



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO  
UNIDADE ACADÊMICA DE TECNOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO  
CURSO ENGENHARIA DE BIOSISTEMAS**

**JÉSSICA GOMES FONTES**

**MICROPROPAGAÇÃO E ENRAIZAMENTO DE GENÓTIPOS DE PALMA  
FORRAGEIRA RESISTENTES À COCHONILHA-DO-CARMIM**

**SUMÉ - PB  
OUTUBRO - 2014**

**JÉSSICA GOMES FONTES**

**MICROPROPAGAÇÃO E ENRAIZAMENTO DE GENÓTIPOS DE PALMA  
FORRAGEIRA RESISTENTES À COCHONILHA-DO-CARMIM**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Engenharia de Biosistemas do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biosistemas.

**Orientador: Prof. Dr. Humberto Actis Zaidan**

**Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Julita Maria Frota Chagas Carvalho**

**SUMÉ - PB  
OUTUBRO – 2014**

F682m Fontes, Jéssica Gomes.

Micropropagação e enraizamento de genótipos de palma forrageira resistentes à cochonilha-do-carmim. / Jéssica Gomes Fontes. - Sumé - PB: [s.n], 2014.

57 f.

Orientador: Professor Dr. Humberto Actis Zaidan;  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Julita Maria Frota Chagas Carvalho.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande;  
Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Bacharel em Engenharia de Biosistemas.

1. Palma - Cultivo. 2. Cochonilha-do-carmim. 3. Inimigos naturais. I. Título.

CDU: 633.2

(043.3)

**JÉSSICA GOMES FONTES**

**MICROPROPAGAÇÃO E ENRAIZAMENTO DE GENÓTIPOS DE PALMA  
FORRAGEIRA RESISTENTES À COCHONILHA-DO-CARMIM**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Engenharia de Biosistemas, do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biosistemas.

Aprovada em 17 de outubro de 2014.

Banca examinadora:



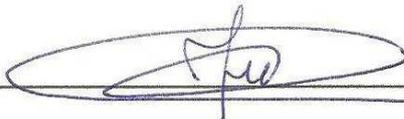
---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Magnólia de Araújo Campos  
(D.Sc., Ciências Biológicas – Biologia Molecular) – UFCG – Campus Cuité  
Examinadora



---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Carina Seixas Maia Dornelas  
(D.Sc. Agronomia – Sementes) – UFCG - Campus Sumé  
Examinadora



---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Julita Maria Frota Chagas Carvalho  
(D.Sc., Recursos Fitogenéticos) – Embrapa Algodão – Campina Grande  
Coorientadora



---

Prof. Dr. Humberto Actis Zaidan  
(D.Sc., Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas) – UFCG - Campus Sumé  
Orientador

*Aos meus pais, Maria e Alberóni  
por todo o amor, carinho,  
dedicação e incentivo recebido  
durante a minha caminhada.*

**Dedico**

*“Sonho que se sonha só, é só um sonho que se sonha só, mas sonho que se sonha junto é realidade.”*

**Raul Seixas**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar força, saúde e coragem para superar os obstáculos enfrentados na minha caminhada. Por nunca permitir que desistisse, obrigada!

Aos meus pais, Maria e Alberóni, por todo o esforço, incentivo, amor, carinho, e todo o suporte que me deram na minha trajetória em Sumé, por compreender as minhas ausências nos momentos importantes, por sempre estarem ao meu lado. Também aos meus irmãos Jerceanne, Jeyffeson e Natielly, por acreditarem em mim. Vocês são a minha fortaleza, a minha base, o meu maior exemplo, foi por vocês que lutei pra chegar até aqui. Sem vocês nada disso teria acontecido. Aos meus avôs, tios, primos. Amo vocês!

À Felype (meu noivo), que pacientemente sempre me dando conselhos, carinho, amor, incentivo. Obrigada, por estar ao meu lado, e suportar meus momentos de estresses.

Ao professor Humberto, pela amizade, compreensão e paciência em me lapidar. A minha coorientadora Dra. Julita, por ter me recebido tão bem no laboratório, pela confiança, por me ensinar pacientemente. Vocês são meus Mestres, admiro-os muito. Sou muito grata por todos os seus ensinamentos, obrigada!

Aos meus amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais: Oton, Ákylla, Raquel, Flávia e Claudiane. Em especial, a Taíza pela amizade, ensinamentos e conselhos. Aos laboratoristas da Embrapa Algodão, Dione Márcia de Souza Silva e Sr. Amaro Matias de Oliveira, pela ajuda nos trabalhos do laboratório.

Ao Dr. José Wellington dos Santos, pesquisador da Embrapa Algodão, pela realização das análises estatísticas, o que foi de suma importância para este trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Magnólia, pelo auxílio no desenvolvimento do projeto.

A todos os meus colegas do curso de Engenharia de Biosistemas, que durante esses cinco anos enfrentaram com muita garra todas as barreiras que apareciam em nossa frente. Especialmente, a Jaricélia, Leandro, Biancca, Diorgénes, Orlândia, Carlos, Jailton, Iralécio, Albetânea, Sílvia, Thiago, Euclides, Elson, Eliton, Mariana que direta ou indiretamente ajudaram na minha trajetória.

Às minhas amigas e companheiras de curso, Mayara, Jordanna, Karlla, juntas dividimos tristezas, alegrias, conquistas e derrotas. Vocês foram a minha segunda família, minhas irmãs, agradeço de coração, cada abraço, palavras de apoio, ensinamentos, broncas, risadas. Só mais um passo e estamos formadas, nós conseguimos. Sou muito grata pela amizade de vocês!

Às minhas amigas de longa data Luana, Lucivânia, Malu, Érica que apesar da distância são as minhas boas e velhas amigas. Em especial a minha amiga Danielle, por me acolher em sua casa quando precisei em Campina Grande, pelas conversas, conselhos, ensinamentos, palhaçadas, por me ajudar quando preciso nas ferramentas do Word.

Ao tio Jaime e D. Irene, que me acolheu nos momentos que precisei em sua residência, para que eu pudesse dar continuidade ao meu trabalho.

A todos os meus professores CDSA/UFCG que contribuíram e enriqueceram meus conhecimentos em toda minha vida acadêmica.

Ao programa CNPq/PIBIC/UFCG pela concessão da bolsa de iniciação científica Pibic.

À Embrapa Algodão e a Dra. Julita por terem disponibilizado o uso do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais.

Ao professor Augusto Jorge Neto (Escola Agrícola de Sumé - EAS), pela colaboração nas fases de aclimatização no viveiro e desenvolvimento das mudas no campo.

Ao Sr. José Bráulio Japiassú (CDSA/UFCG), pelo fornecimento de raquetes da palma forrageira Orelha de Elefante Mexicana, que foi de suma importância para realização deste trabalho.

Aos funcionários do viveiro do CDSA, pela ajuda na fase de aclimatização das plântulas e plantio no campo.

Agradeço a todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para que chegasse até aqui. Vocês mostraram que eu sou capaz. Muito obrigada!

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	01
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. OBJETIVO GERAL.....	03
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
3.1 Cultura de tecidos vegetais.....	03
3.2 Palma forrageira.....	04
3.3 Cochonilha-do-carmim.....	07
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	08
CAPÍTULO 2: MICROPROPAGAÇÃO DE GENÓTIPOS DE PALMA FORRAGEIRA RESISTENTES À COCHONILHA-DO-CARMIM .....	13
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21

4. CONCLUSÃO.....	25
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
CAPÍTULO 3: ENRAIZAMENTO <i>EX VITRO</i> E ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS <i>IN VITRO</i> DE PALMA FORRAGEIRA RESISTENTE À COCHONILHA-DO-CARMIM.....	28
RESUMO.....	28
ABSTRACT.....	29
1. INTRODUÇÃO.....	30
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4. CONCLUSÃO.....	38
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
ANEXOS.....	41
CAPÍTULO 2	
ANEXO I - Análise de variância referente às variáveis: Altura de Brotos (AB) e Número de Brotos (NB), em resposta aos fatores de variação (FV): Genótipo (G), Sacarose (S), BAP (B) e suas interações.....	41
CAPÍTULO 3	
ANEXO I - Análise de variância referente às variáveis: Número de Brotos (NB) e média da Altura da Parte Aérea da Plântula (mAPA), em resposta aos tratamentos: meios MSB1 (4,44 $\mu$ M BAP + 0,54 $\mu$ M ANA), MSB2 (4,44 $\mu$ M BAP + 0,57 $\mu$ M AIA) e MSB3 (4,44 $\mu$ M BAP + 0,49 $\mu$ M AIB).....	41
ANEXO II - Análise de variância referente às variáveis: Comprimento da Maior Raiz (CMR), média da Altura da Parte Aérea da Plântula (mAPA) e Peso da Plântula (PP), em resposta aos tratamentos: a) imersão em água (Controle); b) imersão em 5,71 $\mu$ M AIA; c) imersão em 4,90 $\mu$ M AIB.....	42

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>FIGURA 1</b> - (A) Plantio no campo; (B) Flor; (C) Fruto e (D) Sementes, da palma forrageira genótipo Miúda, no Campo Experimental do CDSA/UFCG, Sumé - PB, 2014 .....	7
<b>FIGURA 2</b> - Palma forrageira do genótipo Orelha de Elefante Mexicana .....	7
<b>FIGURA 3</b> - Plantação de genótipos micropropagados de palma forrageira resistentes à cochonilha-do-carmim, no Campo Experimental do CDSA/UFCG, Sumé - PB, 2014 .....	8
<b>FIGURA 4</b> - (A) Colônias de cochonilha-do-carmim; (B) Corante carmim de cochonilha.....	8
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>FIGURA 1</b> - (A) Coleta em campo de cladódios jovens de palma forrageira resistentes à cochonilha-do-carmim, (B) Cladódios de palma forrageira com tamanhos variando de 8,0-12,0 cm, (C) Gemas axilares isoladas com aproximadamente 5 mm <sup>3</sup> , (D) Gema axilar inoculada no meio MIB suplementado com 8,87 µM BAP e 1,43 µM AIA.....	18
<b>FIGURA 2</b> - Ciclo de 12 meses de multiplicação <i>in vitro</i> de palma forrageira. Etapas: coleta dos cladódios no campo, desinfestação em laboratório, inoculação das gemas axilares no meio de indução de brotos - MIB (8,87 µM BAP + 1,43 µM AIA), meio de crescimento de brotos - MCB (2,22 µM BAP + 1,43 µM AIA), meio de multiplicação de brotos - MMB (4,44 µM BAP + 1,43 µM AIA), enraizamento dos brotos <i>in vitro/ex vitro</i> , plantio das plântulas em sacos plásticos na fase de aclimatização e plantio das mudas no campo.....	20
<b>FIGURA 3</b> - Multiplicação de brotos dos genótipos Miúda (A-B) e Orelha de Elefante Mexicana (C-D), em diferentes concentrações de sacarose (3 e 5% p/v) e BAP (4,44 a 22,19 µM), após 70 dias da inoculação <i>in vitro</i> .....	23

**FIGURA 4** - Relação entre concentrações de BAP ( $\mu\text{M}$ ) e Altura de Brotos (cm), no genótipo Orelha de Elefante Mexicana e sacarose a 3% (p/v)..... 24

**FIGURA 5** - Relação entre Número de Brotos ( $\sqrt{x+1}$ ) e concentrações de BAP ( $\mu\text{M}$ ), no genótipo Orelha de Elefante Mexicana e sacarose a 3% (p/v)..... 25

### **CAPÍTULO 3**

**FIGURA 1** – (A) Brotos micropropagados e isolados para enraizamento; (B) Imersão da base dos brotos em água (controle) ou em auxinas..... 33

**FIGURA 2** - Micropropagação da palma forrageira do genótipo Baiana resistente à cochonilha-do-carmim: (A) Proliferação utilizando diferentes combinações de reguladores de crescimento: a) 4,44  $\mu\text{M}$  BAP + 0,54  $\mu\text{M}$  ANA (MSB1); b) 4,44  $\mu\text{M}$  BAP + 0,57  $\mu\text{M}$  AIA (MSB2); c) 4,44  $\mu\text{M}$  BAP + 0,49  $\mu\text{M}$  AIB (MSB3) após 180 dias de subcultivo; (B) Enraizamento de brotos *ex vitro*, após 60 dias de cultivo em: a) água destilada autoclavada (controle); b) 5,71  $\mu\text{M}$  AIA e c) 4,90  $\mu\text{M}$  AIB; (C) Desenvolvimento radicular das plântulas; (D) Aclimatização das plântulas em condições de casa de vegetação..... 35

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
 <b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>TABELA 1</b> - Valores médios referentes à variável Altura de Brotos (AB), em resposta aos genótipos Miúda e Orelha de Elefante Mexicana, desenvolvidos em meios de cultura com diferentes combinações de Sacarose (3 e 5% p/v) e BAP (4,44; 8,87; 13,31; 17,74 e 22,19 $\mu\text{M}$ ) .....	22
<b>TABELA 2</b> - Valores médios referentes à variável Número de Brotos (NB <sup>#</sup> ), em resposta aos genótipos Miúda e Orelha de Elefante Mexicana, desenvolvidos em meios de cultura com diferentes combinações de Sacarose (3 e 5% p/v) e BAP (4,44; 8,87; 13,31; 17,74 e 22,19 $\mu\text{M}$ ) .....	22
 <b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>TABELA 1</b> - Valores médios referentes às variáveis Número de Brotos (NB), média da Altura da Parte Aérea da Plântula (mAPA) em resposta aos tratamentos com diferentes combinações de 4,44 $\mu\text{M}$ BAP + 0,54 $\mu\text{M}$ ANA (MSB1); 4,44 $\mu\text{M}$ BAP + 0,57 $\mu\text{M}$ AIA (MSB2) e 4,44 $\mu\text{M}$ BAP + 0,49 $\mu\text{M}$ AIB (MSB3) .....	34
<b>TABELA 2</b> - Valores médios referentes às variáveis: Comprimento da Maior Raiz (CMR), Altura da Parte Aérea da Plântula (mAPA) e Peso da Plântula (PP), em resposta aos tratamentos: ED1) imersão em água destilada (controle); ED2) imersão em 5,71 $\mu\text{M}$ AIA e ED3) imersão em 4,90 $\mu\text{M}$ AIB) .....	36

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AB – Altura dos brotos

AIA – Ácido 3-indolacético

AIB – Ácido 3-indolbutírico

ANA – Ácido  $\alpha$ -naftalenoacético

BAP – 6-benzilaminopurina

CDSA – Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido

CMR – Comprimento da maior raiz

ED – Enraizamento direto

G – Genótipos

mAPA – Média da altura da parte aérea da plântula

MIB – Meio de Indução de brotos

MCB – Meio de crescimento de brotos

MMB – Meio de multiplicação de brotos

MSB – Meio MS de Brotação

NB – Número de brotos

PP – Peso da plântula

S – Sacarose

UFCG – Universidade Federal de Campina Grande

## MICROPROPAGAÇÃO E ENRAIZAMENTO DE GENÓTIPOS DE PALMA FORRAGEIRA RESISTENTES À COCHONILHA-DO-CARMIM

**RESUMO** - Os cultivos da palma forrageira estão mais concentrados nos estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, estimando hoje cerca de 500.000 ha no Nordeste. Devido ao ataque da cochonilha-do-carmim nas plantações da região do Nordeste, cerca de R\$400 milhões foram os prejuízos causados aos agricultores da Paraíba. A praga cochonilha-do-carmim afeta no desenvolvimento da planta, causando definhamento e amarelecimento, levando-a morte. A palma forrageira ganhou espaço na região, devido a sua utilização na ração animal, nos períodos de estiagem e adaptabilidade a condições edafoclimáticas. Já foram identificados genótipos de palma forrageira resistentes à cochonilha-do-carmim. Neste estudo foi proposto o ajuste de protocolos para a produção em larga escala de mudas micropropagadas *in vitro* e testar métodos de enraizamentos em genótipos de palma forrageira resistentes à cochonilha-do-carmim. O primeiro experimento dividiu-se em quatro etapas: indução de brotos, crescimento de brotos, multiplicação de brotos e ensaio com meios de cultura, onde foram avaliadas diferentes concentrações da combinação de sacarose e BAP, para os genótipos Miúda (*Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck) e Orelha de Elefante Mexicana (*Opuntia stricta* Haw). O segundo experimento dividiu-se em três etapas: estabelecimento de gemas, proliferação de brotos e enraizamento *ex vitro* dos brotos, onde foram avaliadas a influência de diferentes concentrações de reguladores de crescimento na proliferação de brotos *in vitro* e no enraizamento *ex vitro* do genótipo Baiana (*Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck). Conclui-se que, no primeiro experimento, a utilização das menores concentrações de sacarose e BAP satisfazem a multiplicação *in vitro* dos genótipos Miúda e Orelha de Elefante Mexicana, por outro lado, no segundo experimento não é necessário o uso de reguladores de crescimento para o enraizamento *ex vitro* de brotos do genótipo Baiana obtidos *in vitro*.

**Palavras-chave:** *Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck, *Opuntia stricta* Haw, *ex vitro*, *in vitro*.

## MICROPROPAGATION AND ROOTING OF CACTUS PEAR GENOTYPES RESISTANTS TO CARMINE COCHINEAL

**ABSTRACT** - The cultivation of cactus pear are more concentrated in the states of Paraíba, Pernambuco and Alagoas, today estimated about 500,000 ha in the Northeast. Due to the attack of the carmine cochineal in plantations of the Northeast, approximately R\$ 400 million was the damage caused to farmers of Paraíba. The plague of carmine cochineal affects plant development, causing stunting and yellowing, leading to death. The cactus pear has gained ground in the region, due to its use in animal feed during periods of drought and adaptability to environmental conditions. Genotypes of cactus pear resistant to the carmine cochineal have been identified. This study proposed the setting of protocols for large scale production of plantlets *in vitro* and test methods to rooting shoots of cactus pear genotypes resistant to the carmine cochineal. The first experiment was divided into four stages: induction of shoots, growth of shoots, shoot multiplication and assay with culture media, where different concentrations of the combination of sucrose and BA were evaluated for genotypes “Miúda” (*Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck) and “Orelha de Elefante Mexicana” (*Opuntia stricta* Haw). The second experiment was divided into three stages: establishment of buds, shoot proliferation and *ex vitro* rooting of shoots, where the influence of different concentrations of growth regulators were evaluated on *in vitro* shoot proliferation and *ex vitro* rooting of genotype “Baiana” (*Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck). Conclude that in the first experiment, the use of lower concentrations of sucrose and BAP satisfy the *in vitro* multiplication of genotypes “Miúda” and “Orelha de Elefante Mexicana”, on the other hand, in the second experiment is not necessary to use growth regulators to *ex vitro* rooting of shoots of genotype Baiana obtained *in vitro*.

**Keywords:** *Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck, *Opuntia stricta* Haw, *ex vitro*, *in vitro*.

## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1. INTRODUÇÃO

À medida que os pássaros comiam as frutas, a palma forrageira se espalhava na costa mediterrânea. Os seus cladódios podem percorrer uma longa distância, sem perder a capacidade de enraizamento. É muito utilizada na alimentação humana, na ração animal, na produção de energia (biogás), na medicina, na indústria de cosméticos, na proteção do solo, além de uma infinidade de usos (BARBERA, 2001). Já vem sendo produzida em larga escala, por diversos países, como México, Austrália, Índia, Marrocos, entre outros, para comercialização agroindustrial e culinária (PEREIRA; LOPES, 2011).

É considerada uma planta muito bem distribuída e explorada, mesmo em áreas de subsistência como as zonas áridas e semiáridas, que pela falta de recursos naturais e produtivos, forçam os agricultores e criadores a voltarem sua atenção, para as espécies que podem aí sobreviver e produzir com rentabilidade (BARBERA; INGLESE, 1993).

A palma é uma forrageira tem as suas propriedades fisiológicas caracterizadas por um processo fotossintético eficiente, conhecido como Metabolismo Ácido das Crassuláceas - CAM (SANTOS et al., 2006), apresenta um alto grau de resistência à seca e às temperaturas elevadas, tem maior adaptabilidade a solos com baixa fertilidade, produz bem utilizando pouca água, tem maior viabilidade e eficiência econômica. É plantada em regiões com problemas ambientais e falta de recursos naturais, como água, e também é plantada em áreas com produção intensiva, objetivando a redução de impactos ambientais (BARBERA, 2001). Mesmo com toda a viabilidade econômica da utilização do corante carmim, a Europa não obteve com facilidade a planta hospedeira da cochonilha-do-carmim (*Dactylopius opuntiae*), pois era proibida a exportação de cladódios infestados pelo inseto (DONKIN, 1977).

O Nordeste brasileiro ocupa 1.600.000 km<sup>2</sup> do território nacional e o Semiárido Nordestino também conhecido como Polígono das Secas é a área de maior incidência das secas e estende-se por 980.000 km<sup>2</sup> (LOPES; SANTOS; VASCONCELOS, 2012). Os cultivos de palma forrageira produzem uma biomassa acima de 150 toneladas de matéria verde/ha/ano, desde que se associem a práticas agrônômicas adequadas e variedades de elevado potencial produtivo (LOPES; SANTOS; VASCONCELOS, 2012). Utiliza-se a

*Opuntia*, eliminando-se com cuidado seus espinhos, na alimentação de gado de leite e de corte, de bois, ovelhas e porcos, mas não na alimentação de cavalos (GRIFFITHS, 1905).

Lopes et al. (2010), fizeram a seleção de genótipos de palma forrageira (*Opuntia spp.*) e (*Nopalea spp.*) resistentes à cochonilha-do-carmim na Paraíba, e concluíram que os genótipos Baiana, Miúda, Orelha de Elefante Africana, Orelha de Elefante Mexicana, Orelha de Onça e Palma Azul, são resistentes. Concluíram também que os genótipos Palma ornamental, X-Italiana, Palma Gigante, F5, F8, F11, V12, IPA-Clone 20, Orelha-de-onça, Redonda, Branco São Pedro, Formosa, Língua-de-vaca e Gigantona, são suscetíveis à cochonilha-do-carmim.

A cochonilha-do-carmim tem causado grandes prejuízos às lavouras de palma forrageira nos estados de Pernambuco, Paraíba e Ceará. A praga é disseminada através de animais, veículos, vento, mudas e raquetes da planta. Dados de junho de 2007 mostram que a Paraíba já apresenta 63 municípios infestados pela praga, todos com ataques e perdas acima de 90% (LOPES et al., 2010). O controle do inseto cochonilha-do-carmim pode ser químico, mecânico e com o uso de cultivares resistentes (CAVALCANTI et al., 2001).

Pesquisas com seleção de clones resistentes à cochonilha-do-carmim mostram que as cultivares de palma forrageira “Orelha de Elefante Mexicana” (*Opuntia stricta* Haw Mill) e “Baiana” e “Miúda” (*Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck) e vem se destacando como resistentes (VASCONCELOS et al., 2002; LOPES et al., 2010).

A propagação por semente de palma forrageira, para fins de melhoramento genético, deveria permanecer como ferramenta exclusiva para espécies ornamentais e em risco de extinção, principalmente nos países em que há restrições de quarentena (GRAHAM, 1987). A multiplicação das *Opuntias* acontece geralmente por meio de estaquia dos cladódios, por outro lado, a propagação sexual através da multiplicação por sementes, foi estudada como uma alternativa, porém apresentou diversos problemas, como a segregação genética, o prolongamento da fase juvenil e o crescimento lento, quando comparada com a multiplicação assexuada (VILLALOBOS, 2001).

Técnicas de cultivo *in vitro* podem ser utilizadas para obtenção de multiplicação vegetal em larga escala e de mudas com uniformidade genética, além de apresentar peso e volume reduzidos, quando comparadas aos métodos tradicionais (VILLALOBOS, 2001). Escobar et al. (1986) desenvolveram um método de micropropagação muito eficiente para *Opuntia amylocea*, de acordo com o qual em 100 dias era possível obter 25.000 plantas provenientes de um cladódio de cerca de 5 cm.

## 2. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi ajustar protocolos para produção em larga escala de mudas micropropagadas *in vitro* e testar métodos de enraizamento em genótipos de palma forrageira resistentes à cochonilha-do-carmim.

## 3. REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Cultura de tecidos vegetais

Em 1838, Schleiden e Schwann formularam a teoria da totipotencialidade, que parte da premissa que todas as células da planta podem gerar um indivíduo, utilizando técnicas da cultura de tecidos vegetais (VASIL et al., 1979). A técnica da cultura de tecidos vegetais exige condições assépticas de manuseio e a escolha de uma boa planta matriz que ajuda a reduzir a contaminação (SHARP et al., 1979).

Entre as aplicações da cultura de tecidos, a micropropagação é a técnica que gera maior impacto e resultados mais concretos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). As etapas da cultura de tecidos vegetais vão desde o estabelecimento da cultura *in vitro* até seu enraizamento, culminando com a aclimatização da microplanta (BASTOS et al., 2007).

Frota et al. (2004), avaliaram o efeito do 6-benzilaminopurina (BAP) e do ácido indolacético (AIA) na proliferação e enraizamento de palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill), concluindo que os melhores tratamentos para a proliferação e enraizamento de brotos foram 4,44  $\mu\text{M}$  BAP e 28,54  $\mu\text{M}$  AIA, respectivamente.

Khalafalla et al. (2007), obtiveram a maior taxa de multiplicação de brotos (26,5/por explante) aos 90 dias em meio MS suplementado com 22,19  $\mu\text{M}$  BAP e 100% de enraizamento no meio MS sem hormônio ou suplementado com 2,85  $\mu\text{M}$  AIA, embora o maior número de raízes (15/ parte aérea) tenha sido obtido em meio MS suplementado com AIA e todas as plântulas tenham sido estabelecidas com sucesso no solo.

Vasconcelos et al. (2007), estabeleceram protocolo de micropropagação para a cv. Miúda (*Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck), tendo concluído que o melhor meio foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 3% de sacarose, 4,44  $\mu\text{M}$  BAP e 0,57  $\mu\text{M}$  AIA. Concluíram também que o corte longitudinal dos cladódios na fase de multiplicação, favoreceu a emissão de brotos no meio anteriormente citado e que o meio de

cultura MS básico sem reguladores de crescimento, promoveu bom enraizamento dos explantes.

### 3.2 Palma forrageira

O Semiárido Nordestino caracteriza-se por solos rasos, pedregosos ou arenosos, com pouca matéria orgânica, porém ricos em minerais solúveis e pH neutro ou próximo de sete. A região se caracteriza por ter um balanço hídrico negativo, resultante de temperaturas médias anuais de 23°C a 27°C, com amplitude diária de mais ou menos 10°C, precipitações médias anuais inferiores a 800 mm, insolação média de 2.800 h/ano, evaporação de 2000 mm/ano e umidade relativa do ar média de 50% (MOURA et al., 2007). A vegetação típica que ocupa maior parte no semiárido nordestino é a Caatinga, são plantas predominante efêmeras, carnosas ou suculentas, lenhosas, geralmente, tolerantes a longos períodos de estiagem (CHIACCHIO et al., 2006).

A introdução da palma forrageira no Nordeste não tem uma data bem definida, existindo muita controvérsia sobre o assunto entre os autores (SOUZA, 1966; FARIAS et al., 1984). Segundo Pessoa (1967), a introdução da palma forrageira pode ter ocorrido antes de 1900, mas Pupo (1979) afirma que a cactácea foi introduzida no Estado de Pernambuco, vinda do Texas (EUA), por volta de 1880.

Em meio às espécies cultivadas e selvagens mais usadas da palma forrageira, uma espécie pertence ao gênero *Nopalea* e doze pertencem ao gênero *Opuntia*. A *Opuntia ficus-indica*, conhecida popularmente como palma Gigante, pertence à classe *Liliateae*, família *Cactaceae*, subfamília *Opuntioideae*, gênero *Opuntia*, subgêneros *Nopalea* e *Opuntia*, é uma espécie xerófila com grande potencialidade na Caatinga brasileira (CHIACCHIO et al., 2006; ARAÚJO FILHO, 1977).

Em muitos países a palma forrageira é cultivada de forma extensiva para produção de forragem animal e frutos, sendo também utilizada na prevenção contra a degradação ecológica de ambientes sensíveis ao longo prazo (PIMIENTA et al., 1993). Segundo Lopes, Santos e Vasconcelos (2007), no Nordeste brasileiro, são encontrados, dentre vários genótipos, três dos principais tipos de palma forrageira, Doce ou Miúda (*Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck), Gigante (*Opuntia ficus-indica*) e Redonda (*Opuntia sp.*).

A palma forrageira é cultivada na Paraíba nas Microrregiões do Cariri Oriental e Ocidental, Curimataú Ocidental e Oriental, Campina Grande, Serra do Teixeira,

Umbuzeiro, Itaporanga, Piancó, Cajazeiras e Seridó Oriental. Nas sete primeiras microrregiões é onde se concentra as suas maiores áreas cultivadas, pois o clima é ameno, a temperatura à noite varia de 13 a 18°C, umidade relativa do ar alta, em torno de 80%, à noite, tem a influência dos fatores climáticos, que são muitos importantes quando se tem em vista a nutrição dos cladódios (LOPES; SANTOS; VASCONCELOS, 2012).

Estima-se que hoje existam cerca de 500.000 ha no Nordeste, cultivados com a palma forrageira, concentrados nos estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia, Ceará e o Rio Grande do Norte. Introduzida na região semiárida nordestina em meados dos séculos XIX a palma (*Opuntia ficus-indica*), tinha como objetivo a produção do corante “carmim-cochonilha” (Agricultura, 2013). Apesar da grande decepção na produção do corante, a palma ganhou espaço na região devido a sua utilização na ração animal, nos períodos de estiagem e adaptabilidade a condições edafoclimáticas do sertão, devido a suas propriedades fisiológicas, hoje a palma forrageira está totalmente incorporada à paisagem do Nordeste.

As plantas CAM têm como característica fundamental a sua suculência, que nas *Opuntias*, apresentam-se de diversas formas, como a nível morfológico por seus cladódios grossos e a nível anatômico por seus enormes vacúolos cheio de água nas células fotossintéticas e as diversas camadas de células armazenadoras de água (NOBEL, 2001). As plantas CAM, abrem seus estômatos durante as noites frias e fecha-os durante o dia por causa das altas temperaturas e do clima seco. Com o fechamento dos estômatos durante o dia as plantas minimizam a sua perda de água, mas uma vez que a água e o CO<sub>2</sub> partilham da mesma rota de difusão, o CO<sub>2</sub> necessita ser capturado durante a noite (TAIZ e ZEIGER, 2006).

O metabolismo CAM é uma modificação do ciclo C<sub>4</sub>, de forma que agora não existe uma separação espacial entre a fixação do CO<sub>2</sub> feita pela PEPcase e pela Rubisco, mas sim, uma separação temporal. Nas plantas CAM, a fixação do CO<sub>2</sub> feita pela PEPcase ocorre somente à noite, ao contrário das outras plantas C<sub>4</sub>, onde a atividade dessa enzima é limitada ao período diurno. A vantagem desse metabolismo é que as plantas CAM apresentam uma menor perda de água, visto que precisam abrir os seus estômatos somente à noite para fixar o CO<sub>2</sub> atmosférico. Durante a noite o ácido málico ou malato é acumulado no vacúolo dessas plantas e durante o dia, esse ácido orgânico é transportado para o citosol, onde é descarboxilado e a Rubisco irá fixar o CO<sub>2</sub> no Ciclo de Calvin (TAIZ; ZEIGER, 2006).

As plantas C3, como por ex. feijão e soja, perdem de 400 a 500 g de água e as plantas C4, como por ex. cana de açúcar e milho, perdem de 250 a 300 g de água para cada grama de CO<sub>2</sub> fixado, ou seja, a planta C3 perde de 5-8 vezes e a C4 perde de 3-5 vezes mais água para cada grama de CO<sub>2</sub> obtido, quando comparadas com as plantas CAM, como por ex. abacaxi e cactáceas, que perdem apenas 50 a 100 g de água para cada grama de CO<sub>2</sub> fixado (TAIZ; ZEIGER, 2006).

As *Opuntias* apresentam baixos teores de proteínas, alto teor de umidade e alta digestibilidade (FELKER, 2001). Segundo Hills (2001), uma das características das *Opuntia ficus-indica* é a presença de um sistema radicular superficial, carnoso e com distribuição horizontal. A palma é um excelente alimento para os rebanhos, porém precisa ser fornecida com outro alimento rico em fibra, por exemplo, silagem, feno, bagaço de cana, qualquer alimento que possa corrigir a deficiência de fibra, devido ao seu percentual de proteína crua e de determinados nutrientes minerais serem baixas.

O fruto da palma forrageira, é conhecido comercialmente como figo-da-índia, é ovóide, grande, roxo ou amarelo e com espinhos no pericarpo, possui um alto valor nutritivo, apresentam também na sua composição fibras, carboidratos, solúveis e cálcio, sendo rico em vitaminas e magnésio (PIMIENTA-BARRIOS; BARBERA; INGLESE, 1993).

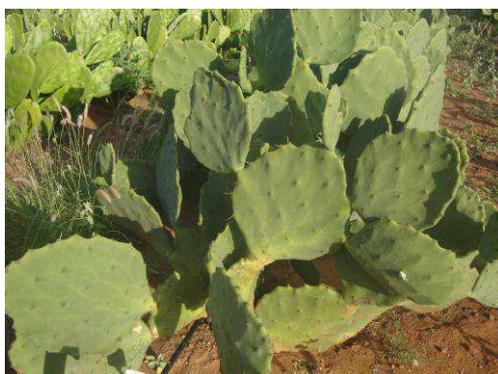
O bom rendimento da palma forrageira está relacionado às áreas com médias de 400 a 800 mm anuais de chuva, umidade relativa do ar acima dos 40% (VIANA, 1969), e temperaturas diurnas e noturnas em torno de 25 e 15°C, respectivamente (NOBEL, 1995). A palma forrageira tem um sabor doce, levemente ácido e bastante refrescante (LOPES; SANTOS; VASCONCELOS, 2012).

Segundos Lopes; Santos e Vasconcelos (2012), a palma Doce ou Miúda (*Nopalea cochenillifera*) é uma planta de porte pequeno e caule bastante ramificado. A sua raquete pesa cerca de 350 g, comprimento de 25 cm, sua forma é acentuadamente obovada (ápice mais largo que a base), coloração verde intenso brilhante. As flores são avermelhadas e sua corola permanece meio fechada durante o ciclo (Figuras 1 e 3).



**FIGURA 1** - (A) Plantio no campo; (B) Flor; (C) Fruto e (D) Sementes, da palma forrageira genótipo Miúda, no Campo Experimental do CDSA/UFCG, Sumé - PB, 2014.

A palma Orelha de Elefante Mexicana (*Opuntia stricta* Haw) (Figuras 2 e 3), e apresenta espinhos, dificultando assim o seu manejo como forrageira, porém, apesar dessa característica indesejável na alimentação animal, é uma planta com maior resistência à seca, pois os espinhos servem para reduzir a temperatura do caule modificado durante o dia e sua presença diminui também a captação de luz pelos cladódios (NOBEL, 1983).



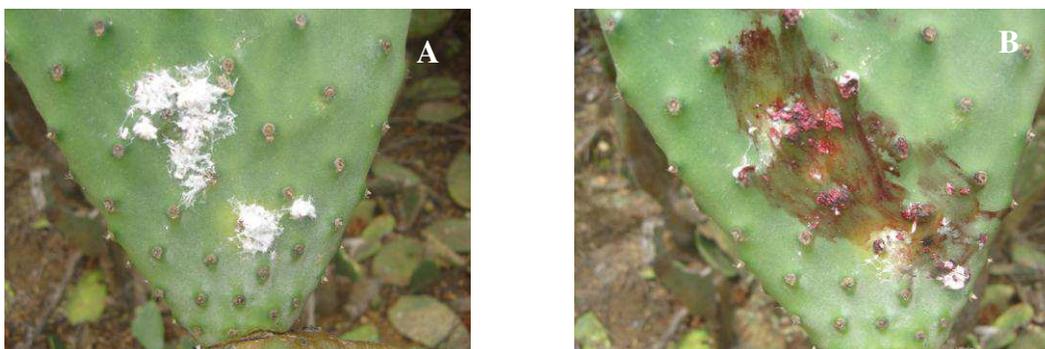
**FIGURA 2** – Palma forrageira do genótipo Orelha de Elefante Mexicana.



**FIGURA 3** - Plantação de genótipos micropropagados de palma forrageira resistentes à cochonilha-do-carmim, no Campo Experimental do CDSA/UFCG, Sumé – PB, 2014.

### 3.3 Cochonilha-do-carmim

Uma das principais pragas que atacam a palma forrageira é a cochonilha-do-carmim (*Dactylopius opuntiae*) que produz o corante natural conhecido como “carmim-vermelho”, fabricado a partir da síntese do ácido carmínico. O ataque dessa praga afeta o desenvolvimento da planta, causando definhamento e amarelecimento, levando à sua morte (Figura 4). O inseto cochonilha-do-carmim vive na parte inferior das raquetes de palma forrageira, formando colônias protegidas por uma cobertura cerosa, que serve para proteger contra os raios solares (SANTOS, 2009).



**FIGURA 4** - (A) Colônias de cochonilha-do-carmim; (B) Corante carmim de cochonilha.

A cultura da palma forrageira é uma atividade lucrativa para os caririzeiros, pois além da alimentação dos rebanhos, se obtém renda extra para o sustento da família. Um hectare de palma nas épocas de estiagem prolongadas chega a custar entre R\$ 1.800,00 e 2.000,00. Em um hectare de palma forrageira se produz, em média, 400 kg de cochonilha seca que comercializada a R\$ 2,50 somariam R\$ 1.000,00. Com esses dados, infere-se que, economicamente, é mais rentável produzir a palma para comercialização dos cladódios do que da cochonilha, pois uma vez que a praga encontra-se estabelecida no palmar todas as plantas degeneram drasticamente, chegando a morrerem e não servirem de alimento para os animais (LOPES et al., 2010).

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRICULTURA: **Formulários de Espécies incluídas no Regime de Proteção**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 12 de nov. de 2013.

ARAÚJO FILHO, J. A. Manejo de pastagens em regiões semi-áridas. In: Pasture Management Symposium, 4, 1977, Piracicaba. **Proceedings**. Piracicaba: USP-FEALQ, p.164-76. 1977.

BARBERA O.; INGLESE, P. **La cultura del ficodindia**. Bologna: Calderini Edagricole. 1993. 189 p.

BARBERA, G. História e importância econômica e agroecologia. In: BARBERA, G., INGLESE, P. PIMIENTA-BARRIOS, E. (ed.) **Agroecologia, cultivo e uso da palma forrageira**. SEBRAE: FAO, Paraíba, 2001. p.1-11.

BASTOS, L.P. et al. Cultivo *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2, p.1122-1124, 2007.

CAVALCANTI, V. A. L. B.; SENA, R. C.; COUTINHO, J. L. B.; ARRUDA, G. P.; RODRIGUES, F. B. **Controle das cochonilhas da palma forrageira**. Recife: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA, 2001. (IPA Responde, 39).

CHIACCHIO, F. P. B.; MESQUITA, A. S.; SANTOS, J. R. dos. Palma forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o Semiárido baiano. **Bahia Agrícola**, Salvador, v.7, n.3, p. 39-49. 2006.

DOMINGUES, O. **Origem e introdução da palma forrageira no nordeste**. Recife: Instituto Joaquim Nabuco de Pesquisas Sociais. 1963. 73 p.

DONKIN, R.A. Spanish Red: an ethnogeographical study of cochineal and the *Opuntia cactus*. **Transactions of the American Philosophical Society**, v. 67, n.5, 1977.

ESCOBAR, A.; VILLALOBOS, V.M.A.; VILLEGAS, M. *Opuntia* micropropagation by axillary proliferation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.7, p. 269-277, 1986.

FARIAS, I., FERNANDES, A. de P. M., LIMA, M. A. et al. **Cultivo de palma forrageira em Pernambuco**. Recife: IPA (IPA - Instruções Técnicas, 21) 1984. 5p.

FELKER, P. Produção e utilização de forragem. In: BARBERA, G., INGLESE, P. PIMIENTA BARRIOS, E (Eds.). **Agroecologia, cultivo e uso da palma forrageira**. SEBRAE: FAO, Paraíba, 2001. p.147-157

FROTA, H.M.; CARNEIRO, M.S.S.; LLAMOCA-ZÁRATE, R.M.; CAMPOS, F.A.P.; PEIXOTO, M.J.A. Proliferação e enraizamento *in vitro* de brotos de palma forrageira - *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 26, n. 2, p. 235-238, 2004.

GRAHAM, V. **Growing succulent plants, including cacti**. Portland: Timber Press, 1987.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPQ, 1998. v.1, p.99-169.

GRIFFITHS, D. **The prick pear and other cacti as food for stock**. USDA Bulletin 74. 1905. 48 p.

HILLS, F.S. Anatomia e morfologia. In: BARBERA, G., INGLESE, P. PIMIENTA BARRIOS, E (Eds.). **Agroecologia, cultivo e uso da palma forrageira**. SEBRAE: FAO, Paraíba, 2001. p. 28-34.

KHALAFALLA, M.M.; ABDELLATEF, E.; AHMED, M.M.M., OSMAN, G. Micropropagation of cactus (*Opuntia ficus-indica*) as strategic tool to combat desertification in arid and semi arid regions. **International Journal of Sustainable Crop Production**, v.2, n.4, p.1-8, 2007.

LOPES, E.B.; BATISTA, J.L.; BRITO, C.H.; SANTOS, D.C. Pragas da palma. In: LOPES, E.B. (Org.). **Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino**. 1. ed. João Pessoa: EMEPA-PB, 2012. p. 61- 80.

LOPES, E.B.; BRITO, C.H.; ALBUQUERQUE, I.C.; BATISTA, J.L. Seleção de genótipos de palma forrageira (*Opuntia* spp.) e (*Nopalea* spp.) resistentes à cochonilha-do-carmim (*Dactylopius opuntiae* Cockerell,1929) na Paraíba, Brasil. **Engenharia Ambiental**, v. 7, n.1, p. 204-215, 2010.

LOPES, E.B.; SANTOS, D.C.; VASCONCELOS, M.F. Cultivo da palma forrageira. In: LOPES, E.B. (Org.). **Palma forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido nordestino**. 1. ed. João Pessoa: EMEPA-PB, 2012. p. 21- 56.

MOURA, M. S. B. et al. Clima e água de chuva no Semi-Árido. In: BRITO, L.T.L.; MOURA, M.S.B.; GAMA, G.F.B. (ed.). **Potencialidades da água de chuva no Semi-Árido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2007. p. 37-59.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NOBEL, P. S. Environmental biology. In: BARBERA, G.; INGLESE, P.; PIMIENTA-BARRIOS, E. Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear. Rome: FAO, 1995. p.36-48 (FAO. Plant Production and Protection, 132).

NOBEL, P. S. Spines influences on PAR interception, stem temperature and nocturnal acid accumulation. **American Journal Botany**, v. 70, n. 8, p. 1244- 1253, 1983.

NOBEL, P.S. Biologia Ambiental. In: BARBERA, G., INGLESE, P. PIMIENTA BARRIOS, E (ed.). **Agroecologia, cultivo e uso da palma forrageira**. SEBRAE: FAO, Paraíba, 2001. p.36-48.

PEREIRA, E.F.P.; LOPES, P.S.Q. **Palma, Ouro verde do semiárido**. João Pessoa: SENAR/AR/PB, 2011.

PESSOA, A. S. **Cultura da palma forrageira**. Recife: SUDENE. Divisão de Documentação, 1967. 98p. (SUDENE. Agricultura, 5).

PIMIEN-TA-BARRIOS, E.; BARBERA, G.; INGLESE, P. Cactus pear (*Opuntia* spp. Cactaceae) Internation Network: an effort for productivity and environmental conservation for arid and semiarid land. **Cactus and Succulent Journal**, v.65, n. 5, p.225-229, 1993.

PUPO, N. I. H. **Manual de pastagens e forrageiras: formação, conservação, utilização**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1979.

SANTOS, D.C. DOS; FARIAS, I. LIRA, M. DE A. SANTOS, M.V.F. DOS; ARRUDA, G.P.; COELHO, R.S.B; DIAS, F.M.; MELO, J.N. **Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia e Nopalea*) em Pernambuco**. Recife: IPA, (Documento 30). 2006. 48p.

SHARP, W.R.; LARSEN, P.O.; PADDOCK, E.F.; RAGHAVAN, V. **Plant cell and tissue culture principles and applications**. Columbus: Ohio State University, 1979. 892 p.

SOUZA, A. C. **Revisão dos conhecimentos sobre palmas forrageiras**. Recife: IPA, 1966. 36p. (IPA Boletim Técnico, 5).

TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 719 p.

VASCONCELOS, A.G.V.; LIRA, M.A.; CAVALCANTI, V.A.L.; SANTOS, M.V.; CÂMARA, T.; WILLADINO, L. Micropropagação de palma forrageira cv. Miúda (*Nopalea cochenillifera*- Salm Dyck). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.2, n.1, p.28-31, 2007.

VASIL, I.K.; VASIL, V., WHITE, D.W.R.; BERG, H.R. **Plant regulation and world agriculture**. New York: Plenum Pub. Corp., 1979.

VIANA, O. J. Pastagens de cactáceas nas condições do Nordeste. **Zootecnia**, v. 7, n. 2, p. 55-65, 1969.

VILLALOBOS, V. M. A. Aplicação do cultivo de tecidos para a micropropagação de *Opuntia* sp. In: BARBERA, G., INGLESE, P. PIMIEN-TA BARRIOS, E (ed.). **Agroecologia, cultivo e uso da palma forrageira**. SEBRAE: FAO, Paraíba, 2001. p. 72-74.

## **CAPÍTULO 2 – MICROPROPAGAÇÃO DE GENÓTIPOS DE PALMA FORRAGEIRA RESISTENTES À COCHONILHA-DO-CARMIM**

**RESUMO** - No semiárido Nordeste a palma forrageira é popularmente conhecida como “ouro verde”; é oriunda do México, onde já foram identificadas mais de 100 variedades. A palma suporta grandes períodos de estiagem nas regiões semiáridas, como no semiárido nordestino, auxiliando os agricultores que a utilizam na ração animal. Mas, é preciso fornecê-la com outros alimentos ricos em fibras como bagaço de cana e silagem. O principal objetivo deste trabalho foi ajustar um protocolo para produção em larga escala de mudas micropropagadas de genótipos de palma forrageira resistentes à cochonilha-do-carmim. Os experimentos foram divididos em cinco etapas: indução de brotos, crescimento de brotos, multiplicação de brotos, ensaio com meios de cultivo e enraizamento. No ensaio, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x2x2 (cinco concentrações do regulador de crescimento 6-benzilaminopurina [BAP]: 4,44; 8,87; 13,31; 17,74 e 22,19  $\mu\text{M}$ ; dois genótipos: Miúda e Orelha de Elefante Mexicana; duas concentrações de sacarose: 3 e 5% p/v), com 10 repetições. As variáveis analisadas foram altura de brotos e número de brotos. Os melhores resultados para altura de brotos no genótipo Miúda foram obtidos no tratamento suplementado com 8,87  $\mu\text{M}$  BAP e 5% (p/v) de sacarose, e para número de brotos o melhor resultado foi obtido no tratamento suplementado com 4,44  $\mu\text{M}$  BAP e 3% (p/v) de sacarose. Por outro lado, o genótipo Orelha de Elefante Mexicana alcançou os melhores resultados para a altura e número de brotos no tratamento suplementado com 22,17  $\mu\text{M}$  BAP e 5% (p/v) de sacarose. Pode-se concluir que, em geral a combinação de 4,44  $\mu\text{M}$  BAP e 3% (p/v) de sacarose satisfaz a multiplicação *in vitro* de ambos genótipos.

**Palavras-chave:** multiplicação *in vitro*, *Opuntia* sp., *Nopalea* sp., *Dactylopius opuntiae*.

## CHAPTER 2 - MICROPROPAGATION OF CACTUS PEAR GENOTYPES RESISTANTS TO CARMINE COCHINEAL

**ABSTRACT** - In semiarid Northeast cactus pear is popularly known as "green gold"; come from Mexico, where more than 100 varieties have been identified. The cactus pear supports large periods of drought in semi-arid regions, as in the semi-arid northeast, assisting farmers to use in animal feed. But, it's necessary to provide it with other foods rich in fiber such as sugarcane bagasse and silage. The main objective of this work was to set a protocol for large-scale production of plantlets of cactus pear genotypes resistant to carmine cochineal. The experiments were divided into five stages: induction of shoots, growth of shoots, shoot multiplication, assay with culture media and rooting. In the assay, it used the randomized design in a factorial 5x2x2 (five concentrations of growth regulator 6-benzylaminopurine [BA]: 4.44, 8.87, 13.31, 17.74 and 22.19  $\mu\text{M}$ ; two genotypes: "Miúda" and "Orelha de Elefante Mexicana"; two concentrations of sucrose: 3 and 5% w/v), with 10 repetitions. The variables analyzed were shoot height and number of shoots. The best results for shoot height in the "Miúda" genotype were obtained in treatment supplemented with 8.87  $\mu\text{M}$  BAP and 5% (w/v) sucrose, and to number of shoots the best results were obtained in the treatment supplemented with 4.44  $\mu\text{M}$  BAP and 3% (w/v) sucrose. On the other hand, the "Orelha de Elefante Mexicana" genotype achieved the best results for the height and number of shoots in the treatment supplemented with 22.17  $\mu\text{M}$  BAP and 5% (w/v) sucrose. It can be concluded that, in general the combination of 4.44  $\mu\text{M}$  BAP and 3% (w/v) sucrose, satisfies the *in vitro* multiplication of both genotypes.

**Keywords:** *in vitro* multiplication, *Opuntia* sp., *Nopalea* sp., *Dactylopius opuntiae*.

## 1. INTRODUÇÃO

A região semiárida do Nordeste do Brasil é uma das maiores, mais populosas e mais secas do mundo, comumente apresenta um déficit hídrico prolongado, causando a baixa produtividade das forragens nativas, o que dificulta a produção de alimentos para os animais. A palma forrageira é nativa do México e há mais de 100 variedades identificadas. No semiárido nordestino ela é conhecida como “ouro verde”, por suportar grandes períodos de estiagem, devido ao seu mecanismo fotossintético CAM (Metabolismo Ácido das Crassuláceas) (TAIZ; ZEIGER, 2006). As plantas CAM geralmente têm crescimento lento, às vezes apresentam uma limitada capacidade reprodutiva, frequentemente têm condições muito específicas e limitadas para a produção e germinação de sementes, como também para a floração (MALDA; SUZA’N; BACKHAUS, 1999).

As espécies mais cultivadas no Brasil são a palma Gigante (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill) devido a sua rusticidade e a palma Miúda ou Doce (*Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck), que é mais exigente com relação à temperatura, água e solo. Os produtores vendem as palmas para os que não têm nas épocas secas no semiárido, obtendo assim mais renda nesse período.

A palma forrageira é bastante rica em água, mucilagem e resíduo mineral; apresentando alto coeficiente de produtividade e digestibilidade da matéria seca (SILVA; SANTOS, 2006). A palma é um excelente alimento para os rebanhos, porém precisa ser fornecida com outro alimento rico em fibra, por exemplo, silagem, feno, bagaço de cana, qualquer alimento que possa corrigir a deficiência de fibra. Segundo Barbera (2001), a palma é utilizada na alimentação humana, como ração animal, fonte de energia, na medicina, na indústria de cosméticos e outras aplicações. Os primeiros relatos sobre os danos causados a palma, devido a uma introdução errônea da espécie *Dactylopius* de cochonilha-do-carmim, foi no estado do Pernambuco em 1998. Estima-se que hoje existam cerca de 500.000 hectares cultivados com a palma forrageira no Nordeste, concentrados principalmente nos estados de Pernambuco, Paraíba, Alagoas, Bahia, Ceará e Rio Grande do Norte.

Atualmente, algumas regiões do estado de Pernambuco onde a palma é cultivada vêm sendo atacadas pela cochonilha-do-carmim (*Dactylopius opuntiae*-Hemiptera, Dactylopidae), provocando perda significativa para o pecuarista do semiárido. 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, as palmas forrageiras Orelha de Elefante Mexicana (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill), além da Miúda e Baiana (*Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck) vêm se destacando como resistentes (VASCONCELOS et al., 2002; LOPES et al., 2005) e atualmente são recomendadas para os produtores pelos órgãos governamentais de pesquisa e extensão de vários estados da região nordeste, como Paraíba e Pernambuco.

A cochonilha-do-carmim é uma das diversas espécies do gênero *Dactylopius* que produzem o corante carmim. Essas espécies são criadas em cactáceas e podem se transformar em pragas se a cultura não for conduzida tecnicamente ou se forem disseminadas livremente nas plantas cultivadas (WARUBY et al., 2005). O inseto foi introduzido no Brasil para que seu corante carmim natural fosse utilizado pelas indústrias alimentícia e têxtil, mas desde então ele vem dizimando as plantações de palma da região Nordeste, onde é produzida para alimentar os rebanhos de animais nos tempos de estiagem.

Lopes et al. (2010), fizeram a seleção de genótipos de palma forrageira (*Opuntia* spp.) e (*Nopalea* spp.) resistentes à cochonilha-do-carmim na Paraíba, e concluíram que os genótipos Baiana, Miúda, Orelha de Elefante Africana, Orelha de Elefante Mexicana, Orelha de Onça e Palma Azul, são resistentes. Concluíram também que os genótipos Palma Ornamental, X-Italiana, Palma Gigante, F5, F8, F11, V12, IPA-Clone 20, Orelha-de-onça, Redonda, Branco São Pedro, Formosa, Língua-de-vaca e Gigantona, são suscetíveis à cochonilha-do-carmim.

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 5,0 cm.

Frota et al. (2004), avaliaram o efeito do 6-benzilaminopurina (BAP) e do ácido indolacético (AIA) na proliferação e enraizamento de palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill), concluindo que os melhores tratamentos para a proliferação e enraizamento de brotos foram 4,44  $\mu\text{M}$  BAP e 28,54  $\mu\text{M}$  AIA, respectivamente.

Khalafalla et al. (2007), trabalhando com *Opuntia ficus-indica*, obtiveram a maior taxa de multiplicação de brotos (26,5/por explante) aos 90 dias em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 22,19  $\mu\text{M}$  BAP e 100% de enraizamento no meio MS sem regulador de crescimento ou suplementado com 2,85  $\mu\text{M}$

AIA, embora o maior número de raízes (15/ parte aérea) tenha sido obtido em meio MS suplementado com AIA e todas as plântulas tenham sido estabelecidas com sucesso no solo.

Vasconcelos et al. (2007), estabeleceram protocolo de micropropagação para a cv. Miúda (*Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck), tendo concluído que o melhor meio foi o MS suplementado com 3% de sacarose, 4,44  $\mu\text{M}$  BAP e 0,57  $\mu\text{M}$  AIA. Concluíram também que o corte longitudinal dos cladódios na fase de multiplicação, favoreceu a emissão de brotos no meio anteriormente citado e que o meio de cultura MS básico sem reguladores de crescimento, promoveu bom enraizamento dos explantes.

Este trabalho tem como principal objetivo ajustar um protocolo para produção em larga escala de mudas micropropagadas de genótipos de palma forrageira resistentes à cochonilha-do-carmim.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos de micropropagação da palma forrageira foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, da Embrapa Algodão, em Campina Grande, PB, no ano de 2011.

Foram coletados no município de Sumé - PB, aproximadamente quatro cladódios jovens de dois genótipos de palma forrageira Miúda e Orelha de Elefante Mexicana, ambos resistentes à cochonilha-do-carmim, com tamanhos variando entre 8,0-12,0 cm e no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais foram lavados com água corrente e algumas gotas de detergente líquido neutro (Figura 1 A-B). Em seguida, os cladódios foram levados para a câmara de fluxo laminar, imersos em álcool 70% por 1 minuto, sendo a seguir transferidos para uma solução de hipoclorito de sódio a 5% (água sanitária pura), acrescida de uma gota de Tween 20 para cada 100 ml da solução. Foram agitados manualmente por 15 minutos, lavados por três vezes com água destilada estéril e acondicionados em placas de Petri.

Os cladódios de cada genótipo foram seccionados transversalmente, excisando-se entre 33 e 57 gemas axilares por cladódio, com tamanho de aproximadamente 5,0 mm<sup>3</sup> (Figura 1-C). As gemas axilares foram inoculadas individualmente em tubos de ensaio com dimensões de 14,5 cm de altura e 2,3 cm de diâmetro, fechados com tampas de polipropileno, contendo 10 ml do meio de cultura com os sais e vitaminas do MS, acrescido de sacarose a 5%, solidificado com ágar a 0,6% e pH 5,7 (Figura 1-D). As etapas

do experimento foram divididas em: a) indução de brotos, b) crescimento de brotos, c) multiplicação de brotos, d) experimento com 10 meios de cultura e) enraizamento. Após cada etapa os cultivos foram mantidos em sala de crescimento por 30 dias, à temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .



**FIGURA 1** – (A) Coleta no campo de cladódios jovens de palma forrageira resistentes à cochonilha-do-carmim, (B) Cladódios de palma forrageira com tamanhos variando de 8,0-12,0 cm, (C) Gemas axilares isoladas com aproximadamente  $5 \text{ mm}^3$ , (D) Gema axilar inoculada no meio MIB suplementado com  $8,87 \mu\text{M}$  BAP e  $1,43 \mu\text{M}$  AIA.

#### a) Indução de brotos

Para a indução de brotos utilizou-se meio de cultura MIB (Meio de Indução de Brotos) contendo a mistura basal de sais e vitaminas do MS modificado, suplementado com a combinação de  $8,87 \mu\text{M}$  BAP e  $1,43 \mu\text{M}$  AIA (Figura 2).

#### b) Crescimento de brotos

Após ficarem no meio de indução de brotos, os explantes foram transferidos para o meio de crescimento de brotos (MCB), contendo a mistura basal de sais e vitaminas do MS modificado, suplementado com a combinação de  $2,22 \mu\text{M}$  BAP e  $1,43 \mu\text{M}$  AIA. As bases

dos explantes foram seccionadas transversalmente para eliminação dos tecidos oxidados (Figura 2).

### **c) Multiplicação de brotos**

Após 30 dias no meio de crescimento de brotos, os explantes foram transferidos para o meio de multiplicação de brotos (MMB), suplementado com a mistura basal de sais e vitaminas do MS modificado, suplementado com a combinação de 4,44  $\mu\text{M}$  BAP e 1,43  $\mu\text{M}$  AIA. Após alguns subcultivos os explantes foram transferidos dos tubos de ensaio para frascos com dimensões de 8,0 cm de altura e 5,0 cm de diâmetro (Figura 2).

### **d) Ensaio com meios de cultivo**

Após 30 dias nos meios de multiplicação, efetuou-se a medição das alturas (cm) dos brotos e aqueles com tamanhos entre 1,5 e 4,0 cm foram escolhidos e seccionados transversalmente na base e no ápice para a quebra da dominância apical. A seguir foram novamente seccionados em cilindros com tamanho de aproximadamente 5,0 mm de espessura.

Estes cilindros foram cortados longitudinalmente, originando dois explantes, que foram inoculados individualmente em tubos de ensaio, contendo meios de cultura MS modificado com cinco concentrações de BAP (4,44; 8,87; 13,31; 17,74 e 22,19  $\mu\text{M}$ ) em combinação com duas concentrações de sacarose (3 e 5% p/v). As gemas originais remanescentes foram novamente transferidas para o meio MCB. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x2x2 (cinco concentrações de regulador de crescimento, dois genótipos, duas concentrações de sacarose), com 10 repetições.

Após os explantes do genótipo Orelha de Elefante Mexicana terem sido submetidos ao ensaio com 10 meios de cultivo, observou-se que os brotos não haviam crescido o suficiente, sendo necessário a utilização do regulador de crescimento ácido  $\alpha$ -naftalenoacético (ANA) na concentração 0,27  $\mu\text{M}$ , o que proporcionou o alongamento dos brotos, facilitando o seu posterior enraizamento.

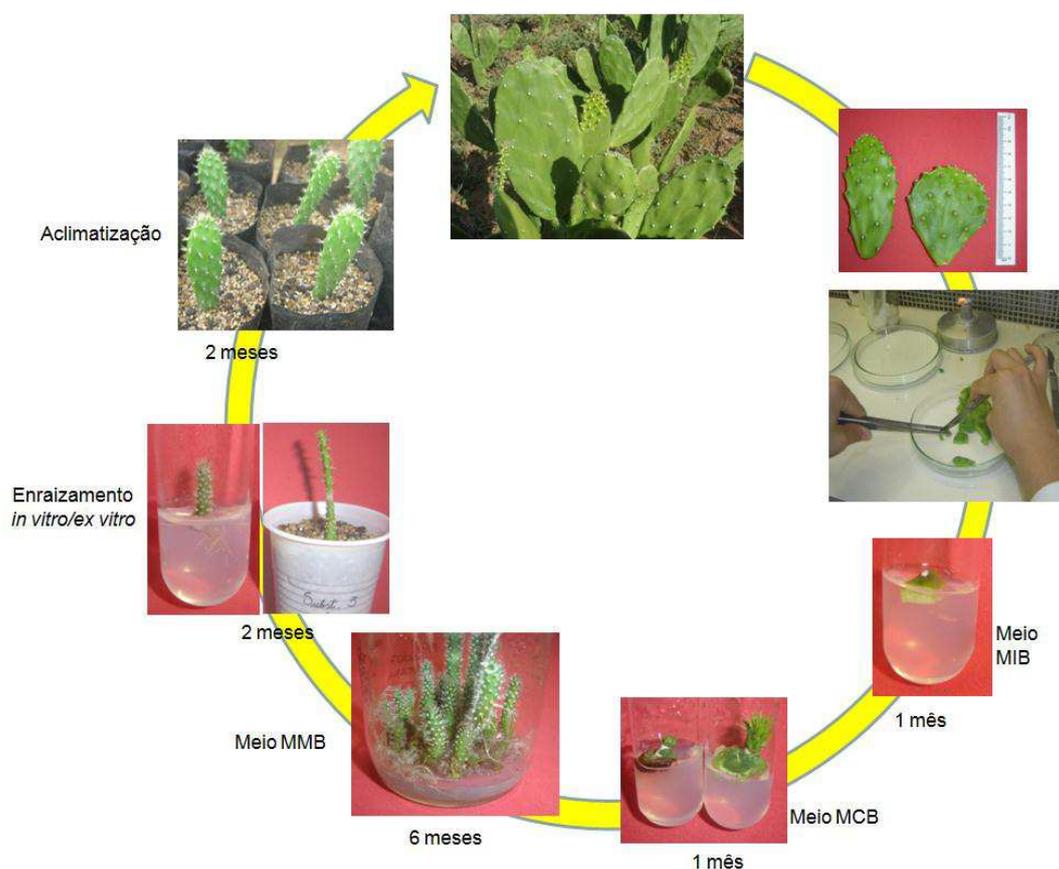
### **e) Enraizamento**

Após seis meses no meio MMB os brotos com tamanhos variando de 1,0-3,0 cm foram enraizados *in vitro*. Os brotos enraizados *in vitro* permaneceram por 60 dias

na sala de crescimento , à temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de  $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Já os brotos enraizados *ex vitro* foram plantados em substrato vermiculita:turfa onde permaneceram por 60 dias em BOD à  $25^\circ\text{C}$ .

Os brotos enraizados *in vitro/ex vitro* foram depois transplantados para saquinhos plásticos contendo terra:areia:esterco (2:1:1) em telado 50%, no Campus de Sumé/CDSA.

Os resultados obtidos nos ensaios de multiplicação referentes à variável número de brotos (NB) foram transformados para  $\sqrt{x+1}$ . Todas as variáveis foram analisadas através do programa de estatística SAS, aplicando-se a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.



**FIGURA 2** - Ciclo de 12 meses de multiplicação *in vitro* de palma forrageira. Etapas: coleta dos cladódios no campo, desinfestação em laboratório, inoculação das gemas axilares no meio de indução de brotos - MIB ( $8,87 \mu\text{M}$  BAP +  $1,43 \mu\text{M}$  AIA), meio de crescimento de brotos - MCB ( $2,22 \mu\text{M}$  BAP +  $1,43 \mu\text{M}$  AIA), meio de multiplicação de brotos - MMB ( $4,44 \mu\text{M}$  BAP +  $1,43 \mu\text{M}$  AIA), enraizamento dos brotos *in vitro/ex vitro*, plantio das plântulas em sacos plásticos na fase de aclimatização e plantio das mudas no campo.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise de variância (em anexo), observou-se que para as variáveis Altura de Brotos (AB) e Número de Brotos (NB), houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os genótipos estudados (G) Miúda e Orelha de Elefante Mexicana, por outro lado, não observou-se diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre as diferentes concentrações de sacarose (S) e BAP (B). Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) referente às duas variáveis, para as interações duplas G x S e G x B, porém houve diferença significativa para a interação S x B ( $p < 0,01$ ) referente à variável AB, assim como para NB ( $p < 0,10$ ), enquanto a interação tripla GxSxB, diferiu significativamente ( $p < 0,01$ ), para ambas variáveis.

O coeficiente de variação (CV%) alto pode ser atribuído às características intrínsecas do próprio material experimental, visto que existiam brotos com tamanhos muito diferentes dentro de um mesmo frasco contendo explantes com multibrotações.

Houve diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) entre os genótipos Miúda e Orelha de Elefante Mexicana referente às variáveis AB e NB, sendo que o primeiro apresentou maior média para a variável NB e o segundo obteve maior média para a variável AB. Contudo, não houve diferença significativa entre as concentrações de sacarose, nem entre as de BAP.

Ao desdobrar a interação tripla GxSxB verificou-se que houve efeito significativo dos fatores Genótipo e Sacarose dentro de cada nível de BAP, referente às variáveis AB e NB, para ambos genótipos, com exceção da variável NB no genótipo Miúda (Tabelas 1 e 2).

Quando se considerou a influência de sacarose dentro de cada nível de BAP observou-se que no genótipo Miúda, houve diferença significativa na concentração de 8,87  $\mu\text{M}$  BAP entre 3% e 5% (p/v) de sacarose, sendo a melhor combinação 8,87  $\mu\text{M}$  BAP com 5% (p/v) de sacarose, para a variável Altura de Brotos (Tabela 1, Figura 3).

Para o genótipo Orelha de Elefante Mexicana, houve diferença significativa nas concentrações de 4,44, 13,31 e 22,19  $\mu\text{M}$  BAP entre 3 e 5 % (p/v) de sacarose, sendo a melhor combinação 22,19  $\mu\text{M}$  BAP com 5% (p/v) de sacarose, para a variável Altura de Brotos (Tabela 1, Figura 3).

**TABELA 1** – Valores médios referentes à variável Altura de Brotos (AB), em resposta aos genótipos Miúda e Orelha de Elefante Mexicana, desenvolvidos em meios de cultura com diferentes combinações de Sacarose (3 e 5% p/v) e BAP (4,44; 8,87; 13,31; 17,74 e 22,19  $\mu\text{M}$ ).

BAP ( $\mu\text{M}$ )	Miúda		Orelha de Elefante Mexicana	
	Sacarose		Sacarose	
	3%	5%	3%	5%
<b>4,44</b>	0,5611 a	0,4811 a	0,8355 a	0,2278 b
<b>8,87</b>	0,1570 b	0,6260 a	0,5390 a	0,4850 a
<b>13,31</b>	0,3087 a	0,6070 a	0,7890 a	0,3000 b
<b>17,74</b>	0,4278 a	0,2600 a	0,4150 a	0,3555 a
<b>22,19</b>	0,1878 a	0,2555 a	0,1000 b	1,0680 a

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ).

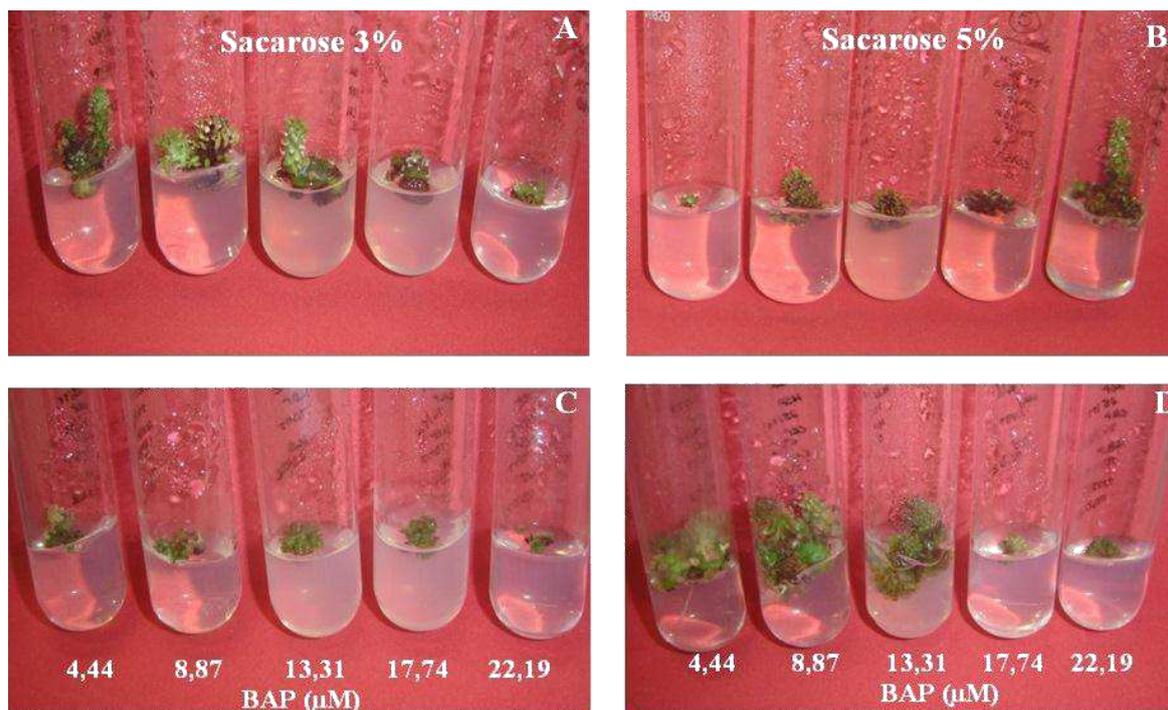
Quando se considerou a influência de sacarose dentro de cada nível de BAP observou-se que no genótipo Orelha de Elefante Mexicana, houve diferença significativa na concentração de 22,19  $\mu\text{M}$  de BAP entre sacarose 3% e 5% (p/v), sendo a melhor combinação 22,19  $\mu\text{M}$  de BAP com 5% (p/v) de sacarose para a variável NB (Tabela 2). Mas, para o genótipo Miúda a melhor combinação entre sacarose e BAP para a variável analisada NB foi 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP com 3% de sacarose (p/v) (Tabela 2).

**TABELA 2** – Valores médios referentes à variável Número de Brotos (NB<sup>#</sup>), em resposta aos genótipos Miúda e Orelha de Elefante Mexicana, desenvolvidos em meios de cultura com diferentes combinações de Sacarose (3 e 5% p/v) e BAP (4,44; 8,87; 13,31; 17,74 e 22,19  $\mu\text{M}$ ).

BAP ( $\mu\text{M}$ )	Miúda		Orelha de Elefante Mexicana	
	Sacarose		Sacarose	
	3%	5%	3%	5%
<b>4,44</b>	1,8572 a	1,6143 a	1,5690 a	1,2654 a
<b>8,87</b>	1,4121 a	1,6911 a	1,5524 a	1,5185 a
<b>13,31</b>	1,6178 a	1,8529 a	1,7539 a	1,5701 a
<b>17,74</b>	1,6027 a	1,4803 a	1,4489 a	1,4472 a
<b>22,19</b>	1,6694 a	1,5094 a	1,3121 b	1,7846 a

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ).

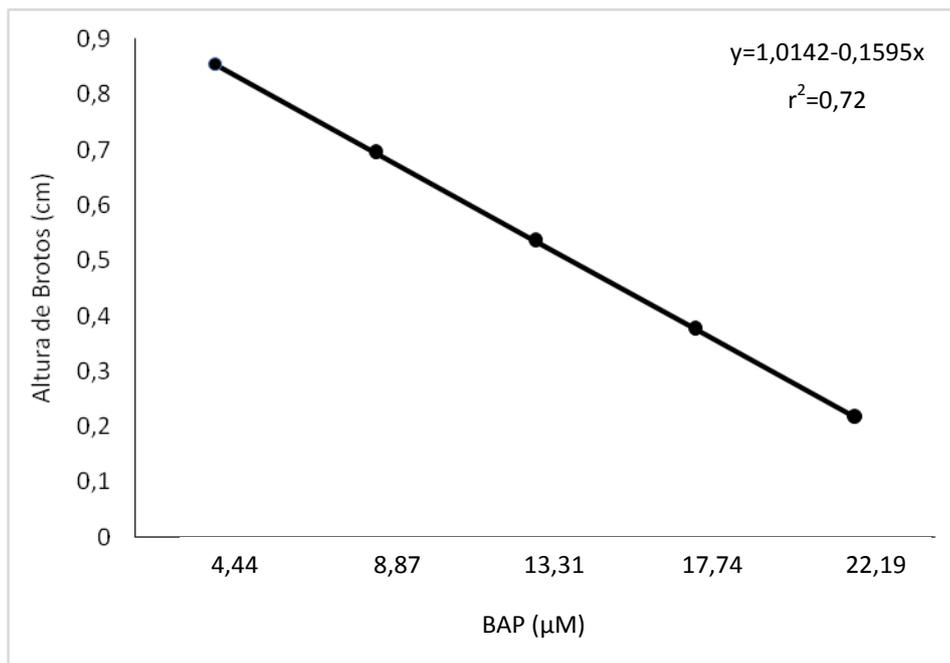
<sup>#</sup>Dados transformados em  $\sqrt{x+1}$



**FIGURA 3** - Multiplicação de brotos dos genótipos Miúda (A-B) e Orelha de Elefante Mexicana (C-D), em diferentes concentrações de sacarose (3 e 5% p/v) e BAP (4,44 a 22,19  $\mu\text{M}$ ), após 70 dias da inoculação *in vitro*.

Com referência à concentração de sacarose, as maiores percentagens de multiplicação *in vitro* em geral ocorrem com o uso de 3% de sacarose, porém, diversos autores (LLAMOCA-ZAROTE, 1999; VILLALOBOS et al., 1995; ESCOBAR et al., 1986) relatam que, para cactáceas do gênero *Opuntia*, a concentração ideal de sacarose é de 5%.

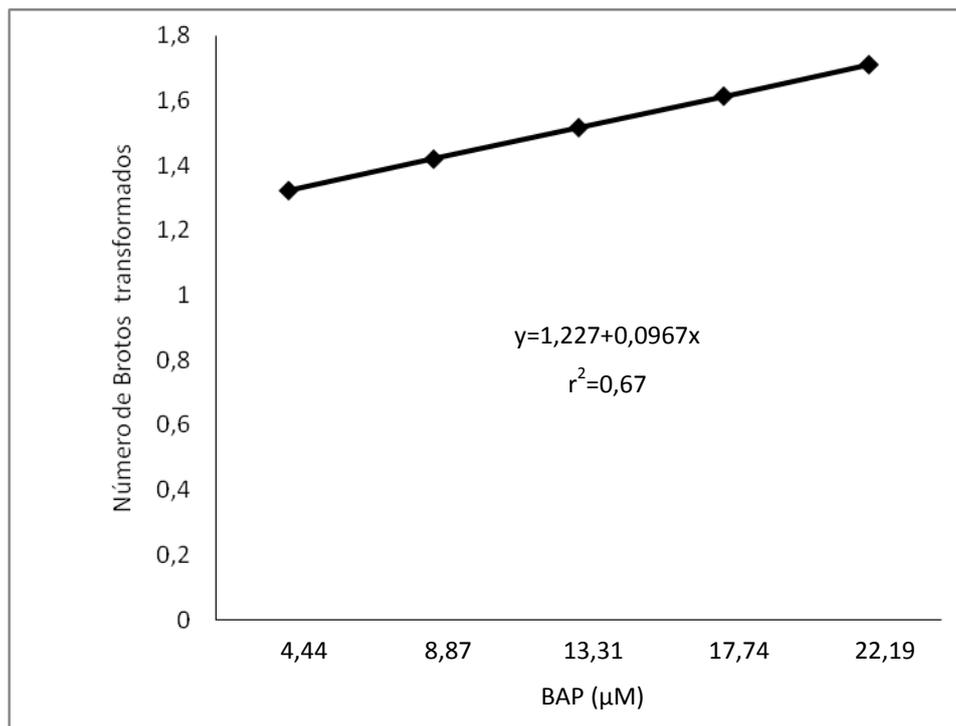
Pode-se observar que, para o genótipo Orelha de Elefante Mexicana com sacarose a 3%, quanto menor a concentração de BAP ( $\mu\text{M}$ ) maior é a altura de brotos (cm) (Figura 4). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Medeiros et al. (2011), que trabalhando *in vitro* com o genótipo Orelha de Elefante Mexicana, obtiveram na ausência de BAP brotos com altura média de 2,2 cm, que foi quase duas vezes superior aos valores obtidos quando os explantes foram induzidos em meios de cultura com concentrações de 1,1  $\mu\text{M}$  (1,28 cm); 2,22  $\mu\text{M}$  (1,13 cm) e 4,44  $\mu\text{M}$  BAP (1,25 cm), suplementados com 3% de sacarose. Aliyu e Mustapha (2007), em ensaios *in vitro* com *Opuntia ficus-indica*, registraram alturas de 1,22 e 1,23 cm nas concentrações 4,44 e 5,55  $\mu\text{M}$  BAP, respectivamente.



**FIGURA 4** – Relação entre concentrações de BAP ( $\mu\text{M}$ ) e Altura de Brotos (cm), no genótipo Orelha de Elefante Mexicana e sacarose a 3% (p/v).

Pode-se observar que, para o genótipo Orelha de Elefante Mexicana a 3% de sacarose, quanto maior a concentração de BAP ( $\mu\text{M}$ ) maior é o número de brotos (cm) (Figura 5). Esses resultados corroboram os de Khalafalla et al. (2007), que observaram o aumento do número de brotos devido ao aumento na concentração de BAP (22,19  $\mu\text{M}$ ), em meio MS para o genótipo *Opuntia ficus-indica*.

Mas, esses resultados diferiram dos relatados por Fogaça et al. (2006), que trabalhando com plântulas de *Agapanthus umbellatus* multiplicadas in vitro em concentrações acima de 17,8  $\mu\text{M}$  BAP, notaram sintomas de fitotoxidez e uma redução severa da emissão de brotos. A citocinina tem como função estimular a formação de parte aérea, porém o seu excesso pode resultar na inibição das brotações, conforme o sistema de cultivo. Por outro lado, esses resultados divergem dos obtidos por Frota et al. (2004), que observaram as melhores médias de proliferação de brotos in vitro de *Opuntia ficus-indica*, em meio suplementado com 4,44  $\mu\text{M}$  BAP e concentração de 5% de sacarose.



**FIGURA 5** – Relação entre Número de Brotos ( $\sqrt{x+1}$ ) e concentrações de BAP ( $\mu\text{M}$ ), no genótipo Orelha de Elefante Mexicana e sacarose a 3% (p/v).

Vasconcelos et al. (2007), estabeleceram protocolo de micropropagação para a cv. Miúda (*Nopalea cochenillifera* - Salm Dyck), tendo concluído que o melhor meio foi o MS suplementado com 3% de sacarose, 4,44  $\mu\text{M}$  BAP e 0,57  $\mu\text{M}$  AIA. Concluíram também que o corte longitudinal dos cladódios na fase de multiplicação, favoreceu a emissão de brotos no meio anteriormente citado e que o meio de cultura MS básico sem reguladores de crescimento, promoveu bom enraizamento dos explantes.

#### 4. CONCLUSÃO

A combinação de 4,44  $\mu\text{M}$  BAP e 3% (p/v) de sacarose em geral satisfaz a multiplicação *in vitro* dos genótipos Miúda e Orelha de Elefante Mexicana.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIYU, B.S.; MUSTAPHA, Y.; Effect of different media on the *in vitro* growth of cactus *Opuntia ficus-indica* explants. **African Journal of Biotechnology**. v. 6, n.11; p.1330-1331, 2007.

BARBERA, G. Historia e importância econômica e agroecologia. In: BARBERA, G., INGLESE, P. PIMIANTA BARRIOS, E (Eds.). **Agroecologia, cultivo e uso da palma forrageira**. SEBRAE: FAO, Paraíba, p. 1-11. 2001.

ESCOBAR, A.; VILLALOBOS, V.M.A.; VILLEGAS M.A. *Opuntia* micropropagation by axillary proliferation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 7, p.269-277, 1986.

FOGAÇA, L.A.; DORTZBACH, D.; ALVES, A.C.; PEDROTTI, E.L. Morphological and physiological characteristics *Agapanthus umbellatus* var. minor of shoots propagated in bioreactor of temporary immersion. **Plant Cell Culture Micropropagation**. v.2, p. 80-87, 2006.

FROTA, H.M.; CARNEIRO, M.S.S.; LLAMOCA-ZÁRATE, R.M.; CAMPOS, F.A.P.; PEIXOTO, M.J.A. Proliferação e enraizamento *in vitro* de brotos de palma forrageira - *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 26, n. 2, p. 235-238, 2004.

KHALAFALLA, M.M.; ABDELLATEF, E.; AHMED, M.M.MOHAMEED, OSMAN, G. Micropropagation of cactus (*Opuntia ficus-indica*) as strategic tool to combat desertification in arid and semi arid regions. **International Journal of Sustainable Crop Production**. v.2, n.4, p.1-8, 2007.

LLAMOCA-ZÁRATE, R.M.; AGUIAR, L.F.; LANDSMANN, J.; CAMPOS, A.P.; Whole plant regeneration from the shoot apical meristem of *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae). **Journal of Applied Botany-Angewandte**, v. 73, p. 83-85, 1999.

LOPES, E.B.; BRITO, C.H.; ALBUQUERQUE, I.C.; BATISTA, J.L. Seleção de genótipos de palma forrageira (*Opuntia* spp.) e (*Nopalea* spp.) resistentes à cochonilha-do-carmim (*Dactylopius opuntiae* Cockerell,1929) na Paraíba, Brasil. **Engenharia Ambiental**, v. 7, n.1, p. 204-215, 2010.

MALDA, G.; SUZA'N, H.; BACKHAUS, R. *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants crassulacean acid metabolism. **Science Horticulture**, v.81, p. 71-87, 1999.

MEDEIROS, E. C.; FARIA, J.M.; CAMARA, T.R.; SILVA, C.U.C.; Aspectos bioquímicos e fisiológicos da palma forrageira *Opuntia stricta* Haw sob distintos sistemas de cultivo *in vitro*. UFRPE. **Dissertação**, 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

SILVA, C.C.F.; SANTOS, L.C. Palma Forrageira (*Opuntia Ficus- Indica* Mill) como alternativa na alimentação de ruminantes. **Revista Electrónica de Veterinaria REDVET**, v.7, n.10, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. São Paulo: Artmed, 2006.

VASCONCELOS, A. G. V. DE; LIRA, M. DE A. CAVALCANTI, V.A.L.B. ,SANTOS, M.V.F. 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.

VASCONCELOS, A.G.V.; LIRA, M.A.; CAVALCANTI, V.A.L.; SANTOS, M.V.; CÂMARA, T.; WILLADINO, L. Micropropagação de palma forrageira cv. Miúda (*Nopalea cochenillifera*- Salm Dyck). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.2, n.1, p.28-31, 2007.

VILLALOBOS, V.M.A. Aplicação do cultivo de tecidos para a micropropagação de *Opuntia* sp. Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira. Roma: FAO Produção e Proteção vegetal, 1995. Tradução (Sebrae/PB), n.132, p. 72-78, 2001.

WARUMBY, J.F.; ARRUDA FILHO, G.P.; CAVALCANTI, V.A.L.B. Pragas da palma. In: MENEZES, R.S.C; SIMÕES, D.A.; SAMPAIO, E.V.S.B (Eds.). **A palma no Nordeste do Brasil**. 1.ed. Recife: UFPE, Editora Universitária, 2005. p. 65-80.

### **CAPÍTULO 3 - ENRAIZAMENTO *EX VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS *IN VITRO* DE PALMA FORRAGEIRA RESISTENTE À COCHONILHA-DO-CARMIM**

**RESUMO** - A palma forrageira é bem adaptada às condições do semiárido por suportar grandes períodos de estiagem, sendo utilizada na alimentação animal principalmente neste período, mas devido ao ataque da cochonilha-do-carmim os plantios na região nordestina vêm sendo devastados, causando grande prejuízo aos agricultores. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a multiplicação *in vitro* e o enraizamento *ex vitro* de brotos micropropagados de palma forrageira do genótipo Baiana, resistente à cochonilha-do-carmim, induzidos por reguladores de crescimento. Os experimentos foram conduzidos em três etapas: estabelecimento das gemas, proliferação de brotos e enraizamento *ex vitro* dos brotos. As variáveis analisadas foram número de brotos, média da altura da parte aérea da plântula, comprimento da maior raiz e peso da plântula. O tratamento MSB1 obteve os melhores resultados para número de brotos e média da altura da parte aérea da plântula quando comparado aos tratamentos MSB2 e MSB3. Os melhores resultados para comprimento da maior raiz, média da altura da parte aérea da plântula e peso da plântula foram obtidos no tratamento de enraizamento ED2. Pode-se concluir que todas as associações de 4,44  $\mu\text{M}$  de 6-benzilaminopurina (BAP) com 0,54  $\mu\text{M}$  de ácido  $\alpha$ -naftaleno acético (ANA) ou com 0,57  $\mu\text{M}$  de ácido indolacético (AIA) ou com 0,49  $\mu\text{M}$  de ácido indolbutírico (AIB), induziram a formação de brotos *in vitro* na palma forrageira; o enraizamento *ex vitro* não necessita da utilização dos reguladores de crescimento AIA (5,71  $\mu\text{M}$ ) e AIB (4,90  $\mu\text{M}$ ) para indução de raízes nos brotos micropropagados; o enraizamento *ex vitro* dos brotos e a aclimatização das plântulas respondem satisfatoriamente à utilização do substrato previamente esterilizado composto por vermiculita.

**Palavras-chaves:** *Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck, reguladores de crescimento, raízes.

### **CHAPTER 3 - EX VITRO ROOTING AND ACLIMATIZATION OF PLANTS IN VITRO MICROPROPAGATED OF CACTUS PEAR RESISTANT TO THE CARMINE COCHINEAL**

**ABSTRACT** - The cactus pear is well adapted to semi-arid conditions as it withstands long periods of drought, and is used mainly as animal feed in this period, but due to the attack of the carmine cochineal, plantations in the northeastern region have been devastated, causing great damage to farmers. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* multiplication and *ex vitro* rooting of micropropagated shoots of cactus pear genotype “Baiana”, resistant to the carmine cochineal, induced by growth regulators. The experiments were conducted in three stages: establishment of the buds, shoot proliferation and *ex vitro* rooting of shoots. The variables analyzed were number of shoots, average of height of the aerial part of plantlet, the longest root length and weight of the plantlet. The MSB1 treatment achieved the best results for number of shoots and average height of the aerial part of plantlet when compared to MSB2 and MSB3 treatments. The best results for the longest root length, average of height of aerial part of plantlet and weight of the plantlet, were obtained in the rooting treatment ED2. It can be concluded that all associations of 4.44  $\mu\text{M}$  6-benzylaminopurine (BA) with 0.54  $\mu\text{M}$  of  $\alpha$ -naphthalene acetic acid (NAA) or with 0.57  $\mu\text{M}$  of indole-3-acetic acid (IAA) or with 0.49  $\mu\text{M}$  of indole-3-butyric acid (IBA), induced the formation of shoots *in vitro* in cactus pear. *Ex vitro* rooting doesn't require the use of growth regulators IAA (5.71  $\mu\text{M}$ ) and IBA (4.90  $\mu\text{M}$ ) on root induction in micropropagated shoots; *ex vitro* rooting of shoots and plantlets acclimatization respond satisfactorily to the use of sterilized substrate composite for vermiculite.

**Keywords:** *Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck, growth regulators, roots.

## 1. INTRODUÇÃO

A sazonalidade da produção de forragem na região semiárida é provocada principalmente pela distribuição irregular das chuvas, associada a outras características climáticas e a deficiências no manejo das forrageiras. A palma é uma forrageira bem adaptada às condições do semiárido, suportando grandes períodos de estiagem, devido às suas propriedades fisiológicas caracterizadas por um processo fotossintético eficiente, conhecido como Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM), além disso, esta cultura possui uma série de mecanismos que a torna capaz de conservar água (SANTOS et al., 2006). A produção de palma no Semiárido se apresenta como uma excelente alternativa para amenizar o problema da seca em várias regiões do mundo. Sua utilização como forragem animal é amplamente conhecida, porém, as *Opuntias* atuam como uma fonte inesgotável de produtos e funções, em especial para regiões áridas e semiáridas, que estão relacionadas à economia de subsistência (LLAMOCA-ZÁRATE; AGUJAR; LANDSMANN; 1999).

Por esta razão, a palma forrageira das espécies *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill e *Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck têm sido largamente utilizadas no Nordeste brasileiro, visando à suplementação alimentar dos animais nos períodos críticos do ano. Entretanto, alguns estados nordestinos, onde a palma é cultivada, os plantios vêm sendo atacados pelo inseto conhecido como cochonilha-do-carmim (*Dactylopius* sp - Hemiptera, Dactylopidae), provocando perdas significativas para os pecuaristas. A cochonilha-do-carmim é uma das diversas espécies do gênero *Dactylopius* que produz o corante carmim e foi introduzido no Brasil pelas indústrias para ser utilizado como corante alimentício e têxtil. Essas espécies são criadas em cactáceas e podem se transformar em pragas se a cultura não for conduzida tecnicamente ou se forem disseminadas livremente nas plantas cultivadas (WARUMBY et al., 2005). Atualmente, a cochonilha-do-carmim tornou-se um grave problema fitossanitário para a produção de palma nas regiões onde são cultivadas, com o objetivo de alimentar os animais nos tempos de estiagem.

Uma alternativa econômica e amigável ao meio ambiente e ao homem, para o cultivo da palma em regiões atacadas por esse inseto, é o plantio de clones resistentes. Em trabalhos de seleção de clones resistentes à cochonilha-do-carmim, as cultivares de palma forrageira "Baiana" e "Miúda" (*Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck) e "Orelha de Elefante Mexicana" (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill), vêm se destacando como resistentes

(VASCONCELOS et al., 2002; LOPES et al., 2010). Lopes et al. (2010), fizeram a seleção de genótipos de palma forrageira (*Opuntia* spp.) e (*Nopalea* spp.) resistentes à cochonilha-do-carmim na Paraíba e concluíram que os genótipos Baiana, Miúda, Orelha de Elefante Africana, Orelha de Elefante Mexicana, Orelha de Onça e Palma Azul, são resistentes. Os mesmos autores concluíram também que os genótipos Palma ornamental (*Opuntia stricta*), X-Italiana, Palma Gigante, F5, F8, F11, V12, IPA-Clone 20, Orelha-de-onça, Redonda, Branco São Pedro, Formosa, Língua-de-vaca e Gigantona, são suscetíveis à cochonilha-do-carmim.

Na propagação convencional a implantação da cultura requer grande quantidade de material. A palma pode ser propagada por cladódio inteiro ou partido ao meio, em corte transversal ou longitudinal; contudo, a sua aquisição e transporte, torna-se um problema principalmente quando o plantio é realizado em locais distantes das áreas produtoras. Embora a propagação vegetativa seja utilizada tradicionalmente, a necessidade de grandes quantidades, de material vegetativo, demandadas por extensas plantações de palma, 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 vegetais.

As técnicas de cultura 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 eficiente para *Opuntia aemulata*, de acordo com o qual em 100 dias foi possível obter 25.000 plantas provenientes de um cladódio de cerca de 5,0 cm. Entretanto, o enraizamento de brotos micropropagados é uma etapa realizada classicamente *in vitro* (DE KLEERK et al., 1997), aumentando os custos de produção (FERRI et al., 1998). De acordo com Augusto et al. (2006) o enraizamento *ex vitro* diretamente no substrato apresenta como vantagens a redução de perdas associadas à aclimatização, bem como a diminuição dos custos de produção da micropropagação em comparação ao enraizamento *in vitro*.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a multiplicação *in vitro* e o enraizamento *ex vitro* de palma forrageira do genótipo Baiana, resistente à cochonilha-do-carmim.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos de micropropagação e de enraizamento *ex vitro* da palma forrageira genótipo Baiana, resistente à cochonilha-do-carmim, foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, da Embrapa Algodão, Campina Grande, PB. Os experimentos foram conduzidos em três etapas: estabelecimento das gemas, proliferação de brotos e enraizamento *ex vitro*.

Os cladódios foram obtidos no campo experimental do CDSA/UFCG Campus Sumé, PB, com tamanho variando entre 8,0 e 12,0 cm de comprimento. No laboratório, os cladódios foram lavados com água corrente, em seguida desinfestados em álcool 70% e posteriormente imersos em solução de hipoclorito de sódio a 5%, contendo uma gota de Tween 20 para cada 100 ml de solução, sendo agitados manualmente durante 15 minutos.

Após os procedimentos de desinfestação, realizados na câmara de fluxo laminar, foram excisadas dos cladódios as gemas axilares, com tamanho de aproximadamente 5,0 mm<sup>3</sup>, posteriormente cultivadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com BAP (8,87 µM) + AIA (1,425 µM) (PEIXOTO, 2004), 3% de sacarose, 0,6% de ágar e pH ajustado em 5,7, para o estabelecimento do cultivo. Após a inoculação, foram mantidas na sala de crescimento por 30 dias, em uma temperatura de 25 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 25 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Decorrido esse período, os explantes foram transferidos para o meio MS adicionado com 2,22 µM BAP e 1,425 µM AIA, para promover o seu alongamento.

No primeiro experimento, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos (MSB1, MSB2 e MSB3), tendo como unidade experimental um frasco de cultivo, com dez frascos por tratamento e três explantes por frasco. Após 30 dias do alongamento, os brotos desenvolvidos *in vitro*, foram seccionados longitudinalmente e depois transversalmente em segmentos de aproximadamente 3,0 mm de comprimento, cultivados em meio MS suplementado com 4,44 µM BAP + 0,54 µM ANA (MSB1); 4,44 µM BAP + 0,57 µM AIA (MSB2) e 4,44 µM BAP + 0,49 µM AIB (MSB3). Todos os meios foram suplementados com 3% de sacarose, 0,6% de ágar e pH ajustado em 5,7.

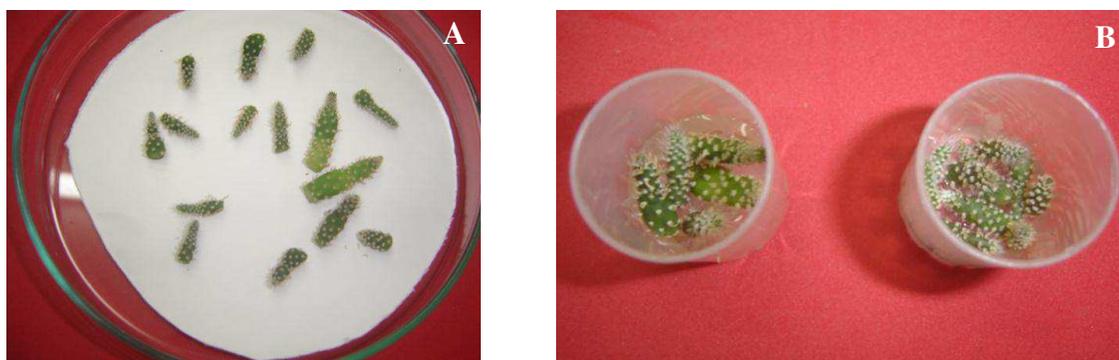
A avaliação foi realizada aos 180 dias, entretanto, a cada 30 dias os explantes foram subcultivados para novos meios com a mesma composição dos meios de proliferação (MSB1, MSB2 e MSB3), sendo observada qual combinação de citocinina e auxina respondeu a indução em menor espaço de tempo. Na avaliação, foram consideradas as

seguintes variáveis: número de brotos (NB) e média da altura da parte aérea da plântula (mAPA).

No segundo experimento, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos (ED1, ED2 e ED3) e repetições variadas, sendo o primeiro tratamento com 23 e os demais com 24 repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Os brotos foram excisados, e suas bases imersas nas seguintes soluções: ED1: água destilada esterilizada (controle), ED2: 5,71  $\mu\text{M}$  AIA e ED3: 4,90  $\mu\text{M}$  AIB, durante 10 minutos, e em seguida plantados em bandejas de isopor contendo o substrato vermiculita autoclavada, mantidos sob uma estrutura fechada com cobertura plástica, em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de  $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , por 45 dias (Figura 1A-B). A cada dois dias a cobertura plástica era aberta e recebia pulverização de água destilada para manter a umidade. Em seguida, as bandejas de isopor foram transferidas para casa de vegetação. Após 60 dias de cultivo, as plântulas foram removidas das bandejas e avaliadas levando-se em consideração as seguintes variáveis: comprimento da maior raiz (CMR), média da altura da parte aérea da plântula (mAPA), peso da plântula (PP).

O genótipo Baiana foi escolhido para esse ensaio por apresentar um grande número de brotos disponíveis para serem utilizados e por não haver brotos suficientes dos demais genótipos Miúda e Orelha de Elefante Mexicana.

Os resultados obtidos nos ensaios de proliferação referentes à variável número de brotos (NB) foram transformados para  $\sqrt{x+1}$ . Todas as variáveis foram analisadas através do programa de estatística SAS, aplicando-se a análise de variância (teste F) e o teste de Tukey a 5% de significância.



**FIGURA 1** – (A) Brots micropropagados e isolados para enraizamento. (B) Imersão da base dos brotos em água (controle) ou em auxinas.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os brotos de palma forrageira do genótipo Baiana foram cultivados em meio MS suplementado com diferentes auxinas associadas a 4,44  $\mu\text{M}$  BAP, a fim de que ocorresse a proliferação dos mesmos. Observou-se que não foram detectados efeitos significativos entre os tratamentos, referentes às variáveis NB e mAPA, contendo as auxinas ANA, AIA ou AIB combinadas com 4,44  $\mu\text{M}$  BAP, nos meios MSB1, MSB2 e MSB3; embora os brotos oriundos do meio MSB2 tenham apresentado melhor aspecto visual, o tratamento MSB1 superou os demais no número de brotos e na média da altura da parte aérea da plântula (Tabela 1, Figura 2A).

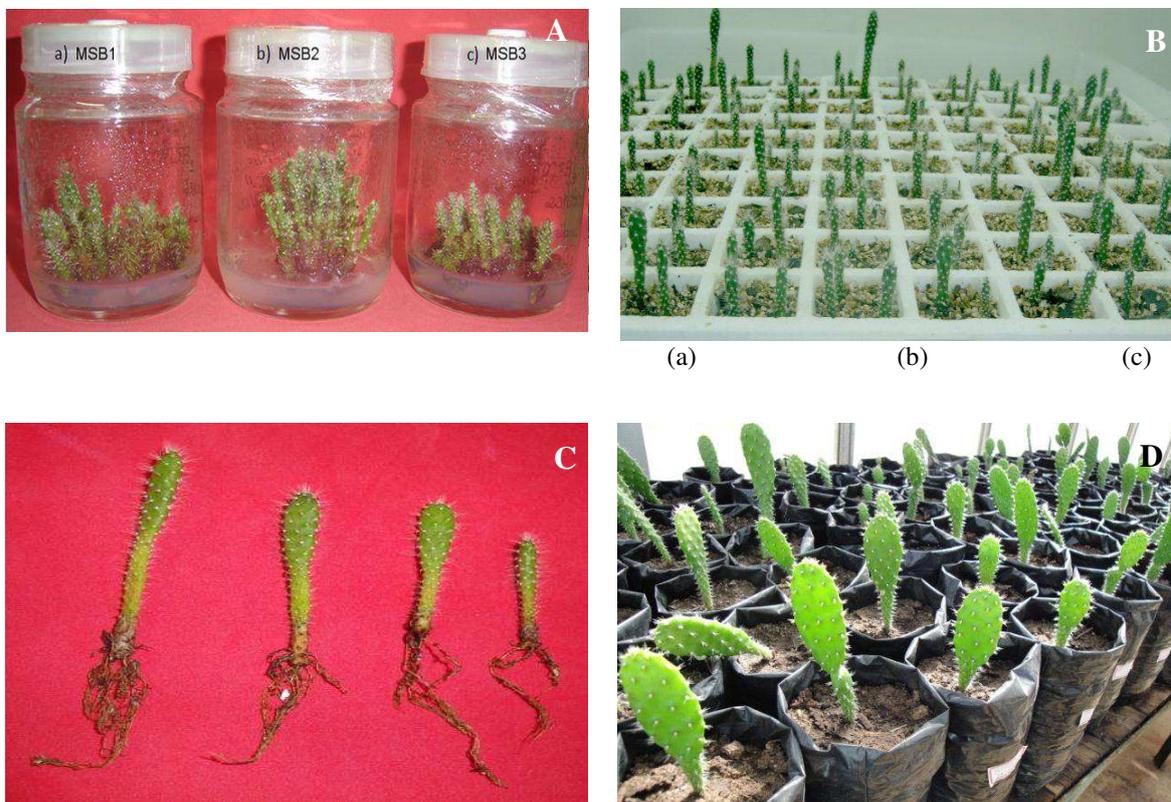
**TABELA 1** - Valores médios referentes às variáveis Número de Brotos (NB), média da Altura da Parte Aérea da Plântula (mAPA) em resposta aos tratamentos com diferentes combinações de 4,44  $\mu\text{M}$  BAP + 0,54  $\mu\text{M}$  ANA (MSB1); 4,44  $\mu\text{M}$  BAP + 0,57  $\mu\text{M}$  AIA (MSB2) e 4,44  $\mu\text{M}$  BAP + 0,49  $\mu\text{M}$  AIB (MSB3).

<b>Tratamento</b>	<b>NB*</b>	<b>mAPA</b>
<b>MSB1</b>	3,02	1,73
<b>MSB2</b>	2,34	1,39
<b>MSB3</b>	2,43	1,79

\*Dados transformados em  $\sqrt{x+1}$ .

Entretanto, Khalafalla et al. (2007) estudando a micropropagação de palma forrageira *Opuntia ficus-indica*, utilizando 0,0 a 22,19  $\mu\text{M}$  BAP e Cinetina isoladamente ou associados com ANA, verificaram que houve diferença significativa entre os tratamentos, tendo obtido o melhor resultado para número de brotos por explante, em média 26,5 brotos quando utilizaram 22,19  $\mu\text{M}$  BAP isoladamente e 17,8 brotos para combinação 22,19  $\mu\text{M}$  BAP e 2,69  $\mu\text{M}$  ANA. Por outro lado neste estudo se obteve em média 13,3 brotos numa menor concentração de BAP (4,44  $\mu\text{M}$ ) associado às auxinas ANA (0,54  $\mu\text{M}$ ), AIA (0,57  $\mu\text{M}$ ) ou AIB (0,49  $\mu\text{M}$ ). Resultados semelhantes a esta pesquisa foram confirmados por Vasconcelos et al. (2007), no estabelecimento de protocolo de micropropagação para a cultivar Miúda, onde verificaram que o melhor meio foi o MS, suplementado com 3% de sacarose, 4,44  $\mu\text{M}$  BAP e 0,57  $\mu\text{M}$  AIA. Estudos

realizados com *O. ellisiana* Griff. utilizando meio MS suplementado com  $9,97 \mu\text{M}$  BAP e  $9,80 \mu\text{M}$  AIB, obtiveram 100% de brotação (JUAREZ; PASSERA, 2002).



**FIGURA 2** - Micropropagação da palma forrageira do genótipo Baiana resistente à cochonilha-do-carmim: (A) Proliferação utilizando diferentes combinações de reguladores de crescimento: **a)**  $4,44 \mu\text{M}$  BAP +  $0,54 \mu\text{M}$  ANA (MSB1); **b)**  $4,44 \mu\text{M}$  BAP +  $0,57 \mu\text{M}$  AIA (MSB2); **c)**  $4,44 \mu\text{M}$  BAP +  $0,49 \mu\text{M}$  AIB (MSB3) após 180 dias de subcultivo; (B) Enraizamento de brotos *ex vitro*, após 60 dias de cultivo em: **a)** água destilada autoclavada (controle); **b)**  $5,71 \mu\text{M}$  AIA e **c)**  $4,90 \mu\text{M}$  AIB; (C) Desenvolvimento radicular das plântulas; (D) Aclimatização das plântulas em condições de casa de vegetação.

Estudos prévios têm apontado que a combinação de fitorreguladores ótima deve ser única para cada espécie de cacto (JOHNSON; EMINO, 1977). Entretanto, Clayton et al. (1990) citaram que baixos níveis de auxina com citocinina aumentaram a produção de brotos axilares em algumas espécies de cactos.

Quanto à análise de variância das variáveis: comprimento da maior raiz, média da altura da parte aérea da plântula e peso da plântula, de brotos cujas bases foram submetidas

à imersão em água ou em 5,71  $\mu\text{M}$  AIA ou 4,90  $\mu\text{M}$  AIB, houve efeitos significativos entre os tratamentos.

Na Tabela 2 encontram-se os valores médios de três tratamentos, com imersão da base dos brotos em: água destilada (controle), solução de AIA ou AIB, com relação às variáveis CMR, mAPA e PP. Observou-se que, o comprimento da maior raiz no tratamento ED2 (5,71  $\mu\text{M}$  AIA) foi superior ao tratamento ED3 (4,90  $\mu\text{M}$  AIB), entretanto foi diferente significativamente do controle (imersão em água). Observou-se ainda na mesma tabela que as variáveis mAPA e PP se comportaram da mesma maneira que a variável CMR (Figura 2C).

**TABELA 2** - Valores médios referentes às variáveis: Comprimento da Maior Raiz (CMR), Altura da Parte Aérea da Plântula (mAPA) e Peso da Plântula (PP), em resposta aos tratamentos: ED1) imersão em água destilada (controle); ED2) imersão em 5,71  $\mu\text{M}$  AIA e ED3) imersão em 4,90  $\mu\text{M}$  AIB).

<b>Tratamento</b>	<b>CMR</b>	<b>mAPA</b>	<b>PP</b>
<b>ED1</b>	3,69 b	3,86 b	0,53 b
<b>ED2</b>	4,76 a	4,96 a	0,84 a
<b>ED3</b>	4,21 ab	4,69 ab	0,64 ab

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Juarez e Passera (2002), obtiveram 100% de plantas enraizadas *in vitro* em meio contendo 24,60  $\mu\text{M}$  AIB. Este resultado foi semelhante ao obtido neste trabalho, quando se utilizou a imersão dos brotos numa solução de 4,90  $\mu\text{M}$  AIB ou 5,71  $\mu\text{M}$  AIA ou em água destilada (Figura 2B-C).

Frota et al. (2004), avaliaram o efeito do BAP e AIA na proliferação e enraizamento de palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill), concluindo que os melhores protocolos para a proliferação e enraizamento de brotos foram, respectivamente, 4,44  $\mu\text{M}$  BAP e 28,54  $\mu\text{M}$  AIA.

Khalafalla et al. (2007), obtiveram 100% de enraizamento no meio MS sem regulador de crescimento ou suplementado com 2,85  $\mu\text{M}$  AIA, embora o maior número de

raízes e maior altura da parte aérea tenham sido obtidos em meio MS suplementado com AIA.

Paiva e Gomes (2001), afirmam que o meio influencia na qualidade do sistema radicular e não apenas na porcentagem de enraizamento, ponderando que o tipo de raiz influencia na adaptação das plantas ao meio *ex vitro*. Grattaplagia e Machado (1990), ressaltaram que quanto mais curtas as raízes, mais ativo é o seu crescimento e maior a probabilidade de adequação das plantas.

A aclimatização de plântulas micropropagadas de palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill) em diferentes substratos, foi avaliada por Peixoto (2004), tendo concluído que o substrato contendo solo + esterco bovino nas proporções (2:1 ou 1:1) proporcionou o melhor desenvolvimento das mudas micropropagadas.

O enraizamento *ex vitro* e aclimatização associada possibilitam a obtenção de plantas com maior capacidade de enraizamento e maior velocidade de crescimento inicial, visto que as raízes produzidas *in vitro* não são funcionais e morrem após a transferência para substrato, sendo necessário produzir novas raízes após a passagem para as condições *ex vitro* (DEBERG; MAENE, 1981). Xavier (1997), também comprovou que a utilização do enraizamento *ex vitro* tende a produzir um sistema radicular mais completo e funcional, evitando-se a manipulação de plantas de raiz nua; bem como a regeneração de raízes diretamente no substrato tende a produzir um sistema radicular com maior número de raízes secundárias sem a formação intermediária de calos, que dificultam a conexão entre caule e raiz. De acordo com Scherwinski-Pereira e Fortes (2004), o substrato deve apresentar boa retenção de água e ar, sendo o tipo de substrato um dos fatores mais importantes no enraizamento *ex vitro*, e no caso da palma forrageira, a vermiculita previamente esterilizada foi um bom substrato para a aclimatização da mesma (Figura 2D).

Carvalho et al. (2005), trabalhando com o enraizamento *ex vitro* de mamona a partir de brotos micropropagados *in vitro*, após testarem várias concentrações de AIA, concluíram que o maior percentual de enraizamento (75%) foi obtido na concentração 0,71  $\mu\text{M}$ , como também constataram que os brotos maiores que 2,0 cm enraizavam satisfatoriamente e sobreviviam.

#### 4. CONCLUSÃO

As associações da citocinina com as auxinas induzem brotos na palma forrageira de genótipo Baiana; o enraizamento *ex vitro* da palma forrageira genótipo Baiana dispensa a utilização de reguladores de crescimento na indução de raízes; a aclimatização e enraizamento *ex vitro* das plântulas, respondem satisfatoriamente à utilização do substrato vermiculita.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUGUSTO, C. S. S.; BIASI, L.A.; TELLES, C. A. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de amoreira-preta cv. Brazos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n.3, p. 473-476, 2006.

CARVALHO, J.M.F.C.; RIBEIRO, C.S.N.; SILVA, H.; SANTOS, J.W. **Enraizamento *ex vitro* da cultivar de mamona BRS Nordestina a partir de brotos micropropagados *in vitro***. Comunicado Técnico, CNPA/Embrapa, n. 250, 2005. 3p.

CLAYTON, P.W.; HUBSTENBERGER, J.F.; PHILLIPS, G.C. Micropropagation of members of the Cactaceae Subtribe Cactinae. **American Society Horticultural Science**, v.115, n.2, p.337-343, 1990.

DE KLERK, G.J.; BRUGGE, J.T., MARINOVA, S. Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthalenacetic acid during adventitious root formation *in vitro* in Malus 'Jork 9'. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.49, p.39-44, 1997.

DEBERGH, P.C.; MAENE, L.J. A scheme for comercial propagation for ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, n.14, p.35-45, 1981.

ESCOBAR, A.; VILLALOBOS, V.M.A.; VILLEGAS M.A. *Opuntia* micropropagation by axillary proliferation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 7, p.269-277, 1986.

FERRI, V.C.; CENTELLAS, A.Q.; HELBIG, V.E.; FORTES, G.R.L. Uso de ágar, amido e ácido indolbutírico no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de maceira MM 111. **Ciência Rural**, v. 28, n.4. p. 561-565, 1998.

FROTA, H.M.; CARNEIRO, M.S.S.; LLAMOCA-ZÁRATE, R.M.; CAMPOS, F.A.P.; PEIXOTO, M.J.A. Proliferação e enraizamento *in vitro* de brotos de palma forrageira - *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 26, n. 2, p. 235-238, 2004.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa-CNPH. 1990. p. 99-169.

JOHNSON, J. M.; EMINO, E.R. Propagation of selected cactus species by tissue culture. **Hort Science**, v.12, n.4, p. 404, 1977.

JUÁREZ, M.C.; PASSERA, C.B. *In vitro* propagation of *Opuntia ellisiana* Griff. and acclimatization to field conditions. **Biocell**, v.26, n.3, p.319-324, 2002.

KHALAFALLA, M.M.; ABDELLATEF, E.; AHMED, M.M.M., OSMAN, G. Micropropagation of cactus (*Opuntia ficus-indica*) as strategic tool to combat desertification in arid and semi arid regions. **International Journal of Sustainable Crop Production**, v.2, n.4, p.1-8, 2007.

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**, v.73, p.83-85, 1999.

LOPES, E.B.; BRITO, C.H.; ALBUQUERQUE, I.C.; BATISTA, J.L. Seleção de genótipos de palma forrageira (*Opuntia* spp.) e (*Nopalea* spp.) resistentes à cochonilha-do-carmim (*Dactylopius opuntiae* Cockerell,1929) na Paraíba, Brasil. **Engenharia Ambiental**, v. 7, n.1, p. 204-215, 2010.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

PAIVA, H. N.; GOMES, J. M. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 46p. (Boletim 322)

PEIXOTO, M.J.A. **Aclimatização de plantas micropropagadas de palma forrageira *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill, em diferentes substratos**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004. 46p.

SANTOS, D.C. DOS; FARIAS, I. LIRA, M. DE A. SANTOS, M.V.F. DOS; ARRUDA, G.P.; COELHO, R.S.B; DIAS, F.M.; MELO, J.N. **Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia e Nopalea*) em Pernambuco**. Recife, IPA, (Documento 30), 48p. 2006.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E.; FORTES, G.R.L. Produção de mudas pré-básicas de batatas por estaquia a partir de plantas micropropagadas. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.2, p.186-192, 2004.

VASCONCELOS, A. G. V. DE; LIRA, M. DE A. CAVALCANTI, V.A.L.B. ,SANTOS, M.V.F. 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.

VASCONCELOS, A.G.V.; LIRA, M.A.; CAVALCANTI, V.A.L.; SANTOS, M.V.; CÂMARA, T.; WILLADINO, L. Micropropagação de palma forrageira cv. Miúda (*Nopalea cochenillifera*- Salm Dyck). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.2, n.1, p.28-31, 2007.

WARUMBY, J.F.; ARRUDA FILHO, G.P.; CAVALCANTI, V.A.L.B. Pragas da palma. In: MENEZES, R.S.C; SIMÕES, D.A.; SAMPAIO, E.V.S.B (Eds.). **A palma no Nordeste do Brasil**. 1.ed. Recife: UFPE, Editora Universitária, 2005. p. 65-80.

XAVIER, A.; COMERCIO, J. Enraizamento *ex vitro* de gemas de *Eucalyptus* spp. multiplicadas e alongadas *in vitro*. **Scientia Florestalis**, n.5, p.29-36, 1997.

## ANEXOS

### CAPÍTULO 2

**ANEXO I** - Análise de variância referente às variáveis: Altura de Brotos (AB) e Número de Brotos (NB), em resposta aos fatores de variação (FV): Genótipo (G), Sacarose (S), BAP (B) e suas interações.

FV	GL	QM	
		AB	NBt <sup>#</sup>
Genótipo (G)	1	0,7588 *	0,5254*
Sacarose (S)	1	0,1142 ns	3,2x10 <sup>-6</sup> ns
BAP (B)	4	0,1846 ns	0,2382 ns
GxS	1	0,2504 ns	4,23x10 <sup>-5</sup> ns
GxB	4	0,1777 ns	0,1344 ns
SxB	4	1,1018**	0,2872 °
GxSxB	4	1,0790**	0,4061**
Erro	168	0,1795	0,1248
<b>CV %</b>		<b>93,45</b>	<b>22,41</b>

° Significativo (p < 0,10)

\* Significativo (p < 0,05)

\*\* Significativo (p < 0,01)

ns: não significativo (p > 0,05)

# Dados transformados em  $\sqrt{x+1}$

### CAPÍTULO 3

**ANEXO I** - Análise de variância referente às variáveis: Número de Brotos (NB) e média da Altura da Parte Aérea da Plântula (mAPA), em resposta aos tratamentos: meios MSB1 (4,44 µM BAP + 0,54 µM ANA), MSB2 (4,44 µM BAP + 0,57 µM AIA) e MSB3 (4,44 µM BAP + 0,49 µM AIB).

FV	GL	NBt*	mAPA
<b>Tratamentos</b>	2	1,380 ns	0,460 ns
<b>Erro</b>	27	1,145	0,914
<b>CV (%)</b>		<b>41,20</b>	<b>58,6</b>

\*Dados transformados em  $\sqrt{x+1}$

ns: Não significativo (p > 0,05)

**ANEXO II** - Análise de variância referente às variáveis: Comprimento da Maior Raiz (CMR), média da Altura da Parte Aérea da Plântula (mAPA) e Peso da Plântula (PP), em resposta aos tratamentos: a) imersão em água (Controle); b) imersão em 5,71  $\mu\text{M}$  AIA; c) imersão em 4,90  $\mu\text{M}$  AIB.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>CMR</b>	<b>mAPA</b>	<b>PP</b>
<b>Tratamentos</b>	2	6,7454*	7,6772*	0,5478**
<b>Erro</b>	68	1,9878	2,4086	0,1115
<b>CV (%)</b>		33,34	34,40	49,70

\* Significativo ( $p < 0,05$ )      \*\* Significativo ( $p < 0,01$ )