

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE PALMA FORRAGEIRA *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill PARA CULTIVO NO SEMIÁRIDO DO RIO GRANDE DO NORTE

M. DE F. B. DUTRA¹, M. H. I. ALLOUFA², N. F. DE MELO³, J. I. P. LEITE⁴

Universidade Federal do Rio Grande do Norte^{1,2}, Universidade Estadual de Feira de Santana³, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte⁴

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-5923-0674>¹

mfbdutra@hotmail.com¹

Submetido 14/06/2020 - Aceito 18/12/2020

DOI: 10.15628/holos.2020.10420

RESUMO

A propagação em laboratório de variedades de palma forrageira selecionadas e tolerantes a cochonilha-do-carmim (*Dactylopius opuntiae*) é uma alternativa viável para a conservação e uso sustentável de espécies adaptadas ao bioma caatinga, particularmente cactáceas. O objetivo da presente pesquisa foi testar o efeito de diferentes meios de cultura *in vitro* na produção de dois genótipos de palma forrageira, tolerantes a cochonilha-do-carmim, utilizando a biotecnologia como ferramenta para multiplicação rápida. Fragmentos de cladódios das duas variedades de palma, miúda e orelha de elefante, foram cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog (1962), contendo reguladores de crescimento em concentrações que variaram de 0,0 a 2,0 mg.L⁻¹ de BAP e de 0,0 a 0,25 mg.L⁻¹ de ANA ou AIA, com delineamento experimental inteiramente casualizado em dois

experimentos (um para cada variedade), sendo: 15 tratamentos de 3 doses de auxinas (AIA ou ANA) x 5 doses de citocinina e 5 repetições. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada 25 ± 2°C, sob fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro e umidade relativa de 70%. As avaliações foram realizadas aos 120 dias. Quando submetemos os explantes a primeira bateria de testes (BAP x AIA), verificou-se que não houve influência na altura, número de brotos ou número de raízes para ambas as variedades, já na segunda bateria (BAP x ANA) houveram respostas diferentes de acordo com a combinação de hormônios utilizada. A metodologia aplicada tem o potencial de incrementar o rendimento na multiplicação de materiais genéticos de alto valor para a cultura de palma.

PALAVRAS-CHAVE: conservação, meio ambiente, biotecnologia.

IN VITRO MULTIPLICATION OF CACTUS PEAR *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill FOR CULTIVATION IN THE SEMIARID OF RIO GRANDE DO NORTE

ABSTRACT

The propagation in laboratory of selected pear cactus varieties tolerant to carmine cochineal (*Dactylopius opuntiae*) is a viable alternative for the conservation and sustainable use of species adapted to the Caatinga biome, particularly cacti. The aim of this research was to test the effect of different *in vitro* culture media on the production of two forage palm genotypes, tolerant to carmine cochineal, using biotechnology as a tool for rapid multiplication. Fragments of cladodes of the two palm varieties, small palm and elephant ear, were grown in Murashige & Skoog (1962), culture medium, containing growth regulators with concentrations ranging from 0.0 to 2.0 mg.L⁻¹ of BAP and from 0.0 to 0.25 mg.L⁻¹ of ANA or AIA, with a completely randomized design in two

experiments (one for each variety), being: 15 treatments of 3 doses of auxins (AIA or ANA) x 5 doses of cytokinin and 5 repetitions. The experiments were kept in a growth room under controlled 25 ± 2°C temperature conditions, under 16/8 hour light/dark photoperiod and 70% relative humidity. Evaluations were performed at 120 days. When we submitted the explants to the first battery of tests (BAP x AIA), it was found that there was no influence on the height, number of shoots or number of roots for both varieties, whereas in the second battery (BAPx ANA) there were different responses from according to the combination of hormones used. The applied methodology has the potential to increase the yield in the



multiplication of genetic materials of high value for the cultivation of palm.

KEYWORDS: conservation, environment, biotechnology.



1. INTRODUÇÃO

Os ecossistemas fragilizados pela ação do homem dependem do manejo sustentável de sistemas agrícolas, tendo como princípio o uso de plantas adaptadas às condições ambientais e de inovações capazes de minimizar os efeitos do processo de desertificação; a utilização de culturas adaptadas à restrição de água, altas temperaturas e solos de baixa fertilidade é um exemplo destas tecnologias (Aquino & Nascimento, 2013). Destacam que o estudo dos vegetais foi realizado por milhares de anos, tornando-se diversificado e especializado somente durante o século XX, como todas as áreas científicas Raven, Evert e Eichhorn (2007).

De acordo com Lopes (2012) a pecuária tem se constituído em uma das principais atividades econômicas da região Nordeste, dada às condições ambientais, desempenhando importante papel no sistema agropecuário. Entretanto, esta atividade encontra dificuldades tecnológicas na produção de forragens para os rebanhos, tendo como limitações a deficiência hídrica no solo, em associação às altas temperaturas e elevada evapotranspiração.

Devido as suas características agroecológicas, as cactáceas representam uma alternativa econômica potencialmente viável à agricultura familiar nas condições de clima de precipitações pluviométricas baixas e irregulares, típicas do semiárido nordestino, sendo recomendado seu uso como forrageira na alimentação do gado em épocas de seca (Menezes, Simões & Sampaio, 2005).

No Nordeste brasileiro encontra-se a maior área de palma cultivada do mundo, com uma produção de 5.523.622 toneladas distribuída entre os estados de Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Ceará, Rio Grande do Norte, Sergipe e Bahia, possibilitando a alimentação para o rebanho no período de estiagem (IBGE, 2008).

Segundo Cavalcante, Leite, Pereira e Lucena (2017), a palma é o principal auxílio forrageiro da região nordeste, devido ao alto potencial de produção de fitomassa, tolerância ao déficit hídrico, alto valor energético, boa aceitabilidade pelos ruminantes, elevado coeficiente de digestibilidade e grande reserva de água. A palma forrageira (*Opuntia e Nopalea*) é um alimento importante na atividade pecuária por ser adaptada às condições climáticas da região e poder alcançar produtividade de até 40 toneladas de matéria seca por hectare por colheita (Santos *et al.*, 2006).

A palma forrageira [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill], pertence à família cactácea e subfamília Opuntioidea e é uma espécie xerófita com grande potencial de exploração no semiárido por constituir um importante recurso forrageiro (Albuquerque, 2000). Originária das regiões semiáridas do México e cultivada com frequência nos estados do Nordeste. Biomas de ocorrência: Caatinga e Mata Atlântica. Possuem alguns nomes populares tais como figo-da-Índia, palma, palmatória, figueira-da-índia; caracteriza-se por ser um cacto arbustivo ereto, ramificado, suculento, função fotossintética das folhas substituídas pelos filocládios, que são estruturas verdes achatadas coberta de espinhos, comestíveis; flores solitárias amarelas, diurnas; frutos amarelos ou vermelhos também coberto por espinhos com polpa suculenta e sementes marrons, comestíveis (Flora do Brasil, 2020; Nobel, 2001).

Nos últimos anos, houve uma considerável redução dos palmais, causada principalmente pela ação da cochonilha-do-carmim (*Dactylopius opuntiae*), considerada a principal praga da palma



no Nordeste brasileiro (Almeida, Silva, Araújo, Oliveira & Leite, 2011), dizimando milhares de hectares em diversos municípios, o que gerou insegurança na oferta dessa forragem.

Uma alternativa técnica com viabilidade econômica e ambiental é o plantio de clones resistentes à praga multiplicados em laboratório (Vasconcelos, Lira, Cavalcanti, Santos & Willadino, 2009; Carvalho *et al.*, 2011). A oferta de mudas de novos cultivares para plantio em campo pode ser acelerada através da multiplicação *in vitro*, uma vez que a propagação da palma é lenta, e o desenvolvimento da praga muito acelerado (Vasconcelos, Lira, Cavalcanti, Santos, Câmara & Willadino, 2007). Além destas considerações, vale salientar que a propagação vegetativa convencional a partir de material não certificado favorece a disseminação de outras pragas e doenças (Cavalcante, Santos, Silva, Fagundes & Silva, 2014; Carvalho *et al.*, 2011). Nesse caso, o método de cultura de tecidos viabiliza a produção de materiais livres de microrganismos patogênicos, mais uniformes e com excelentes condições fisiológicas, sendo possível produzi-los o ano todo, o que não é possível na propagação convencional devido à dependência de água e da sazonalidade da região (Lemos, 2016).

A demanda de material vegetativo resistente tem sido superior à oferta, dificultando a produção em larga escala convencional deste material, tornando-se essencial o desenvolvimento ou adaptação de uma tecnologia mais eficiente de propagação, como a multiplicação clonal *in vitro* (Lopes, Costa, Cordeiro & Brito, 2013; Carvalho *et al.*, 2011).

As técnicas de cultivo *in vitro* de tecidos vegetais têm sido muito empregadas no desenvolvimento de cultivares superiores de plantas (Carvalho *et al.*, 2011). Um dos primeiros trabalhos desenvolvidos em micropropagação com palma forrageira foi feito por Escobar, Villalobos e Villegas (1986), no qual desenvolveram um método de micropropagação muito eficiente para *Opuntia amyloacea*, relatando que em 100 dias foi possível obter 25.000 plantas provenientes de um cladódio de cerca de 5 cm. Considerando que a técnica da propagação *in vitro* de plantas possibilita a preservação e a reprodução das características desejáveis da planta matriz, a obtenção de elevado número de plantas num curto período de tempo e espaço reduzido, em excelentes condições fitossanitárias (Grattapaglia & Machado, 1998).

As auxinas e as citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas nos cultivos *in vitro*, e a interação entre essas duas classes se costuma fazer para se induzir a formação de parte aérea e raízes nos explantes (Cavalcante *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 2011). A resposta dos explantes ao cultivo *in vitro* varia com o tipo de regulador de crescimento utilizado, sua concentração, combinação com outros reguladores de crescimento, meios de cultivo utilizados, pH do meio, posição do explante no meio de cultura, além da diferença entre espécies, variedades, idade e estado fisiológico do material utilizado (Vasconcelos, Donato, Brito & Lira, 2010; Carvalho *et al.*, 2011).

Segundo Melo (2002), os hormônios ou fitormônios são substâncias naturais produzidas pelo próprio vegetal, enquanto os termos, regulador de crescimento ou regulador vegetal são empregados para todas as substâncias, naturais (produzidas por fungos, por exemplo) ou artificiais, que possuem efeito no crescimento e desenvolvimento das plantas (Carvalho *et al.*, 2011).

O estudo dos hormônios e reguladores de crescimento vegetais promoveram grandes evoluções na área de fisiologia vegetal, foi quando surgiu a cultura de células e tecidos isolados *in*



in vitro, uma das principais ferramentas para o desenvolvimento da agricultura (Torres & Caldas, 1990). Os reguladores de crescimento inclusive são utilizados diretamente em plantas no campo para obtenção de diversos efeitos, tais como o de promover, retardar ou inibir o crescimento vegetativo, promover ou inibir o florescimento, aumentar a frutificação efetiva, provocar o raleio de frutos, aumentar o tamanho dos frutos, evitar a abscisão de frutos, controlar a maturação e a senescência, promover o enraizamento e quebrar a dormência de sementes e gemas, entre outros (Melo, 2002; Hopkins, 2000). O objetivo da presente pesquisa foi testar o efeito de diferentes meios de cultura *in vitro* na produção de dois genótipos de palma forrageira, tolerantes a cochonilha-do-carmim, utilizando a biotecnologia como ferramenta para multiplicação rápida de palma miúda e orelha de elefante.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O Trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia de Conservação de Espécies Nativas (LABCEN) localizado na UFRN, Rio Grande do Norte, em parceria com o Laboratório de Biotecnologia da EMPARN, onde foram testadas diferentes formulações de meio de cultura, tipos e concentrações de reguladores de crescimento, tipos de explantes, forma de assepsia do material vegetal e condições de incubação.

A unidade demonstrativa de palma, utilizada como banco de material para início dos trabalhos de multiplicação, está localizada na Estação Experimental da EMPARN, em Terras secas, no município de Pedro Avelino/RN (Figura 1A).

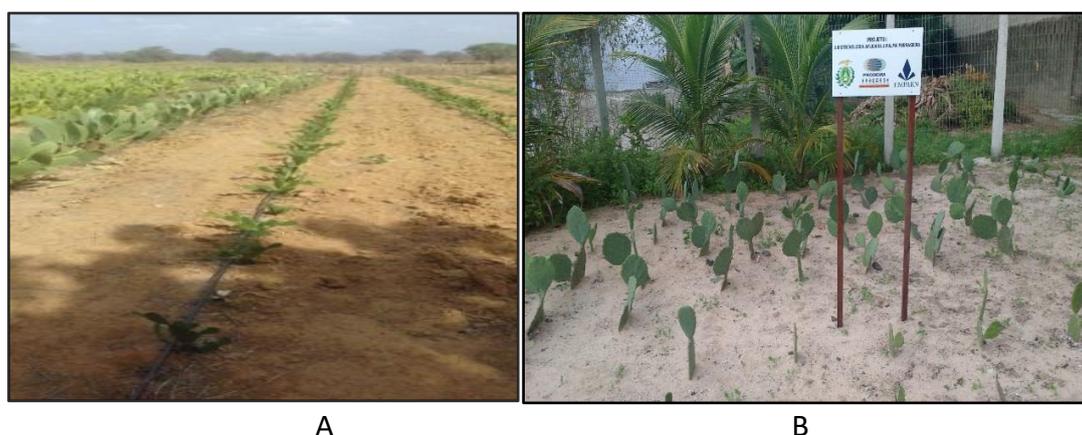


Figura 1: (A) matrizeiro de Palma forrageira no município de Pedro Avelino/RN; (B) área implantada no laboratório LABCEN na UFRN com as duas variedades de palma pesquisadas.

A unidade consta de uma área de 0,5 ha (100 m x 50 m) na qual foram implantadas 5.000 raquetes de palma forrageira, sendo 2.500 raquetes sementes da variedade Orelha de Elefante Mexicana (*Opuntia stricta*) e 2.500 raquetes sementes da variedade miúda ou doce (*Nopalea cochenillifera*).

Para facilitar a introdução de material durante os experimentos *in vitro* foi instalada uma pequena unidade com 100 m² em uma área protegida da UFRN anexo ao laboratório de Biotecnologia de conservação de espécies nativas (LABCEN), com as variedades Orelha-de-elefante e Miúda (Figura 1B).

As gemas destas cactáceas foram extraídas do terceiro cladódio emitido por cada planta adulta, seguindo critérios tais como sanidade e jovialidade, pois as raquetes situadas na base são muito celulósicas e de difícil brotação. As raquetes foram selecionadas identificando material possivelmente promissor adaptados as condições de distribuição irregular das chuvas.

As raquetes pré-selecionadas foram lavadas em água corrente com esponja e detergente neutro, levadas para câmara de fluxo laminar e imersas em álcool 70% por 2 minutos, depois em solução com hipoclorito de sódio 2,5 % adicionado de detergente Tween 20 por 30 minutos, e, por último, mergulhadas em água destilada estéril por 3 vezes, 10 minutos cada (Figura 2A, 2B e 2C).

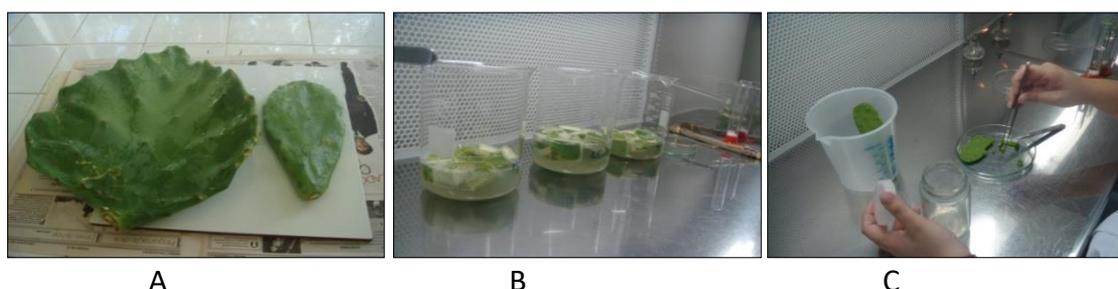


Figura 2: Palma forrageira submetida a processo de desinfestação. Cladódios jovens selecionados (A); Desinfestação em câmara de fluxo laminar (B); Isolamento das gemas e inoculação em meio de cultura(C).

2.1. Estabelecimento da cultura *in vitro*

Inicialmente realizou-se a fase de estabelecimento, os explantes foram inoculados em potes de vidro contendo 40 ml de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 3% de sacarose, 1mg.L^{-1} de BAP e solidificado com 1,5 g de phytigel. Após estabelecidas *in vitro*, as gemas foram subcultivadas em meio MS sem adição de reguladores de crescimento, onde permaneceram por 40 dias. Em seguida, os brotos obtidos foram selecionados e cortados transversalmente na base e no ápice, para quebra de dominância apical, com dimensões padronizadas de 2 cm, para posterior submissão a bateria de testes com reguladores de crescimento (fase de multiplicação) (Figura 3A,3B e 3C).

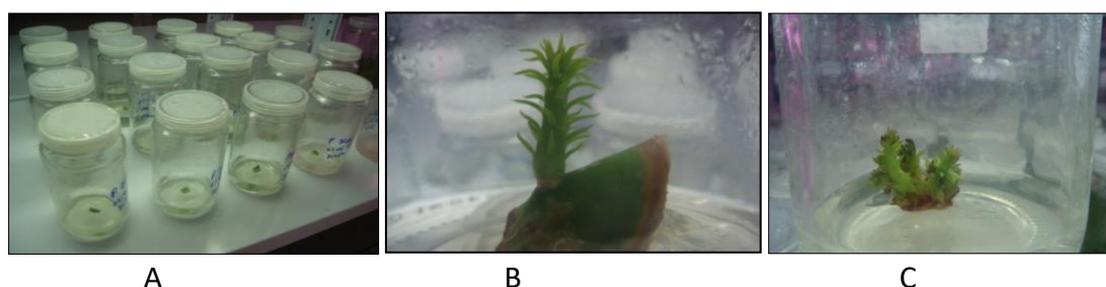


Figura 3: Frascos contendo gemas inoculadas em meio MS suplementado 1mg.L^{-1} de BAP (A); Broto proveniente de uma gemas inoculada B); Formação de brotos provenientes de gemas 40 dias após inoculação (C).

2.2. Multiplicação *in vitro*

A bateria de testes com reguladores de crescimento consistiu em fixar um regulador do grupo das citocininas (benziloaminopurina - BAP) e variar dois reguladores do grupo das auxinas (Ácido indolacético - AIA) ou (Ácido naftalenoacético - ANA), tanto para a variedade Orelha de Elefante quanto para a variedade Miúda (Tabela 1 e 2). O delineamento experimental foi

inteiramente casualizado consistindo de 15 tratamentos (3 doses de auxinas AIA ou ANA x 5 doses da citocinina BAP) e 5 repetições.

A seguir são mostradas as combinações entre os reguladores utilizados nos dois experimentos utilizados:

Tabela 1: Experimento I - Indução de brotos utilizando BAP e AIA

BAP (mg.L ⁻¹)	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0
AIA (mg.L ⁻¹)					
0,0	A1	B1	C1	D1	E1
0,1	F1	G1	H1	I1	J1
0,25	K1	L1	M1	N1	O1

Tabela 2: Experimento II – Indução de brotos utilizando BAP e ANA

BAP (mg.L ⁻¹)	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0
ANA (mg.L ⁻¹)					
0,0	A2	B2	C2	D2	E2
0,1	F2	G2	H2	I2	J2
0,25	K2	L2	M2	N2	O2

A unidade experimental consistiu de um frasco contendo um explante com 5 repetições, sendo 150 frascos da variedade miúda e 150 frascos da variedade orelha de elefante mexicana, totalizando 300 frascos.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 16/8 horas de luz/escuro e umidade relativa de 70%, em delineamento experimental inteiramente casualizado.

Após 120 dias *in vitro*, as unidades experimentais foram avaliadas para tamanho (mm), número de brotações e número de raízes das duas variedades estudadas (Figura 4).



Figura 4: Multiplicação *in vitro* de duas variedades de palma forrageira. A esquerda brotação obtida da palma miúda, e a direita, na palma orelha-de-elefante.

2.3. Análise estatística

Foram feitos modelos de ANOVA no ambiente R. Em todos os modelos, as variáveis preditoras utilizadas foram 15 diferentes níveis de concentração de hormônios descritos na tabela 1 e 2. No primeiro modelo feito utilizando a função “aov”, a variável ‘altura’ medida depois de 120

dias de cultivo foi utilizada como variável resposta, no segundo e terceiro modelo as variáveis ‘número de brotos’ e ‘número de raízes’ medidas depois de 120 dias de cultivo foram utilizadas como variável resposta, Hastie & Pregibon (1992). Os modelos de regressão são amplamente utilizados quando desejamos avaliar o comportamento de uma ou mais características de interesse (variáveis respostas), em função de outras características observadas (variáveis explicativas) (Hothorn, Bretz & Westfall, 2008).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Primeira bateria de testes BAP e AIA

As diferentes concentrações dos hormônios BAP x AIA apresentadas na Tabela 1, não apresentaram influências no crescimento em altura, número de brotos ou número de raízes das duas espécies de palma “Miúda” e “Orelha de Elefante” (Tabela 3), no entanto as espécies apresentaram comportamentos diferentes entre si. A espécie “Miúda” apresentou maior crescimento em altura (Gráfico 1) e a espécie “Elefante” apresentou o maior número de brotos (Gráfico 2), independente dos tratamentos de meio de cultura. As duas espécies não diferiram entre si em relação ao número de raízes (Gráfico 3).

Tabela 3: Tabela de Análises de Variância testando os efeitos dos diferentes meios de cultura de BAP x AIA (Tabela 1) nas variáveis Altura, Número de brotos e Número de raízes em duas espécies de palma.

Análises de variância para BAP e AIA					
Altura (cm)					
	GL	SQ	F-valor	p-valor	
Meios de cultura	14	0.1221	0.946	0.512	
Espécie	1	0.1481	16.077	0.0001	
Resíduos	121	1.115			
Número de brotos					
	GL	Desvio	Resíduo GL	Resíduo Desvio	P-valor
Tratamento	14	15.8446	127	32.181	0.323
Espécie	1	4.2051	126	27.976	0.0403
Nulo			141	48.026	
Número de raízes					
	GL	Desvio	Resíduo GL	Resíduo Desvio	P-valor
Tratamento	14	14.3089	127	50.781	0.427
Espécie	1	0.0594	126	50.722	0.8074
Nulo			141	65.09	

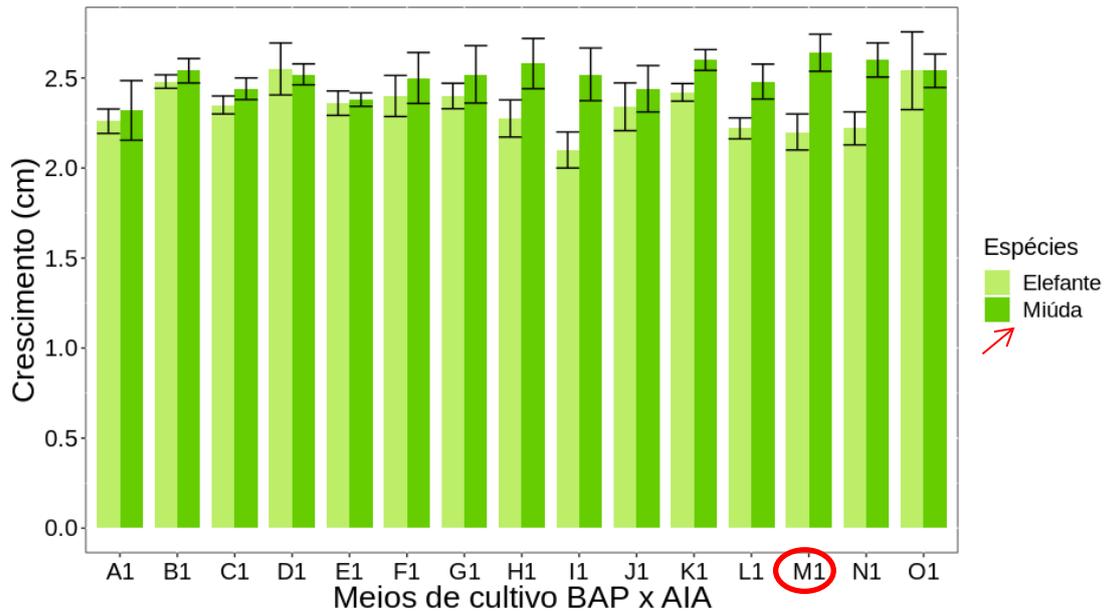


Gráfico 1: Crescimento em altura das duas espécies “Miúda” e “Orelha de Elefante” em diferentes meios de cultura de BAP x AIA (Tabela 1).

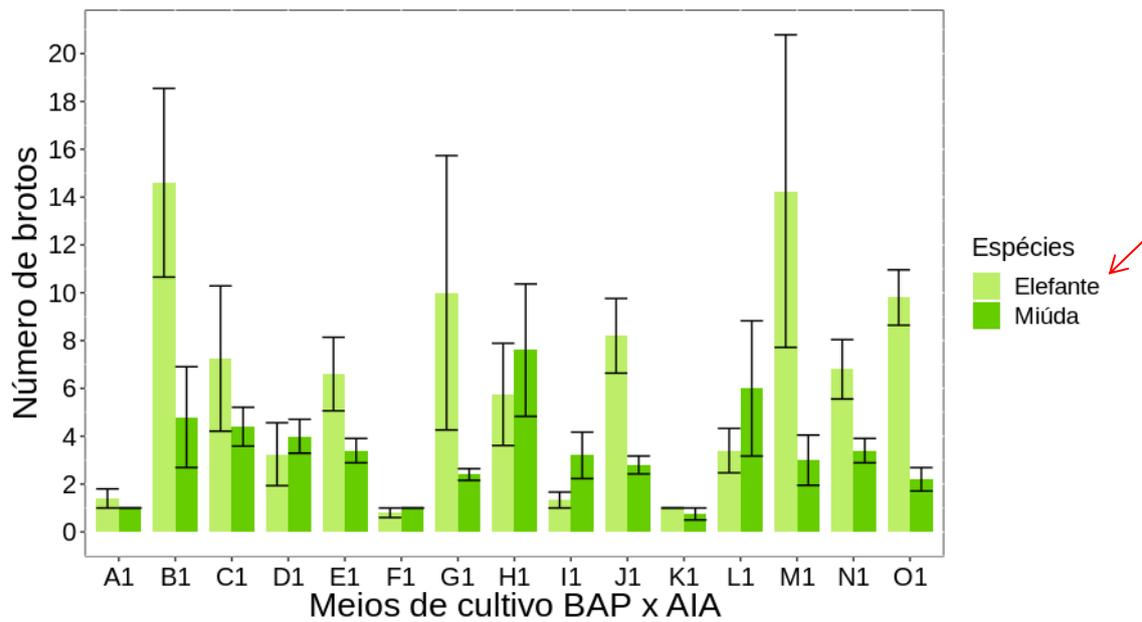


Gráfico 2: Número de brotos das duas espécies “Miúda” e “Orelha de Elefante” em diferentes meios de cultura de BAP x AIA (Tabela 1).

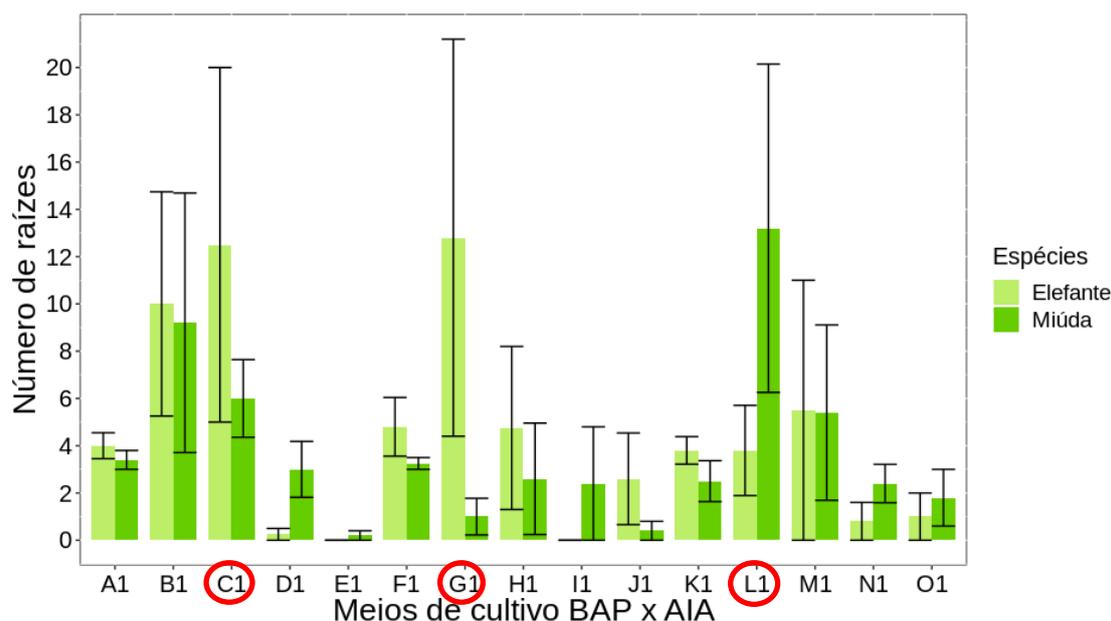


Gráfico 3: Número de raízes das duas espécies “Miúda” e “Orelha de Elefante” em diferentes meios de cultura de BAP x AIA (Tabela 1).

3.2 Segunda bateria de testes BAP x ANA

As diferentes concentrações de BAP x ANA apresentadas na Tabela 2, não influenciaram o crescimento em altura das espécies “Miúda” e “Orelha de Elefante”, porém, a espécie “Miúda” apresentou maior crescimento em altura em relação à espécie “Orelha de Elefante” (Tabela 4, Gráfico 4). As duas espécies diferiram entre si em número de brotos, porém responderam de forma diferente dependendo da combinação de hormônio utilizada (Taiz, Zeiger, Moller & Murphy, 2017). O tratamento **G2** ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP x $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ANA) teve maior influência no crescimento de número de brotos para variedade Orelha de elefante em comparação aos tratamentos A2, F2, K2 e E2. O tratamento **B2** ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP x $0,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ANA) teve maior influência no número de brotos na variedade miúda do que os tratamentos A2, F2 e K2, e o tratamento **C2** ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP x $0,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ANA) teve maior influência no número de brotos do que os tratamentos K2, A2 e F2. Os demais tratamentos tiveram efeitos similares entre si. Em relação ao número de raízes, a espécie “Orelha de Elefante” apresentou em média, maiores números, porém os efeitos também variaram de acordo com os tratamentos. O tratamento **G2** (Orelha de elefante), **B2** e **C2** (Miúda) apresentaram maiores resultados na produção de raízes do que os tratamentos A2, F2 e K2. Os demais tratamentos não tiveram influências distintas no número de raízes.

Tabela 4: Tabela de Análises de Variância testando os efeitos dos diferentes meios de cultura de BAP x ANA (Tabela 2) nas variáveis altura, número de brotos e número de raízes em duas espécies de palma.

Análises de Variância para BAP x ANA				
Altura (cm)				
	Gl	SQ	F-valor	p-valor
Meios de cultura	14	0.477	0.695	0.775
Espécie	1	2.239	45.688	<0.001
Resíduos	123	6.028		

Número de brotes					
	GL	Desvio	Resíduo GL	Resíduo Desvio	P-valor
Meios de cultura	14	24.0701	127	43.275	0.0449
Espécie	1	2.6137	126	40.662	0.1059
Nulo			141	67.345	
Número de raízes					
	GL	Desvio	Resíduo GL	Resíduo Desvio	P-valor
Tratamento	14	400.77	127	460.08	<0.001
Espécie	1	3.17	126	456.91	0.0749
Nulo			141	860.85	

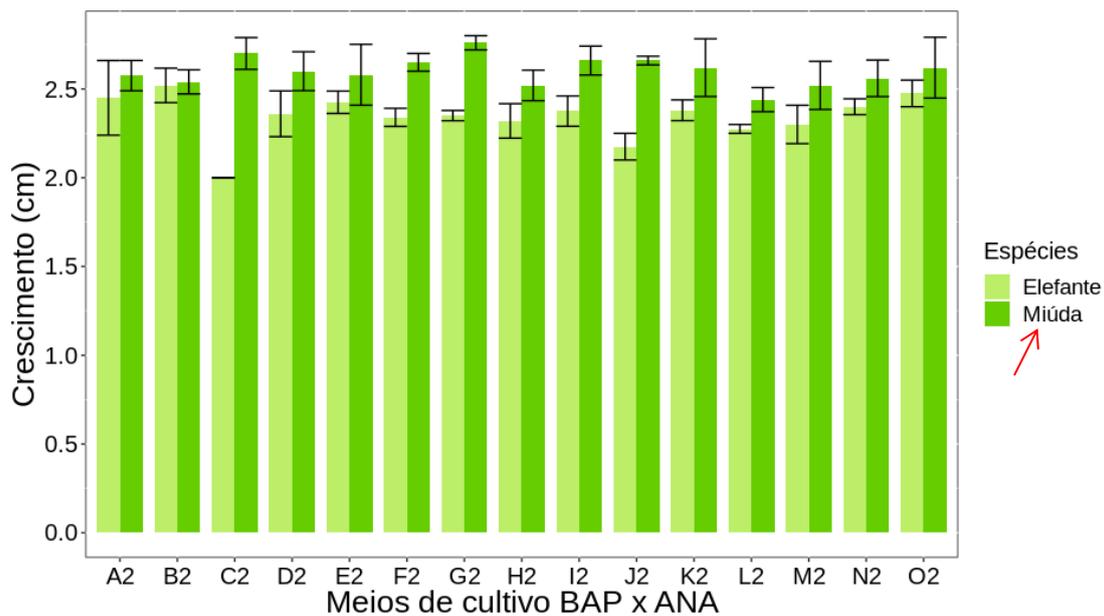


Gráfico 4: Crescimento em altura das duas espécies "Miúda" e "Orelha de Elefante" em diferentes meios de cultura de BAP x ANA (Tabela 2).

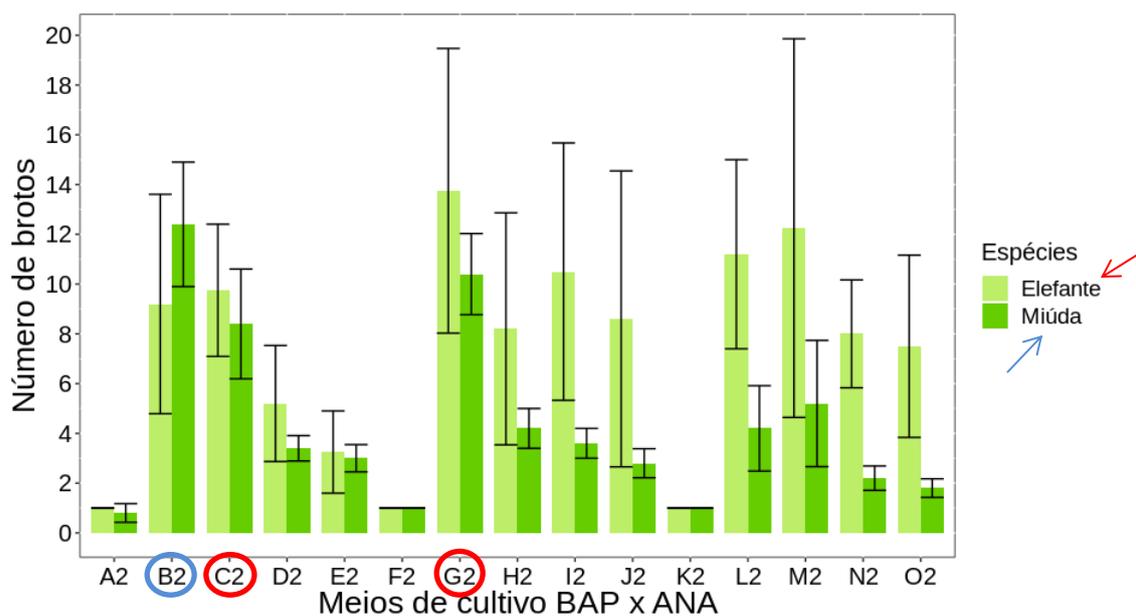


Gráfico 5: Número de brotos das duas espécies de palma “Miúda” e “Orelha de Elefante” em diferentes meios de cultura de BAP x ANA (Tabela 2).

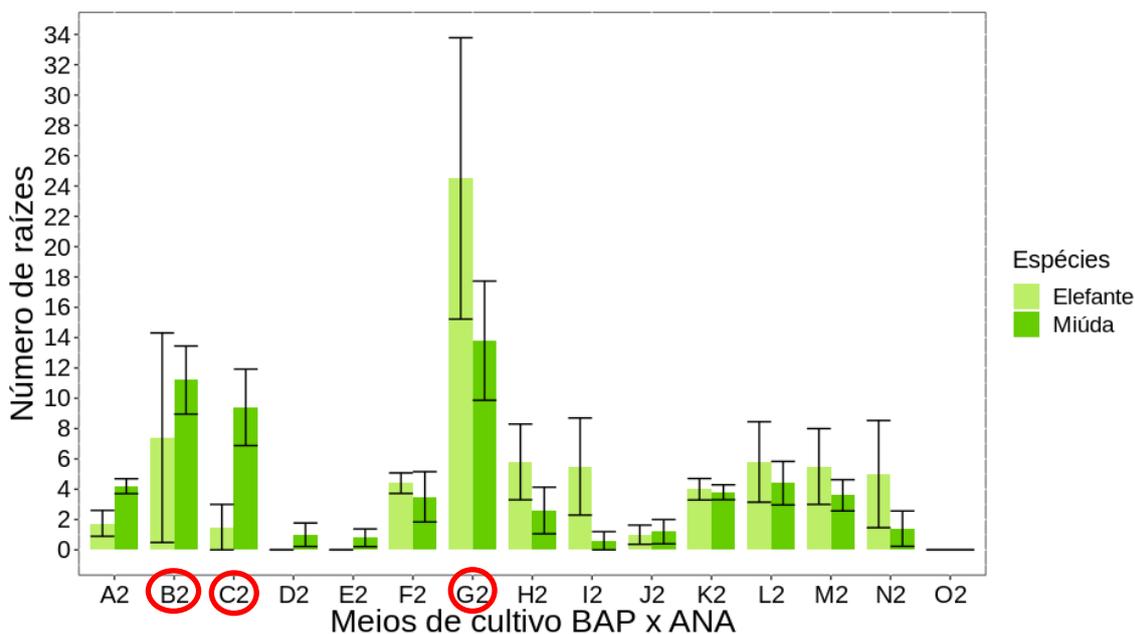


Gráfico 6: Número de raízes das duas espécies “Miúda” e “Orelha de Elefante” em diferentes meios de cultura de BAP x ANA (Tabela 2).

3.3. Estabelecimento *in vitro*

O estabelecimento *in vitro* das duas variedades de palma forrageira foi bem sucedido, obtendo-se 80% de sobrevivência para as duas variedades, sendo observado 20% de contaminação para ambas as variedades. Foram também observados 10% de oxidação do explantes na variedade palma miúda, a variedade orelha de elefante demonstrou ótima adaptação *in vitro*.

3.4. Multiplicação *in vitro*

No início do processo de desenvolvimento *in vitro*, observou-se um intumescimento dos tecidos e formação de brotos, demonstrando a estimulação dos tecidos pelos reguladores de crescimento adicionados aos meios de cultura para os dois genótipos de palma testados (Figura 05).

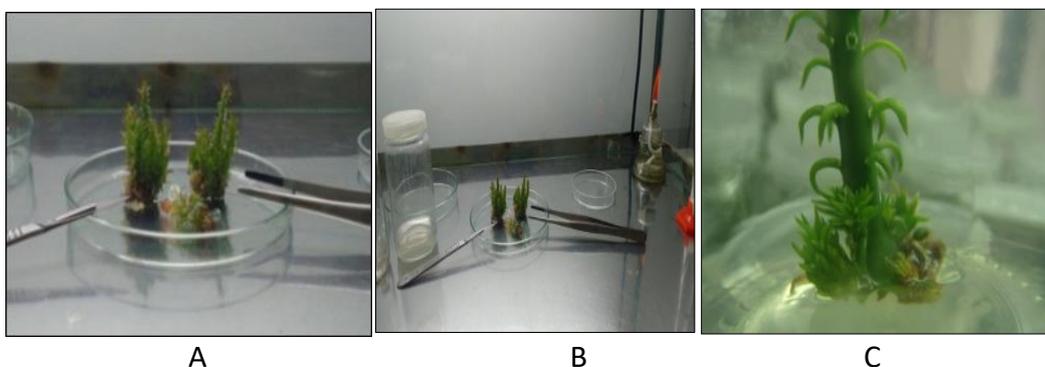


Figura 5: Multiplicação *in vitro* de palma Orelha de elefante. Brotos gerados a partir de uma gema (A); Material manipulado em câmara de fluxo laminar (B); Detalhe da formação dos brotos (C).

As plantas são organismos que possuem um conjunto de células complexas, havendo necessidade de um eficiente meio de comunicação entre os órgãos, tecidos e células, (Hopkins, 2000; Kerbauy, 2004). Os mais relevantes meios de comunicação intercelular são os hormônios, que coordenam o crescimento e desenvolvimento vegetal. Entre as cinco principais classes de hormônios, estão as auxinas e citocininas, que neste experimento foram adicionadas aos meios de cultura como reguladores de crescimento de forma criteriosa nos trazendo revelações sobre o comportamento das espécies de palma miúda e orelha de elefante *in vitro* (Hopkins, 2000).

Existem alguns tipos de auxinas naturais produzidas pela própria planta, a principal delas é o AIA (ácido-indolil-acético), é produzido no ápice caulinar, em folhas jovens e em sementes em desenvolvimento, favorecendo o crescimento do caule e de raízes adventícias (Lopes & Rosso, 2010); através das observações deste experimento confirma-se esta resposta de crescimento em altura e número de raízes para as duas espécies de palma testadas (Rahman, 2013).

As citocininas são produzidas nas raízes e conduzidas por toda a planta, induzem o desenvolvimento de gemas laterais e retardam o envelhecimento da planta, porém se adicionarmos apenas citocinina a esse meio, nada acontece, mas se adicionarmos também auxina, as células passam a se dividir e podem se diferenciar em diversos órgãos (Lopes & Rosso, 2010).

Os bioensaios foram o caminho para obtenção de informações quantitativas e qualitativas à cerca dos reguladores de crescimento e sua ação sobre os explantes de palma forrageira, segundo Ferri (1985) o sistema responderia especificamente àquele regulador de crescimento que foi adicionado ao meio de cultura de acordo com a classe de hormônios testadas, a resposta deveria ser verificada em baixas concentrações do regulador de crescimento e a relevância da resposta deveria oferecer um relação quantitativa com a concentração do hormônio utilizado, o que é confirmado neste experimento (Lema-Rumińska & Kulus, 2014).

A interação e o balanço entre reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura, principalmente auxinas e citocininas, são responsáveis pelo crescimento e morfogênese *in vitro* (Souza, Souza, Silva & Oliveira, 2012). O uso da citocinina, combinada ou não com baixos níveis de auxinas, é indispensável na fase de multiplicação, uma vez que este regulador é responsável pela quebra da dominância apical e pela indução da proliferação das gemas axilares (Hassanen, 2013; Niang, Gassama, Ndiaye, Sagna, Samba & Touré, 2010).

Segundo (Kyte & Kleyn, 2010) as auxinas desempenham papel central e interagem com vários hormônios na regulação, crescimento e desenvolvimento das plantas, sua concentração pode inibir, promover ou modificar processos fisiológicos. Vasconcelos *et al.* (2007), estudando o estabelecimento de *Nopalea cochenillifera*, variedade miúda, observaram que a concentração de 4,5 μM de BAP e 0,6 μM de AIA, induziu o maior número de brotações e menor índice de necrose.

No que se refere ao uso de BAP neste experimento entre 0,5 e 1,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ houve favorecimento na formação de brotação na variedade Orelha de elefante, quando comparado ao tratamento controle sem reguladores de crescimento.

Observou-se que a variedade que teve maior altura *in vitro* foi à variedade miúda, quando fazemos a associação entre BAP e ANA, enquanto a palma orelha de elefante apresentou um maior número de brotos. Isso sugere que o efeito do genótipo na resposta morfogênética *in vitro*, pode ser significativo, quando observamos as duas variedades.

Simultaneamente as auxinas e citocininas são os principais hormônios vegetais envolvidos na regulação do crescimento e desenvolvimento, principalmente nos processos que determinam a arquitetura das raízes (Bielach, Duclercq, Marhavý & Benková, 2012), a espécie orelha de elefante apresentou maior desenvolvimento quando cultivada nos meios ao qual adicionamos BAP+ANA, apresentando maiores números, porém com uma variação de acordo com o tratamento.

Segundo Fukaki e Tasaka (2009) genes têm sido estudados com plantas modelo, principalmente para a compreensão dos processos de organogênese das raízes, entretanto, os mecanismos que explicam a interação entre os hormônios e o processo de organogênese de raízes continuam desconhecidos (Bielach *et al.*, 2012).

A ANOVA não nos indica necessariamente que existe um tratamento especificamente melhor para o desenvolvimento de uma determinada característica a ser alcançada, durante as análises observamos que podemos ter como resposta várias combinações hormonais favoráveis para o desenvolvimento da característica desejada considerando as variáveis diversas como altura, número de brotos e raízes (Bussab & Morettin, 2017).

O controle de custos é fundamental para se produzir plantas a custo competitivo com as técnicas convencionais, mas é preciso que as medidas adotadas neste sentido não resultem em prejuízo à qualidade do produto final, sendo assim para uma produção com resultados promissores de acordo com estes experimentos poderíamos escolher tanto a auxina AIA quanto a auxina ANA associadas a citocinina BAP, pois apresentaram resultados semelhantes para a cultura da cactácea palma forrageira, variedades miúda e Orelha de elefante, havendo resultados mais consistentes associando BAP x ANA, relatados em outros experimentos El Finti, El Boullani, El Ayadi, Ait Aabd & El Mousadik (2012).

4. CONCLUSÕES

Considerando os aspectos observados, as informações apresentadas nesta pesquisa nos possibilitam reconhecer a importância desta cactácea na produção de forragem para o semiárido nordestino, considerando que é uma planta adaptada aos períodos críticos do ano, auxiliando principalmente na alimentação animal, e indispensável para auxílio nas regiões semiáridas.

Dado o exposto, conclui-se que as duas espécies apresentam comportamentos diferentes *in vitro*, tendo a palma miúda se destacado no desenvolvimento em altura e a palma orelha de elefante em número de raízes quando submetidos aos reguladores de crescimento.

Pela observação dos aspectos analisados, os tratamentos A2, F2 e K2 (ausência total da citocinina BAP) foram menos responsivos para ambas as espécies miúdas e Orelha de elefante; os meios G2, B2 e C2 apresentaram uma resposta satisfatória com concentrações intermediárias de ANA e BAP; Em virtude dos fatos mencionados, conclui-se que a micropropagação da palma forrageira



variedade Miúda e Orelha-de-elefante são viáveis quando submetidas ao meio MS (1962) suplementado com BAP isoladamente ou combinado com as auxinas AIA ou ANA. Percebe-se que o baixo valor de reguladores de crescimento do grupo das auxinas utilizadas nos experimentos não alterou de forma significativa as reações *in vitro*, o que sugere a possibilidade da realização de pesquisas futuras para aplicação de concentrações mais altas.

5. REFERÊNCIAS

- Albuquerque, S. G. de. (2000). Cultivo da palma forrageira no Sertão do São Francisco. *Comunicado Técnico da Embrapa Semi-Árido*. (91), 1-6. Recuperado de <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPATSA/8763/1/COT91.pdf>.
- Almeida, A. A., Silva, R. A., Araújo, W. L., Oliveira, A. V. B. & Leite, D. T. (2011). Problemas fitossanitários causados pela Cochonilha do Carmim a palma forrageira no Cariri Ocidental Paraibano. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 6(3), 98-108. Recuperado de <https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/view/743/671>.
- Aquino, A. L. & Nascimento, J. L. J. (2013). Educação Ambiental e EJA: Possibilidades e Nexos para a Sustentabilidade. In MATOS, K. S. A. (org.), *Educação Ambiental e Sustentabilidade IV*. Fortaleza: Edições UFC.
- Bielach, A., Duclercq, j., Marhavý, P. & Benková, E. (2012). Genetic approach towards the identification of auxin-cytokinin crosstalk components involved in root development. *Philosophical Transactions of the Royal Society B, Biological sciences*, 367(1595), 1469-78. Recuperado de <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0233>.
- Bussab, W. O. & Morettin, P. A. (2017). Estatística básica (9a ed.). São Paulo: Saraiva.
- Carvalho, A. C. P. P. de, Torres, A. C., Braga, E. J. B., Lemos, E. E. P. de, Souza, F. V. D., Peters, J. A., Willadino, L. & Câmara, E. R. (2011). Glossário de cultura de tecidos de plantas. *Plant Cell Culture Micropropagation*, 7(1), 30-60. Recuperado de <http://177.105.2.193/ojs/index.php/PlantCellCultureMicropropagation/article/view/66>.
- Cavalcante, A. B., Leite, M. L. M. V., Pereira, J. S. & Lucena, L. R. R. (2017). Crescimento de palma forrageira em função da cura de segmentos dos cladódios. *Tecnologia & Ciência Agropecuária*, 11(5), 15-20. Recuperado de <http://revistatca.pb.gov.br/edicoes/volume-11-2017/v-11-n-5-dezembro-2017/03-crescimento-de-palma-forrageira.pdf>.
- Cavalcante, L. A. D., Santos, G. R. A., Silva, L. M., Fagundes, J. L. & Silva, M. A. (2014). Respostas de genótipos de palma forrageira a diferentes densidades de cultivo. *Pesquisa Agropecuária nos Trópicos*, Goiânia, 44(4), 424-433. Recuperado de <https://www.scielo.br/pdf/pat/v44n4/v44n4a10.pdf>.
- El Finti, A., El Boullani, R., El Ayadi, F., Ait Aabd, N. & El Mousadik, A. (2012). Micropropagation In Vitro Of Opuntia Ficus-Indica In Southern Morocco. *Acta Horti*. 995, 93-98. Recuperado de <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.995.11>.



- Escobar, H. A., Villalobos, A. V. M. & Villegas, M. A. (1986). Opuntia micropropagation by axillary proliferation. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 7, 269–277. Recuperado de <https://doi.org/10.1007/BF00037744>.
- Ferri, M. G. (Coord.). (1985). *Fisiologia Vegetal* (2a ed, v. 1 e 2). São Paulo: EPU.
- Flora do Brasil 2020 em construção (2020). *Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. Recuperado de <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>.
- Fukaki, H. & Tasaka, M. (2009). Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Molecular Biology.* 69(4), 437-49. Recuperado de <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9417-2>.
- Grattapaglia, D. & Machado, M.A. (1998). Micropropagação. In Torres, A. C., Caldas, L. S. & Buso, J. A. (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas* (v. 1). Brasília, DF: EMBRAPA-SPI.
- Hassanen, S. A. (2013). In vitro grafting of pear (*Pyrus* spp.). *World Applied Sciences Journal.* 21(5), 705-709. Recuperado de DOI:10.5829/idosi.wasj.2013.21.5.2892.
- Hastie, T. J. & Pregibon, D. (1992). Generalized linear models. In Chambers, J. M. & Hastie, T. J. (Eds.), *Of Statistical Models in S*. Wadsworth & Brooks/Cole, Pacific Grove, California.
- Hopkins, W. G. (2000). *Introduction to Plant Physiology* (2nd ed.). New York: John Wiley & Sons.
- Hothorn, T., Bretz, F. & Westfall, P. (2008). Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal.* 50(3), 346-363. Recuperado de <https://doi.org/10.1002/bimj.200810425>.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2008). *Produção Pecuária Municipal*, Rio de Janeiro, 36(1-55). Recuperado de https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2008_v36_br.pdf.
- Kerbauy, G. B. (2004). *Fisiologia Vegetal*. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.
- KYTE, L. & KLEYN, J. (2010). *Plants from test tubes: an introduction to micropropagation* (3rd ed). Portland, Oregon: Timber Press.
- Lema-Rumińska, J. & Kulus, D. (2014). Micropropagation of Cacti-a review. *Haseltonia.* (19), 46-63. Recuperado de <https://doi.org/10.2985/026.019.0107>.
- Lemos, M. (2016). *Uso de esgoto doméstico tratado na produção de palma forrageira em assentamento rural do semiárido brasileiro* (Tese de doutorado). Curso de Pós-graduação em Manejo de Solo e Água, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil. Recuperado de <http://repositorio.ufersa.edu.br/handle/tede/610>.
- Lopes, E. B. (Org.). (2012). *Palma Forrageira: cultivo, uso atual e perspectivas de utilização no semiárido Nordestino*. João Pessoa: EMEPA-PB.



- Lopes, E. B., Costa, L. B., Cordeiro, A. F. Júnior & Brito, C. H. (2013). Rendimento e aspectos fenológicos de espécies de palma forrageira em relação ao cultivo com dois tipos de cladódios. *Tecnologia & Ciência Agropecuária*, 7, 59-61. Recuperado de <http://revistatca.pb.gov.br/edicoes/volume-07-2013/volume-7-numero-5-dezembro-2013/tca7512.pdf>.
- Lopes, S. & Rosso, S. (2010). *Bio* (2a ed., v.1). São Paulo: Saraiva.
- Melo, N. F. de. (2002). Introdução aos hormônios e reguladores de crescimento vegetal. *Anais Seminário CODA de Nutrição Vegetal*, Petrolina, PE, Brasil. Recuperado de <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/135451>.
- Menezes, R. S. C., Simões, D. A. & Sampaio, E. V. S. B. (2005). *A palma no Nordeste do Brasil: Conhecimento atual e novas perspectivas de uso*. Recife: Ed. Universitária da UFRPE.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 15, 473–497.
- Niang, D., Gassama, Y. K., Ndiaye, A., Sagna, M., Samba, S. A. N. & Touré, M. (2010). In vitro micrografting of *Sterculia setigera* Del. *African Journal of Biotechnology*. 9(50), 8613-8618. Recuperado de <https://doi.org/10.5897/AJB10.895>.
- Nobel, P. S. (2001). Biologia ambiental. In Barbera, G. & Inglese, P. *Agroecologia, cultivos e usos da palma forrageira*. Paraíba: SEBRAE/PB.
- Rahman, A. (2013). Auxin: a regulator of cold stress response. *Physiologia Plantarum*, 147(1), 28-35. Recuperado de DOI: 10.1111/j.1399-3054.2012.01617.x.
- Raven, P. H., Evert, R. F. & Eichhorn, S. E. (2007). *Biologia vegetal* (7a ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Santos, D. C. dos; Farias, I.; Lira, M. de A.; Santos, M. V. F. dos; Arruda, G. P. de; Coelho, R. S. B.; Dias, F. M.; Melo, J. N. de. (2006). *Manejo e utilização da palma forrageira (Opuntia e Nopalea) em Pernambuco* (Documentos, 30). Recife: IPA. Recuperado de http://www.ipa.br/publicacoes_tecnicas/Pal01.pdf.
- Souza, A. V. de, Souza, D. D. de, Silva, N. B. G. da & Oliveira, F. J. V. de. (2012). *Produção in vitro de mudas de coroa-de-frade (Melocatus oreas Miq. - Cactaceae): uma espécie nativa da Caatinga de potencial ornamental* (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 94). Petrolina: Embrapa Semiárido.
- Taiz, L., Zeiger, E., Moller, Y. M. & Murphy, A. (2017). *Fisiologia e desenvolvimento vegetal* (6a ed.). Porto Alegre, RS: Artmed.
- Torres, A. C. & Caldas, L. S. (1990). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: Embrapa Hortaliças.



Vasconcelos, A. G. V., Donato, V. M. T. S., Brito, J. Z. de & Lira, M. de A. (2010). Cultura de tecidos vegetais: técnicas utilizadas para multiplicação acelerada da palma forrageira. In Figueiredo, M.V.B. et al. (Eds). *Biotecnologia aplicada à agricultura*. Brasília: EMBRAPA.

Vasconcelos, A. G. V., Lira, M. A., Cavalcanti, V. L. B., Santos, M. V. F. & Willadino, L. (2009). Seleção de clones de palma forrageira resistentes à cochonilha-do-carmim (*Dactylopius* sp.). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38 (5), 827-831. Recuperado de <https://doi.org/10.1590/S1516-35982009000500007>.

Vasconcelos, A.G.V., Lira, M. A., Cavalcanti, V.A.L.B., Santos, M.V.F., Câmara, T. & Willadino, L. (2007). Micropropagação de palma forrageira cv. Miúda (*Nopalea cochenillífera* - Salm Dyck). *Revista Brasileira de ciências Agrárias*, (2)28-31. Recuperado de <http://www.agraria.pro.br/ojs-2.4.6/index.php?journal=agraria&page=article&op=view&path%5B%5D=765>.

COMO CITAR ESTE ARTIGO:

Dutra, M. de F. B., Alloufa, M. H. I., Melo, N. F. de, Leite, J. I. P.. (2020). Multiplicação in vitro de palmas forrageiras *Opuntia Stricta* (Haw.) E *Nopalea Cochenillifera* (L.) Salm-Dyck para cultivo no semiárido do Rio Grande do Norte. *Holos*. 36(7), 1-19.

SOBRE OS AUTORES

M. DE F. B. DUTRA

Bióloga, Mestre em Genética e Biologia Molecular e doutoranda do Programa de Desenvolvimento e Meio Ambiente da UFRN (PRODEMA) e colaboradora da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte ao qual participa de Projetos na área de Biotecnologia e atua como Coordenadora do Laboratório de Biotecnologia que pertence ao Governo do Estado do Rio Grande do Norte. E-mail: mfbdutra@hotmail.com

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-5923-0674>

M. H. I. ALLOUFA

Doutorado em Biologia e Fisiologia Vegetal da UFRN, Professor e pesquisador lotado no Departamento de Botânica e Zoologia. Coordenador do Laboratório de Biotecnologia de Conservação de Espécies Nativas (LABCEN). E-mail: magdialoufal@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3762-9625>

N. F. DE MELO

Biólogo pela Universidade Federal de Pernambuco (1990), Mestre em Botânica pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (1994), Especialista em Biotecnologia Vegetal pelo Agricultural Biotechnology Centre/Hungria (1996) e Doutor em Ciências Biológicas (Área de concentração em Genética) pela Universidade Federal de Pernambuco (2002). Atua como pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Semiárido) e participa como professor permanente dos Programas de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS e do Mestrado Acadêmico em Agronomia - Produção Vegetal da Universidade Federal do Vale do São Francisco - Univasf. Na área de gestão, atuou como Chefe de Pesquisa e Desenvolvimento e Chefe-Geral da Embrapa Semiárido. Tem experiência na área de Biologia Aplicada, com ênfase em Biotecnologia e Citogenética Vegetal, sendo revisor de periódicos nacionais e internacionais, atuando principalmente nos seguintes temas: cultura in vitro de células e tecidos vegetais, micropropagação, micorriza, citogenética convencional e molecular e melhoramento genético vegetal. E-mail: natoniel.melo@embrapa.br

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6888-4090>



J. I. P. LEITE

"IN MEMORIAM"

Possui graduação em Engenharia de Minas pela Universidade Federal da Paraíba (1987) e mestrado em Engenharia Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (1992). Atualmente é professor do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte. Tem experiência na área de Engenharia de Minas, com ênfase em Métodos de Concentração e Enriquecimento de Minérios, atuando principalmente nos seguintes temas: caracterização tecnológica, separação mineral, meio ambiente com ênfase em processamento mineral. E-mail: jypleite@gmail.com
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8331-697X>

Editor(a) Responsável: Leandro Costa**Pareceristas Ad Hoc:** JOSÉ DANTAS E FRANCINAIDE DE LIMA SILVA NASCIMENTO