

ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLOS PARA A MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE PALMA FORRAGEIRA [*OPUNTIA FICUS-INDICA* (L.) MILL]

Greiciele Vitor Santos da Paz¹ e Daniela Garcia Silveira²

1. Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: vitor.greiciele@gmail.com
2. Orientadora, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: danielags@ig.com.br

PALAVRAS CHAVE: Cultura de tecidos, micropropagação, produção de mudas.

INTRODUÇÃO

A palma forrageira [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill], pertencente à família Cactaceae e subfamília Opuntioideae é a uma espécie xerófila com grande potencial de exploração na Caatinga brasileira, constituindo-se em importante recurso forrageiro nos períodos de estiagens podendo ser utilizada também na alimentação humana. Essa espécie destaca-se por apresentar um alto valor nutritivo, além de ser bastante rústica e resistente à seca, com elevada eficiência do uso de água e amplamente incorporada ao processo produtivo da região (Araújo Filho, 1977). Além disso, é uma planta de enorme potencial produtivo e de múltiplas utilidades, podendo ser utilizada na produção de medicamentos, cosméticos e corantes e na conservação e recuperação de solos. Todavia, o que se tem verificado como limitante nessa espécie é o baixo consumo de matéria seca pelo animal, devido ao elevado conteúdo de água que possui essa forrageira (Farias et al., 1984), além de possuir baixo teor de proteína bruta (5,6 %) (Santos et al., 1990).

Com a finalidade de aumentar a qualidade dessa forragem elevando a quantidade de proteínas e diminuindo a quantidade de fibras foi implantado um Programa de Melhoramento Genético da Palma na Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) para selecionar os melhores clones com alto teor de proteína. Para isso, melhorias na eficiência de programas de melhoramento genético de palma podem ser conseguidas mediante o uso de técnicas biotecnológicas, especialmente aquelas baseadas no cultivo de tecidos *in vitro* e na transformação genética. A micropropagação é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e aquela de maior impacto (Grattapaglia & Machado, 1998), pois possibilita a obtenção rápida de um grande número de plantas livres de doenças, em um curto espaço de tempo, com alta taxa de variabilidade genética, sendo importante para plantas que não podem ser melhoradas por métodos convencionais.

Devido à grande importância da palma para as regiões semi-áridas do Brasil, a otimização do protocolo de estabelecimento *in vitro* dessa forrageira é necessária para iniciar a micropropagação, pois possibilitará a rápida obtenção de genótipos melhorados que garantam o suprimento nutricional adequado para a alimentação dos rebanhos e contribuirá a longo prazo para o desenvolvimento sustentável do Nordeste brasileiro. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo estabelecer protocolo eficiente para a multiplicação *in vitro* de clones de Palma, para posterior utilização na produção de mudas em larga escala.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram instalados quatro experimentos visando ajustar um protocolo para o estabelecimento *in vitro* de palma. Nos dois primeiros experimentos foram utilizados cladódios jovens dos clones V-22 e V-28. Esses foram lavados em água corrente e detergente, e foram desinfestados após imersão em álcool 70 % por 1 minuto, seguido de solução de hipoclorito de sódio (NaOCl - 2,5% de cloro ativo) com duas gotas de detergente neutro por 15 minutos e lavados em água destilada autoclavada. Após a desinfestação, os cladódios

foram seccionados em forma de retângulo contendo uma auréola por explante. Para o experimento 1 inoculou-se os explantes em tubos de ensaio contendo meio MS, suplementado com 3% de sacarose e solidificado com 0,7% de ágar, contendo diferentes combinações de concentrações de 6-benzilaminopurina - BAP (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg.L⁻¹) e Ácido indolacético - AIA (0,1 e 0,25 mg.L⁻¹). Já para o experimento 2 utilizou-se diferentes combinações de concentrações de BAP (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg.L⁻¹) e ANA (0,1 e 0,25 mg.L⁻¹). Para ambos o delineamento experimental foi inteiramente casualizado num arranjo fatorial 2 x 2 x 4, com 15 repetições por tratamento. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 26 ± 3°C, fotoperíodo de 16h e irradiância de fótons de 40µmol m⁻² s⁻¹. Aos 45 dias avaliou-se a taxa de contaminação, taxa de explantes sem desenvolvimento e de explantes responsivos com brotações.

No experimento 3 utilizou-se cladódios jovens dos clones V-11 e V-21 que foram desinfestados em álcool 70 % por 2 minutos, seguido de solução de hipoclorito de sódio (NaOCL – 2.5% de cloro ativo) com 10 gotas/L de detergente neutro por 10 minutos e em água estéril. Após desinfestação, os cladódios foram seccionados nas mesmas condições do experimento anterior e os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio MS, suplementado com 3% de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de mio-Inositol e solidificado com 0,7% de ágar, acrescido de diferentes concentrações de BAP (1,0; 1,5 e 2,0 mg.L⁻¹) e AIA (0,0 e 0,1 mg.L⁻¹). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado num arranjo fatorial 2 x 3 x 2, com 12 repetições por tratamento. O experimento foi mantido nas mesmas condições citadas anteriormente para os experimentos 1 e 2. Após 45 dias os explantes foram avaliados.

Para tentar controlar a contaminação instalou-se o experimento 4 utilizando cladódios do clone V-22, que teve os tratamentos: 1. imersão em álcool 70% por 1 minuto e em hipoclorito de sódio - NaOCL - por 10 minutos, 2. imersão em álcool 70% por 1 minuto seguido de solução de NaOCL por 20 minutos, 3. imersão em fungicida Derosal (2 ml. L⁻¹) por 15 minutos, seguida da imersão em álcool 70 % por 1 minuto e hipoclorito de sódio por 10 minutos, e 4. imersão em fungicida Derosal (2 ml. L⁻¹) por 20 minutos, seguida da imersão em álcool 70 % por 1 minuto e hipoclorito de sódio por 10 minutos. Após a desinfestação, lavou-se os explantes três vezes em água estéril e estes foram inoculados em tubos contendo dois tipos de meio (MS com 0,5 de BAP + 0,1 mg.L⁻¹ de AIA e MS com 1,0 de BAP + 0,1 mg.L⁻¹ de AIA) 0 g L⁻¹), nas mesmas condições dos experimentos citados acima. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado num arranjo fatorial 4 x 2 com 15 repetições por tratamento. Os explantes foram avaliados após 45 dias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados para os experimentos 1 e 2 não foram favoráveis, observou-se uma alta taxa de contaminação fúngica de até 90% em alguns tratamentos, como também uma alta taxa de explantes sem desenvolvimento para ambos os tratamentos (Figura 1A). Assim, os explantes que apresentaram brotações foram poucos e estes só foram encontrados no meio que continha 1,0 mg.L⁻¹ de BAP combinado com 0,1 mg.L⁻¹ de AIA (Figura 1B). Trabalho realizado por Vasconcelos et. al. (2007) que ao estudar a micropropagação *in vitro* da palma forrageira cv. Miúda (*Nopalea cochenilifera* - Salm Dyck) verificaram que a adição de 1,0 mg.L⁻¹ de BAP e 0,1 mg.L⁻¹ de AIA ao meio MS foi a mais promissora para o estabelecimento. Contudo, estes resultados divergem de Frota et al. (2004) quando estudaram os efeitos do BAP e do AIA na indução e crescimento de brotos de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Eles observaram que o melhor meio para a indução de brotos é aquele suplementado com BAP e AIA nas concentrações de 2,0 e 0,25 mg.L⁻¹, respectivamente. Reguladores de crescimento atuam em órgãos alvos específicos e potencializam sua ação quando em pequenas concentrações. Auxinas (AIA e ANA) e citocininas (BAP) são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura de tecidos. A contaminação da cultura

pode estar atrelada aos procedimentos realizados durante a inoculação como pode haver a contaminação endógena do material biológico.

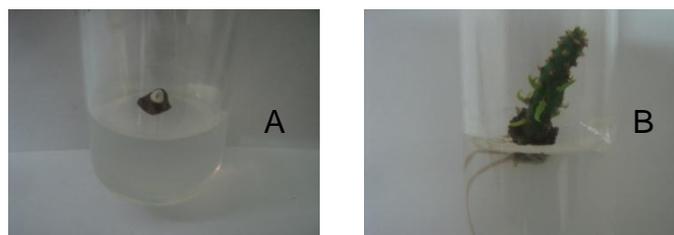


Figura 1. Explante de palma sem desenvolvimento (A), broto desenvolvido do explante de palma inoculado em meio MS com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP combinado com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA (B).

No experimento 3 houve 100 % de perda. Os explantes apresentaram alta taxa de oxidação e não houve formação de nenhuma brotação. Não houve nenhuma interação significativa pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade em relação às taxas de contaminação e oxidação, mas houve em relação aos tipos de clones. Verificou-se que a taxa de contaminação para o clone V-21 (Tabela 1) de palma apresentou o menor valor (16,67%) em relação ao clone V-11 que teve 31,94% de contaminação fúngica. Essa resposta esta possivelmente atrelada às características genéticas de cada variedade. Quanto à taxa de oxidação dos explantes foi observado que o clone V-21 (Tabela 1) apresentou uma maior porcentagem de explantes oxidados (83,33%) em relação ao clone V-11 com 68,05%. A oxidação ocorre em função da liberação de compostos fenólicos *in vitro*, precursores da síntese de lignina, pelo tecido injuriado. Esse acúmulo de polifenóis modifica a composição do meio de cultivo e a absorção de metabólitos (Andrade, 2000).

Tabela 1 - Valores médios para a taxa de contaminação e de oxidação dos explantes retirados de dois clones de palma forrageira após 45 dias de estabelecimento *in vitro* em diferentes meios de cultura.

| Clones | % Contaminação | % Oxidação |
|--------|----------------|------------|
| V-11 | 31,94 b | 68,05 a |
| V-21 | 16,57 a | 83,33 b |

Os índices elevados de contaminação dos experimentos supracitados demonstraram a necessidade do ajuste do protocolo de desinfestação, assim procurou-se controlar a mesma estabelecendo-se o experimento 4. Nesse experimento verificou-se que a taxa de contaminação fúngica dos explantes variou de 13,33 a 46,66% não apresentando diferença estatística entre os tratamentos. Os microrganismos contaminantes competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura, eliminando no meio metabólitos tóxicos, podendo ocasionar a morte dos explantes (Pereira et al., 2003). A taxa de explantes sem desenvolvimento foi muito alta, variando de 53,33 a 86,66%, apesar de não haver diferença significativa entre essas médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade na interação desinfestação e meios de cultura. Essa perda de vigor está associada com a produção de substâncias fenólicas ou a outros fatores como habituação ou maturidade dos explantes. Para a variável número médio de brotos os resultados das brotações foram muito baixos para todos os tratamentos variando de 0,00 a 0,20, não apresentando diferença estatística entre os tratamentos. Contudo, pode destacar que o maior valor das brotações foi obtida no tratamento formado pelo meio MS suplementado com $1,0 \text{ mg/L}$ BAP + $0,1 \text{ mg/L}$ AIA combinado com a desinfestação 1. A utilização do fungicida Derosal adicionado ao meio não foi eficiente em

nenhum dos tratamentos e parece ter interferido de modo irreversível no desenvolvimento dos explantes causando a morte dos mesmos. A concentração utilizada pode ter sido alta, prejudicando o desenvolvimento das auréolas.

Apesar dos resultados não favoráveis dos experimentos instalados, pode-se concluir que o estabelecimento *in vitro* de auréolas da palma forrageira foi mais promissor em meio MS suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP e 0,1 mg.L⁻¹ de AIA e que o método mais eficiente para a desinfestação foi aquele em que os cladódios ficaram imersos em álcool 70% por 1 minuto e em hipoclorito de sódio por 10 minutos e ainda que a utilização do fungicida Derosal não foi eficiente para controlar a contaminação das culturas na concentração utilizada.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estabelecimento *in vitro* da palma forrageira foi a maior dificuldade encontrada para dar andamento ao trabalho de micropropagação dos clones, tendo em vista à alta taxa de contaminação fúngica dos explantes, como também a baixa taxa dos explantes responsivos com formação de brotos. Além disso, os explantes utilizados devem ser retirados de cladódios jovens e esses não são encontrados em qualquer época do ano, dificultando ainda mais o andamento do trabalho. Medidas como cultivar os clones em casa de vegetação, como testar outros métodos de desinfestação, atrelados a adição de concentrações diferenciadas de reguladores de crescimento ao meio de cultura e verificar outras concentrações do fungicida derosal podem ser soluções para a resolução desses problemas.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M.W.; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S.; et al. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.1, p.174-180, 2000.
- ARAÚJO FILHO, J. A. Manejo de pastagens em regiões semi-áridas. In: Pasture Management Symposium, 4, 1977, Piracicaba. **Proceedings...** Piracicaba: USP-FEALQ, SP, Brazil, p.164-76. 1977.
- FARIAS, I.; FERNANDES, A. P. M.; LIMA, M. A.; SANTOS, D. C. FRANÇA, M. P.; Cultivo de palma forrageira em Pernambuco, Recife: **IPA**, 1984, 5p. (IPA Instruções Técnicas, 21).
- FROTA, H.M.; CARNEIRO, M.S.S.; LLAMOCA-ZÁRATE, R.M.; CAMPOS, F.A.P.; PÊIXOTO, M.J.A; Efeitos do BAP e do AIA na indução e no crescimento *in vitro* de brotos de dez clones de palma forrageira. **Revista Ciência Agronômica**, V. 35, Número Especial, out., p. 279 – 283, 2004.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa CNPH, 1998. v.1, p. 183-260.
- PEREIRA, E.; MATTOS, M.; FORTES, G. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes e explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.38, p. 827-834, 2003.
- SANTOS, M. V. F. dos et al. Número, dimensões e composição química de artículos de palma forrageira (*Opuntia ficus indica* Mill) cv. Gigante, de diferentes ordens. **Revista Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, Recife, v. 7, p. 69-79, 1990. Edição especial.
- VASCONCELOS, A.G.V. de; LIRA, A.M. de; CAVALCANTE, V.A.L.B; SANTOS, M.V.F.dos; CÂMARA, t.; WILLADINO, L. Micropropagação de palma forrageira cv. Miúda (*Nopalea cochenilifera* - Salm Dyck). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.2, n.1, p. 28-31, 2007.