

Efeitos do BAP e do AIA na indução e no crescimento *in vitro* de brotos de dez clones de palma forrageira¹

Effects of BAP and IAA on *in vitro* shoot initiation and growth of ten clones of palm grass

Hamilton Melo Frota², Maria Socorro de Souza Carneiro³, Rômulo Marino Llamoca Zárate⁴,
Francisco de Assis Paiva Campos⁵, Márcio José Alves Peixoto⁶

RESUMO

A palma forrageira - *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill, é uma cactácea exótica, natural do México, adaptada às condições áridas e semi-áridas do Nordeste brasileiro. A pesquisa foi conduzida nos Departamentos de Bioquímica e Biologia Molecular, e Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, com o objetivo de determinar protocolos para indução e crescimento *in vitro* de brotos dessa espécie. Os explantes dos dez clones de palma forrageira foram inoculados em meio de cultura com sais e vitaminas MS, suplementado com 5% de sacarose, 0,8% de ágar e pH 5,85. No primeiro experimento, para a indução de brotos, gemas axilares de cladódios jovens foram inoculados no meio de cultura completo, contendo diferentes combinações de concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e de ácido indolacético (AIA). O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso em um arranjo fatorial de 10 x 5 com três repetições. No segundo experimento, o crescimento dos brotos foi induzido através da inoculação em meio de cultura completo adicionado de diferentes combinações de BAP e AIA. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso em um arranjo fatorial de 10 x 3 com três repetições. Concluiu-se que os melhores protocolos para indução e crescimento de brotos foram, respectivamente: BAP 2,00 mg/L + AIA 0,25 mg/L e BAP 0,50mg/L + AIA 0,25 mg/L.

Termos para indexação: Broto, cladódio, explante, *Opuntia ficus-indica*, meio de cultura, protocolo.

ABSTRACT

Palm grass - *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. is an exotic cactaceae originated from Mexico and well adapted to the arid and semi-arid conditions of the northeast of Brazil. The study was carried out at Universidade Federal do Ceará, Biochemistry-Molecular Biology and Animal Science departments, and aimed to establish protocols for *in vitro* initiation and growth of palm grass shoots. The excised explants of ten clones of palm grass were placed into a media containing salts and vitamins MS, supplied with 5% sucrose and 0.8% agar. The final pH was 5.85. In the first experiment, shoot initiation, axillary buds of young cladodios were placed into a media containing different combinations of 6-benzylaminopurine (BAP) and Indol-3-acetic acid (IAA) concentrations. The experiment was designed as a 10 X 5 factorial, with three replications, in a randomized system. In the second experiment, shoot growth was induced by placing the shoots into a media supplied with different combinations of BAP and IAA. The experiment was designed as a 10 X 3 factorial, with three replications, in a randomized system. The results show that BAP 2,00 mg/L + IAA 0,25 mg/L and BAP 0,50mg/L + IAA 0,25 mg/L are, respectively, the best concentrations for *in vitro* initiation and growth of palm grass shoot.

Index terms: Shoot, cladodio, explante, culture media, *Opuntia ficus-indica*, protocol.

¹ Recebido para publicação em 14/08/2003. Aprovado em 17/05/2004. Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor.

² Mestre em Zootecnia, Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará - CEP 60335-970.

³ Profª Dra., Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará.

⁴ Prof. Dr., Departamento de Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba.

⁵ Prof. Dr., Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

⁶ Mestrando em Zootecnia, Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará.

Introdução

A maior diversidade do gênero *Opuntia* encontra-se no México, conhecida por figueira-da-índia e pão-de-pobre (Tapia, 1983), faz parte do folclore e da mesa dos mexicanos, juntamente com o milho, o feijão e a batata.

A pecuária nas regiões áridas e semi-áridas do mundo, inclusive na região Nordeste do Brasil, tem como principal problema a alimentação. A escassez de pastagem nativa e o mau manejo de gramíneas na época de estiagem deixam os animais debilitados e susceptíveis às doenças. O clima semi-árido do Nordeste brasileiro favorece o desenvolvimento da palma forrageira, alimento de alto valor energético, rico em água e sais minerais com participação em até 40% de matéria seca na dieta de bovinos (Santos et al., 1997).

A palma forrageira é propagada por sementes, mudas, enxertia e estaquia (Krulik, 1980). A reprodução por sementes resulta em segregação genética, longa fase juvenil, diminuição na velocidade de crescimento das plantas (Mondragon-Jacobo e Pimienta-Barrios, 1995; Llamoca-Zárate et al., 1999) e as sementes apresentam baixo potencial de germinação.

Para solucionar esses problemas as forrageiras têm sido geneticamente melhoradas através das técnicas de cultura de tecidos (Spangenberg, 2001). No decorrer dos últimos quinze anos, foram desenvolvidas técnicas de cultivo *in vitro* para mais de mil espécies, incluindo as de *cactáceas*. As *Opuntias* se multiplicam por estacas dos cladódios demandando um grande número de propágulos, o que acarreta um sério problema por exigirem grandes áreas para o seu cultivo. Por essa razão, lançou-se mão da técnica de cultivo de tecido para se obter um sistema eficiente de multiplicação em grande escala (Villalobos, 2001). Desta forma, objetivou-se determinar protocolos para indução e crescimento *in vitro* de brotos de dez clones da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill).

Material e Métodos

O experimento foi conduzido nos Departamentos de Zootecnia e, Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. Os dez clones (C14, C19, C33, C34, C43, C44, C61, C63, C64 e C81) da espécie *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill, cedi-

dos pela Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, em Arco Verde, Pernambuco, foram plantados em vasos plásticos com capacidade para 20 L, contendo areia e adubo orgânico na proporção de 1:1, e acondicionados em casa de vegetação. O trabalho foi conduzido em duas etapas: indução e crescimento dos brotos. Em cada experimento foi utilizado o meio de cultura completo MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 5% de sacarose, 0,8% de ágar e pH 5,85. A esse meio de cultura foram adicionados diferentes combinações de concentrações dos reguladores de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido indolacético (AIA). Tanto no experimento I quanto no experimento II os explantes foram mantidos sob as mesmas condições da câmara de crescimento.

Experimento I - Indução de brotos: Para indução de brotos foram coletados cladódios jovens de dez clones de palma forrageira mantidos em casa de vegetação, com tamanhos variando entre 8-12 cm. No laboratório, foram descontaminados pela primeira vez com água corrente e sabão líquido neutro, constando de três lavagens com duração de três minutos no intuito de se reduzir a contaminação superficial. Em seguida, os cladódios foram levados para a câmara de fluxo laminar, onde foi feita a assepsia em uma solução de hipoclorito de sódio a 2% e água destilada autoclavada. Nesta solução, os cladódios foram imersos durante três minutos sob constante agitação, depois lavados com água destilada autoclavada para retirar o excesso de hipoclorito, seccionados transversalmente e acondicionados em placas de Petri. A seguir, foram cortados retirando-se os explantes na forma de retângulo, com aproximadamente 0,50-0,80 cm² contendo as aréolas (meristema mais gema axilar). Cada cladódio jovem deu origem a 50 explantes que foram distribuídos individualmente em cada tubo de ensaio contendo 10 mL dos meios de cultura de acordo com os tratamentos: BAP 0,00 mg/L + AIA 0,00 mg/L; BAP 2,00 mg/L + AIA 0,00 mg/L; BAP 2,00 mg/L + AIA 0,10 mg/L; BAP 2,00 mg/L + AIA 0,25 mg/L e BAP 2,00 mg/L + AIA 0,50 mg/L. Após a inoculação foram mantidos em câmara de crescimento, onde ficaram por 15 a 18 dias. Após esse período, os explantes foram transferidos para novo meio de brotação (idêntico ao meio de cultura inicial) devido ao excesso de calo, ou oxidação dos tecidos, ou suberização dos ferimentos, retornando à câmara de crescimento por mais 12 a 15 dias. Durante os 30 dias esses per-

maneceram em uma temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e um 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 10×5 com três repetições, onde foram estudados dez clones de palma forrageira e cinco meios de cultura. A unidade experimental constou de dez explantes acondicionados em dez tubos de ensaio. Durante o experimento, foram observados e anotados os resultados semanais de brotação de cada tratamento.

Experimento II - Crescimento de brotos: Os brotos oriundos do experimento I foram levados para câmara de fluxo laminar em condições assépticas, colocados em uma placa de Petri estéril e seccionados transversalmente na base para a retirada de calo ou oxidação dos tecidos. Para este experimento foram necessários 90 brotos-explantes selecionados por tamanho (0,2-1,5 cm). A seguir, foram inoculados individualmente em cada tubo de ensaio contendo os meios de cultura. Os tratamentos para indução do crescimento de brotos dos dez clones de palma forrageira foram realizados através de três combinações de reguladores de crescimento: BAP 0,50 mg/L + AIA 0,10 mg/L; BAP 0,50 mg/L + AIA 0,25 mg/L e BAP 0,50 mg/L + AIA 0,50 mg/L. Em seguida foram incubados na câmara de crescimento, onde ficaram por quatro semanas. Nesse período permaneceram em uma temperatura de

$28 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $25,3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. O delineamento experimental foi o inteiramente ao acaso em arranjo fatorial de 10×3 com três repetições, estudando-se dez clones de palma forrageira e três meios de cultura, com unidade experimental constando de um broto. Durante a incubação foram observados e anotados o crescimento em centímetros dos brotos de cada tratamento.

Resultados e Discussão

Experimento I – Indução de brotos: Verificou-se diferença significativa, ao nível de 5% pelo teste de Tukey, quanto à brotação entre clones e entre meios de culturas, não havendo significância ($P > 0,05$) na interação clone versus meio de cultura (Tabela 1).

O meio de cultura utilizado com BAP e AIA nas concentrações de 2,00 e 0,25 mg/L, respectivamente, favoreceu a indução de brotos nos explantes dos dez clones de palma forrageira estudados. Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre a porcentagem média de brotação quando o meio de cultura foi suplementado com BAP 2,00 mg/L + AIA 0,00 mg/L e BAP 2,00 mg/L + AIA 0,50 mg/L. Quando se utilizou o meio de cultura completo, suplementado

Tabela 1 – Percentagem média de brotação *in vitro* de dez clones de palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.), 30 dias após inoculação no meio de cultura.

Clone	Meio de cultura					Média
	BAP ^{0,00} mg/L	BAP ^{2,00} mg/L	BAP ^{2,00} mg/L	BAP ^{2,00} mg/L	BAP ^{2,00} mg/L	
	+ AIA ^{0,00} mg/L	+ AIA ^{0,00} mg/L	+ AIA ^{0,10} mg/L	+ AIA ^{0,25} mg/L	+ AIA ^{0,50} mg/L	
C14	00	70	87	97	67	64 ^{ABC*}
C19	00	80	87	97	83	69 ^{AB}
C33	10	87	93	93	83	73 ^A
C34	07	57	87	100	73	65 ^{ABC}
C43	00	73	77	80	70	60 ^{ABC}
C44	00	77	83	97	83	68 ^{ABC}
C61	00	63	73	77	60	55 ^{CD}
C63	00	50	77	90	67	57 ^{BCD}
C64	00	43	80	90	63	55 ^{BCD}
C81	00	50	60	70	37	43 ^D
Média	02 ^d	65 ^c	80 ^b	89 ^a	69 ^c	-

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula (na coluna) e minúscula (na linha) não diferem entre clones e concentrações de reguladores, respectivamente, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

com BAP 2,00 mg/L + AIA 0,10 mg/L o percentual médio de brotação foi superior ($P < 0,05$) aos verificados nos tratamentos BAP 2,00 mg/L + AIA 0,50 mg/L, BAP 2,00 mg/L + AIA 0,00 mg/L e BAP 0,00 mg/L + AIA 0,00 mg/L.

Esses resultados corroboram com os relatos de Llamoca-Zárate et al. (1999) que inocularam brotos de palma forrageira cv. Gigante utilizando o meio de cultura MS idêntico ao desta pesquisa. Verificou-se que o meio de cultura desprovido de BAP proporcionou pouco ou nenhuma brotação, concordando com as descrições de Pinto et al. (1994) e, que pode ser atribuído à presença de concentrações endógenas de citocininas nos explantes (Arellano e Pinto, 1993).

Verificando os resultados obtidos entre clones a maior média obtida foi no clone 33, com 73% de brotação, não diferindo estatisticamente ($P > 0,05$) dos clones C14, C19, C34, C43, e C44 com 64%, 69%, 65%, 60% e 68%, respectivamente. O clone C81 foi o que menos respondeu aos tratamentos, com brotação média de 43%, sendo estatisticamente semelhante ($P > 0,05$) aos clones C61, C63 e C64 com 55%, 57% e 55%, respectivamente.

Experimento II – Crescimento de brotos:

Houve diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey quanto ao crescimento, quando analisou-se os clones, os meios de cultura e a interação clones versus tratamentos (Tabela 2).

O meio de cultura constituído da mistura basal de sais e vitaminas MS completo, suplementado com BAP 0,50 mg/L + AIA 0,25 mg/L, favoreceu o crescimento de brotos para os clones de palma forrageira estudados, embora apenas valores obtidos para os clones C14, C34 e C81 tenham diferido estatisticamente, quando comparados com o desempenho nos outros dois meios de cultura testados. Como pode ser observado na Tabela 2, quanto ao crescimento médio os clones C19, C33, C43, C44, C61, C63 e C64 não apresentaram diferença estatística entre os três meios de cultura testados. Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre os clones quando se utilizou o meio de cultura com BAP 0,50 mg/L + AIA 0,10 mg/L. Os clones C14, C34 e C81 com 1,46 cm, 1,43 cm e 1,39 cm, respectivamente, mostraram melhor desempenho ($P < 0,05$) quando o meio de cultura foi suplementado com BAP 0,50 mg/L + AIA 0,25 mg/L em relação aos demais tratamentos. Quando se utilizou o meio de cultura adicionado com BAP 0,50 mg/L + AIA 0,50 mg/L, os clones

C14, C34, C43, C63 e C81 apresentaram menor crescimento ($P < 0,05$) que o clone C64.

Tabela 2 – Crescimento médio (cm) de brotos *in vitro* de dez clones da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.), 30 dias após inoculação no meio de cultura.

Clone	Meio de cultura		
	BAP ^{0,50} mg/L + AIA ^{0,10} mg/L	BAP ^{0,50} mg/L + AIA ^{0,25} mg/L	BAP ^{0,50} mg/L + AIA ^{0,50} mg/L
C14	0,31 ^{Ab*}	1,46 ^{Aa}	0,33 ^{Bb*}
C19	0,89 ^{Aa}	1,08 ^{ABa}	0,86 ^{ABa}
C33	0,89 ^{Aa}	0,97 ^{ABa}	0,74 ^{ABa}
C34	0,23 ^{Ab}	1,43 ^{Aa}	0,20 ^{Bb}
C43	0,27 ^{Aa}	0,50 ^{Ba}	0,26 ^{Ba}
C44	0,49 ^{Aa}	0,68 ^{ABa}	0,62 ^{ABa}
C61	0,99 ^{Aa}	1,36 ^{Aa}	0,77 ^{ABa}
C63	0,28 ^{Aa}	0,95 ^{ABa}	0,26 ^{Ba}
C64	0,53 ^{Aa}	1,01 ^{ABa}	1,52 ^{Aa}
C81	0,22 ^{Ab}	1,39 ^{Aa}	0,30 ^{Bb}

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula (na coluna) e minúscula (na linha) não diferem entre clones e concentrações de reguladores, respectivamente, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Esses resultados são semelhantes aos de Llamoca-Zárate et al. (1999) quando pesquisaram o crescimento de brotos da palma forrageira cv. Gigante utilizando as mesmas concentrações de BAP e AIA. Mohamed-Yasseen et al. (1995) obtiveram melhores resultados para o crescimento e desenvolvimento *in vitro* de uma cactácea, cultivar não descrita, ao suplementar o meio de cultura completo com BAP 2,00 mg/L + Ácido naftalenoacético 0,10 mg/L.

Conclusões

A maior percentagem média de indução de brotos foi obtida com a combinação de BAP 2,00 mg/L + AIA 0,25 mg/L, tendo como destaque o clone C34, que apresentou 100% de brotação.

Os resultados obtidos na combinação de BAP 0,50 mg/L + AIA 0,25 mg/L foram numericamente superiores aos registrados nas demais combinações testadas, exceto para o clone C64.

Referências Bibliográficas

- ARELLO, E. F.; PINTO, J. E. B. P. Propagação *in vitro* de *Killmeyera coriacea* I. Efeito das diversas concentrações combinadas de benzilaminopurina e ácido naftalenoacético na multiplicação de brotos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.28, n.1, p.23-31, 1993.
- KRULIK, G. Tissue culture of succulent plants. **Natural Cactus Succulent Journal**. v.35, p.14-17, 1980.
- LLAMOCA-ZÁRATE, R. M.; AGUJAR, L. F.; LANDSMANN, J.; CAMPOS, F. A .P. Whole Plant regeneration from the shoot apical meristem of *Opuntia ficus-indica* Mill.(*Cactaceae*). **Journal of Applied Botany-Angewandte Botanik**. v.73, p.83-85, 1999.
- MOHAMED-YASSEEN, Y.; BARRINGER, S. A.; SPLITTSTOESSER, E.; SCHNELL, R. J. Rapid propagation of tuna (*Opuntia ficus-indica*) and plant establishment in soil. **Pant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.42, p.117-119, 1995.
- MONDRAGON-JACOBO, C.; PIMIENTA-BARRIOS, E. Propagation of the cactus-pear. In: BARBERA, G.; INGLESE, P.; PIMIENTA-BARRIOS, E.; ARIASJIMÉNEZ, E. (Eds). **Agro-Ecology, Cultivation and Uses of Cactus Pear**. Roma: *FAO Plant Production and Protection*, 1995. Paper 132, p. 64-70.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-497, 1962.
- PINTO, J. E. B. P.; ARELLO, E. F.; PINTO, C. A. B. P.; BARBOSA, M. H. P. Uso de diferentes explantes e concentrações de Benzilaminopurina na multiplicação *in vitro* de brotos de *Killmeyera coriacea*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.6, p.867-873, 1994.
- SANTOS, D. C.; FARIAS, I.; LIRA, M. de A.; TAVARES FILHO, J. J.; SANTOS, M. V. F. 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-PE. Instruções Técnicas do IPA. Documento n.25, 1997, 23p.
- SPANGEMBERG, G. Progress in biotechnology of forage species: transgenics and genomics in molecular breeding of forage plants. (Conference) In: REDBIO – 2001, IV ENCONTRO LATINOAMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 4., Goiânia, **Anais...** Goiânia:BRASIL. 2001. p.23.
- TAPIA, C. C. **Cultivo da Palma Forrageira e Figo-da-Índia**. EMPARN – Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte S/A, vinculada a Secretaria de Agricultura. Boletim Técnico n.14, 1983. 41p.
- VILLALOBOS, V. M. A. Aplicação do cultivo de tecidos para a micropropagação de *Opuntia* sp. In: **Agroecologia, Cultivo e Usos da Palma Forrageira**, 132, SEBRAE/PB, 2001. p.72-78.