambiental, Agroecologia, Cultivo e Utilizações da Palma Forrageira*, In: Iglese, P. Barbera, G. Barrios, E.P. (Ed.) *Agroecologia, Cultivo e Utilizações da Palma Forrageira*, Roma, FAO 1999. p. 36-48. Co-editado pelo Sebrae-PB, João Pessoa, 2001.
- Santos, D.C. dos; Farias, I. Lira, M. de A. Santos, M. V. F. dos; Arruda, G. P de; Coelho, R. S. B; Dias, F. M.; Melo, J. N de: Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia e Nopalea*) em Pernambuco. Recife, IPA, (IPA- Documento 30), 48p.2006.
- Skoog, F. Miller, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultered in vitro. *Symposium of Society for experimental biology*, v.11; p. 118-131, 1957.
- Trigiano, R.N.; Gray, D.J. *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises*. United Sates of America, 2 ed. P. 454, 2000.
- Vasconcelos, A. G. V. de; Lira, M. de A. Cavalcanti, V.A.L.B. , Santos, M.V.F. dos. Seleção de clones de palma forrageira resistente à cochonilha do carmim (*Dactylopius* sp.) In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 39, 2002, Recife. Anais... Recife: Sociedade Brasileira de Zootecnia/UFRPE, 2002.CD Rom.
- Villalobos, A.; Mejía Munoz, J.M.; Escobar, H.A. Micropropagação de *Opuntia* y agave. In: *Cultivo de tejidos em la agricultura*. p. 643-650, 1995.
- Villalobos, V.M.A. Aplicação do cultivo de tecidos para a micropropagação de *Opuntias*, In: Iglese, P. Barbera, G. Barrios, E.P. (Ed.) *Agroecologia, Cultivo e Utilizações da Palma Forrageira*, Roma, FAO 1999. p. 72-74. Co-editado pelo Sebrae, PB, João Pessoa, 2001.