

## Efeito de benziladenina na regeneração de duas variedades de palma forrageira (*Opuntia* spp.)

F. A. L. Alves<sup>1</sup>; W. S. Soares<sup>2</sup>; Y. T. D. Fernandes<sup>2</sup>; M. M. Rêgo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estação Experimental de Arcoverde, Instituto Agrônomo de Pernambuco, 56.500-000, Arcoverde-PE, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Fitotecnia/Laboratório de Biotecnologia Vegetal/Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, 58.397-000, Areia-PB, Brasil

abel.alves@ipa.br

(Recebido em 13 de abril de 2013; aceito em 18 de junho de 2013)

A palma forrageira (*Opuntia* spp.) é uma espécie de planta bem adaptada a ambientes com escassez de água, em virtude de adaptações morfofisiológicas, além de ser uma ótima opção de forragem na época seca. O objetivo do trabalho foi estabelecer a melhor concentração de BA que induz brotos *in vitro* de palma forrageira, variedades F-24 (*O. atropes*) e F-21 (*N. cochenillifera*). Os explantes foram cultivados em meio de cultura MS, contendo 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, suplementado com concentrações de BA (0; 0,5; 1,1; 2,2; 4,4; 8,8 µM) e AIA (0,6 µM), solidificado com 0,8% de ágar, pH 5,85. Os mesmos foram mantidos em condições controladas de 25 ± 2 °C, PAR 30 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. A porcentagem de brotação foi feita aos 30 e 60 dias após a inoculação. Os resultados indicam variabilidade de respostas entre os genótipos às concentrações de BA. A resposta à presença de BA na porcentagem de brotação seguiu uma curva sigmóide. Onde o ponto de máxima eficiência (PME), aos 30 dias foi 3,7 µM BA para a variedade F-24, e 4,5 µM BA para a F-21. Com porcentagem de brotação de 58% (F-24) e 21% (F-21). Aos 60 dias PME foi 4,1 µM BA para a variedade F-24, com 85% de brotação. O genótipo F-21 apresentou significativa oxidação nos explantes, o que impossibilitou o seu crescimento após 30 dias de cultivo. Sendo assim, recomenda-se a troca do meio de cultura a cada 30 dias, para evitar a oxidação dos mesmos. As concentrações de BA mais efetivas na indução de brotação nos genótipos de palma foram 3,7 µM para variedade F-24, e 4,5 µM para variedade F-21. No entanto, devido à alta oxidação e baixa porcentagem de brotação novos ensaios são necessários, inclusive, com o uso de antioxidantes.

Palavras-chave: citocinina, cultura de tecidos, indução de brotos, micropropagação

### Effect of benzyladenine on the regeneration of two varieties of cactus pear (*Opuntia* spp.)

The cactus pear (*Opuntia* spp.) is a plant species well adapted to environments with water shortages, due to morphological and physiological adaptations, besides being a great choice of fodder in the dry season. The aim of the study was to establish the optimal concentration of BA to induce shoots *in vitro* forage cactus varieties F-24 (*O. atropes*) and F-21 (*N. cochenillifera*). The explants were cultured on MS medium containing 30 g L<sup>-1</sup> sucrose, supplemented with concentrations of BA (0, 0.5, 1.1, 2.2, 4.4, 8.8 µM) and IAA (0.6 µM), solidified with 0.8% agar, pH 5.85. They were kept under controlled conditions of 25 ± 2 °C PAR 30 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> and a photoperiod of 16 hours light and 8 hours of dark. The sprouting was performed at 30 and 60 days after inoculation. The results indicate variability in responses between the genotypes at concentrations of BA. The response to the presence of BA in the percentage of sprouting followed a sigmoid curve. Where the point of maximum efficiency (SME) at 30 days was 3.7 µM BA for variety F-24, and 4.5 µM BA for the F-21. With sprouting percentage of 58% (F-24) and 21% (F-21). SMEs at 60 days was 4.1 µM BA for variety F-24, with 85% sprouting. The F-21 genotype showed significant oxidation in the explants, which prevented its growth after 30 days of cultivation. As well it is recommended to exchange the culture medium every 30 days to prevent oxidation thereof. The concentrations of BA more effective in inducing sprouting palm genotypes were 3.7 µM range for F-24, and 4.5 µM for F-21 variety. However, due to the high oxidation and low percentage of sprouting new tests are required, including the use of antioxidants.

Keywords: cytokinin, induce of shoots, micropropagation, tissue culture

## 1. INTRODUÇÃO

As regiões áridas e semiáridas são caracterizadas por seu regime de precipitação anual, que variam, respectivamente de 60-100 mm a 150-250 mm e 150-250 mm a 250-500 mm, e pela irregularidade da distribuição das chuvas, que são variáveis, infrequentes, discretos, imprevisíveis e aleatórios. Essas regiões frequentemente apresentam déficit hídrico prolongado do solo o que causa sérios prejuízos ao setor agropecuário<sup>13, 20</sup>.

A região semiárida brasileira é caracterizada por duas estações do ano bem definidas: estação seca (agosto-fevereiro) e estação chuvosa (março-julho). Na época chuvosa a quantidade de forragem para os animais é em quantidade e qualidade apreciáveis. Entretanto na época seca a quantidade e qualidade de forragem são deficientes de modo que é necessário que os criadores e produtores de gado busquem alternativas e/ou estratégias para suprirem a carência alimentar de seus rebanhos<sup>2</sup>.

Apesar das técnicas disponíveis aos produtores para convivência na época seca, como a conservação de forragens na época chuvosa, através da fenação e silagem, muitos deles não conhecem ou não praticam. Assim sendo, o desenvolvimento de variedades de plantas e/ou a implantação de espécies que sejam resistentes ou adaptadas aos períodos de déficit hídrico é imprescindível.

A palma forrageira (*Opuntia* spp.) é uma planta bem adaptada a ambientes com escassez de água, em virtude de adaptações morfofisiológicas. As mesmas possuem o mecanismo fotossintético, conhecido como ácido das crassuláceas (CAM), que absorve o CO<sub>2</sub> no período noturno e fixa-o em oxalacetato, e depois em malato e/ou aspartato, que serão transformados em carboidratos pelo ciclo de Calvin durante o dia. Por abrir seus estômatos à noite (temperatura baixa e alta umidade) e fechando-os durante o dia (temperatura elevada e baixa umidade) evita a perda de água e com alta eficiência no uso da água<sup>26</sup>.

Além disso, as raízes dessa espécie ficam próximas à superfície do solo (10-20 cm) adaptadas a absorver água de pequenas precipitações e até orvalho. Na época seca suas raízes morrem, e no retorno de pequena umidade do solo, as mesmas se renovam em uma velocidade de crescimento surpreendente<sup>24</sup>. Outras adaptações morfológicas como presença de espinhos e gloquídeos são úteis contra a perda de água.

Por todos esses mecanismos adaptativos a palma forrageira (*Opuntia* spp.) é uma cultura muito importante para a região semiárida brasileira, servindo de alimentação animal no período de estiagem. A palma além de ser um alimento volumoso succulento é, dentre as forrageiras disponíveis na região, a que possui a maior capacidade de produção de matéria fresca, e não precisa ser armazenada como silagem ou feno, mantendo seu valor nutritivo durante todo o período de estiagem<sup>21</sup>.

A composição química da palma, com alto conteúdo de água, minerais e carboidratos solúveis, vitaminas, elevada digestibilidade e baixos teores de matéria seca, fibra bruta, proteínas e fósforo, que corrigidos com adição de alimentos fibrosos e proteicos, serve como excelente alimento aos animais, principalmente na época seca, onde há escassez de forragem<sup>23</sup>.

O potencial significativo desta cultura para contribuir no desenvolvimento das zonas semiáridas, é inegável, sobretudo, onde a exploração racional e econômica de suas espécies ajudará na conservação do meio ambiente e segurança alimentar dos rebanhos<sup>4</sup>.

Nos últimos anos a cochonilha do carmim (*Dactylopius opuntiae*), que anteriormente ocorria em cactos nativos, se transformou em praga muito agressiva que limita o cultivo da palma forrageira no Nordeste. Esta praga está inviabilizando praticamente toda a pecuária bovina, caprina e ovina, provocando grandes prejuízos econômicos na cadeia produtiva do leite e carne nessas regiões. Este inseto, no ato da alimentação inocula toxinas, que provoca o amarelecimento, a queda das raquetes e, nos casos mais severos, a morte da planta<sup>27</sup>.

O Instituto Agrônomo de Pernambuco-IPA vem desenvolvendo um programa de melhoramento genético na espécie visando obter materiais com alta produção e resistentes à praga da cochonilha do carmim, com várias variedades já desenvolvidas, a exemplo da variedade F-24 e F-21<sup>23</sup>. No entanto, como esses genótipos tem o crescimento lento, estratégias de multiplicação *in vitro* é uma solução para propagar mudas em quantidade suficiente a curto e médio prazo.

A micropropagação do gênero *Opuntia* começou há 50 anos e tem centrado esforços na regeneração de plantas através de organogênese de calos e formação de gemas axilares<sup>25, 16, 17, 15</sup>. Durante muitos anos temos focado no estabelecimento de protocolos de propagação das espécies de *Opuntia* spp. para utilização comercial, através da proliferação dos brotos axilares<sup>3</sup>. Essa técnica fornece indivíduos uniformes e livres de agentes patogênicos usados para estabelecer plantações comerciais, além de permitir a combinação entre genótipos através da técnica de microenxertia permitindo acelerar o crescimento das plantas<sup>7</sup>.

A palma forrageira (*Opuntia* spp.) tem uma ampla resposta aos reguladores de crescimento utilizados na micropropagação. As auxinas e as citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas nos cultivos *in vitro*, e a interação entre essas duas substâncias no meio de cultivo, induz a formação de raízes e parte aérea nos explantes<sup>28</sup>.

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 (giberelinas), 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 como doador dos explantes; e tratamento utilizado para desinfestação do material<sup>28</sup>.

Assim, o objetivo do trabalho foi estabelecer a melhor concentração de BA (benziladenina) para a indução de organogênese *in vitro* de palma forrageira nas variedades F-24 (*Opuntia atropes* Rose) e F-21 (*Nopalea cochenillifera* Salm Dyck).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Departamento de Fitotecnia, no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba. Para o ensaio foram utilizados cladódios de duas variedades de palma forrageira F-24 (*Opuntia atropes* Rose) e F-21 (*Nopalea cochenillifera* Salm Dyck).

Os cladódios maduros foram coletados do banco de germoplasma do Instituto Agrônomo de Pernambuco-IPA, da estação experimental situada na cidade de Arcoverde-PE.

No laboratório os cladódios foram lavados com detergente neutro na concentração (1:1) e água corrente, para descontaminação inicial. Em seguida, foram desinfestados com hipoclorito de sódio a 1%, durante 15 minutos; após a desinfestação foram lavados com água destilada. Os cladódios foram colocados diretamente em uma câmara incubadora tipo B.O.D., na temperatura de 30,6°C, para indução de brotações.

Em câmara de fluxo laminar, as brotações emitidas, com aproximadamente 10 cm de comprimento, foram retiradas e imersas em solução contendo hipoclorito de sódio 1% + 10 gotas de Tween® 20, por 15 minutos e/ou hipoclorito de sódio 1% + cloreto de mercúrio 0,2%; por 10 minutos. Os explantes foram excisados dos brotos na forma de retângulo, com aproximadamente 1 (um) cm<sup>2</sup> contendo as auréolas.

Os explantes foram cultivados em meio de cultura MS<sup>18</sup>, contendo 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, suplementado com seis concentrações de BA (benziladenina) (0; 0,5; 1,1; 2,2; 4,4; 8,8 µM) e AIA (ácido indolacético) (0,6 µM), gelificado com 0,8% de ágar e pH ajustado para 5,85. As culturas foram mantidas em sala de crescimento em condições controladas de temperatura 25 ± 2 °C, sob luz fluorescente com intensidade de 30 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. As avaliações da porcentagem de brotação foram realizadas aos 30 dias e 60 dias após a inoculação.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso em esquema fatorial, 2 x 6 (duas variedades x 6 concentrações de BA), com três repetições. A repetição consistiu de um frasco contendo cinco explantes. Os dados foram analisados estatisticamente com base na análise de tendência das médias por meio de curvas ajustadas por regressão polinomial utilizando o programa da Microsoft Office® 2010.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra o efeito do BA (benziladenina) na porcentagem de brotações nas duas variedades de palma forrageira (*Opuntia* spp.) após 30 dias de cultivo. Os resultados indicam uma variabilidade de respostas entre os genótipos de palma e as concentrações de BA utilizadas para o crescimento dos brotos. No entanto, os mesmos foram responsivos a presença de BA, onde a resposta seguiu uma tendência de curva sigmóide, onde com o aumento da concentração de BA, aumenta-se a porcentagem de brotação, até uma concentração ótima. Após esse ponto há uma tendência de decréscimo na porcentagem de resposta à indução de brotação. Resultados semelhantes foram descritos por García-Saucedo *et al.*<sup>10</sup> e Mohamed-Yasseen *et al.*<sup>19</sup> estudando a espécie *O. ficus indica*.

O ponto de máxima eficiência da curva (melhor concentração de BA), para a indução de brotação aos 30 dias foi 3,7  $\mu\text{M}$  BA para a variedade F-24, e 4,5  $\mu\text{M}$  BA para a variedade F-21. Com estimativa de porcentagem de brotação de 58% (F-24) e 21% (F-21) (Figura 1). Aos 60 dias o ponto de máxima eficiência da curva foi 4,1  $\mu\text{M}$  BA para a variedade F-24, com estimativa de porcentagem de brotação de 85% (Figura 2).

O genótipo F-21 apresentou significativa oxidação, o que impossibilitou o seu crescimento após 30 dias. A oxidação ocorreu devido à liberação de compostos fenólicos, pelo tecido injuriado. Esses polifenóis e produtos de oxidação estão presentes em grandes quantidades nos tecidos da *Opuntia* spp. e podem modificar a composição química do meio de cultivo e a absorção de nutrientes e substâncias necessárias ao crescimento, além de provocar a oxidação e morte celular<sup>10, 1</sup>. Assim sendo, recomenda-se a troca do meio de cultura a cada 30 dias de cultivo dos explantes, para evitar a oxidação dos mesmos<sup>11</sup>.

A baixa porcentagem de brotação do genótipo F-21 aos 30 dias e a alta oxidação observada após esse período, influenciaram o estabelecimento e multiplicação das culturas. Paz & Silveira<sup>22</sup> estudando outros genótipos de palma forrageira (*Opuntia ficus indica*), genótipos V-11 e V-21, relataram que 100% dos explantes apresentaram alta taxa de oxidação sem formação de brotações adventícias. Os mesmos sugerem que a alta taxa de explantes sem desenvolvimento está associada à perda de vigor juntamente com a produção de substâncias fenólicas ou a outros fatores, como habituação ou maturidade dos explantes.

De fato, em plantios experimentais de palma forrageira do Instituto Agrônomo de Pernambuco-IPA, observa-se que algumas variedades possuem mecanismos de dormência fisiológica, induzidos na época seca, provavelmente uma adaptação aos ambientes onde as mesmas são cultivadas. Esses cladódios quando destacados da planta mãe e plantados não se desenvolvem, a menos que condições favoráveis de umidade do solo e temperatura estejam satisfatórias (dados não publicados).

Além disso, alguns explantes utilizados neste trabalho eram menores que 1  $\text{cm}^2$ , isso pode ter influenciado em sua resposta aos meios de crescimento. Estrada-Luna *et al.*<sup>6</sup> relatam que explantes menores que 1  $\text{cm}^2$  paralisam o crescimento e não respondem aos meios de cultura ou morrem depois de vários dias, e em termos de taxas de propagação do sistema representam uma redução considerável.

Na literatura resultados semelhantes para a concentração mais promissora da indução de brotação em palma forrageira tem sido reportados. Vasconcelos *et al.*<sup>29</sup> estudando o estabelecimento de *Nopalea cochenillifera*, variedade miúda, onde foi observada que a presença de 4,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 0,6  $\mu\text{M}$  de AIA, induziu o maior número de brotações e menor índice de necrose.

Estudando o estabelecimento de dez variedades de *Opuntia ficus indica*, variedades Gigante, IPA-20, F-2, F-4, F-7, F-8, F-15, F-17, Redonda e F-25, Frota *et al.*<sup>8</sup> verificaram diferenças na regeneração entre os clones e meios de indução testados e que a concentração 4,4  $\mu\text{M}$  de BAP proporcionou as melhores médias da proliferação de brotos para os 10 genótipos, em média 50%. Estrada-Luna *et al.*<sup>6</sup> estudando a micropropagação de *Opuntia lanigera* relataram que a concentração que mais induziu brotação nos explantes foi 5,0  $\mu\text{M}$  de BA.

Apesar dos resultados obtidos no presente trabalho serem próximos aos relatados por alguns pesquisadores, a diversidade de respostas da palma forrageira aos tratamentos com citocininas são variados. Zoghalmi *et al.*<sup>30</sup> estudando a estabilidade a longo prazo de micropropágulos de *Opuntia ficus indica*, cultivar Giolla, para conservação *in vitro*, estabeleceram que a concentração de 2,2  $\mu\text{M}$  de BAP foi a que proporcionou 100% de regeneração. Llamoca-Zárate *et al.*<sup>15</sup> estudando o estabelecimento de cultura de suspensão de calos em *Opuntia ficus indica*, variedade Gigante, estabeleceram que a melhor combinação das concentrações para induzir o crescimento ótimo dos calos foram 0,9  $\mu\text{M}$  de BAP e 2,3  $\mu\text{M}$  de ácido 2,4 diclorofenoxiacético, com 60% de viabilidade das células.

Trabalhando com a *Opuntia ficus indica*, variedades Gigante, IPA-20, F-2, F-4, F-7, F-8, F-15, F-17, Redonda e F-25, Frota *et al.*<sup>9</sup> verificaram diferenças nas brotações entre os clones e meios de indução testados e concluíram que a combinação das concentrações 8,9  $\mu\text{M}$  de BAP e 1,4  $\mu\text{M}$  de AIA induziram a maior percentagem de brotação entre os clones (89%). García-Saucedo *et al.*<sup>10</sup> estudando a regeneração de três genótipos de *Opuntia ficus indica*, Blanco sin Espina, Milpa Alta e Villa Nueva, observaram que a concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  de BA induziu a maior formação de brotos e que o aumento da concentração de BA reduziram as brotações. Além disso, os autores também relataram a diferença existente entre os genótipos quanto à resposta as concentrações de BA. Mohamed-Yasseen *et al.*<sup>19</sup> estudando *O. ficus indica* na fase de estabelecimento observaram maior indução de brotações na presença de 8,8  $\mu\text{M}$  de BA e 0,5  $\mu\text{M}$  de ANA.

Apesar da maioria das pesquisas de propagação *in vitro* serem com *O. ficus indica*, existem estudos com outras espécies. Juárez & Passera [14] trabalhando com *Opuntia ellisiana* relataram 100% de regeneração na presença de 10  $\mu\text{M}$  de BAP e 10  $\mu\text{M}$  de IBA. Escobar *et al.*<sup>5</sup> observaram que 100% dos explantes de *Opuntia amyclaea*, cultivar Copena-5, regeneraram com 10  $\mu\text{M}$  de BAP.

A diversidade de respostas da palma forrageira aos tratamentos com citocininas é variada e depende do 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, diferença entre espécies e variedades, idade e estado fisiológico do material utilizado como doador dos explantes; e tratamento utilizado para desinfestação do material, uso de antioxidantes etc<sup>28</sup>. Assim sendo, o estabelecimento de concentrações de BA para a indução de brotação para cada espécie e/ou variedade se faz necessária.

Estudos futuros sobre o uso de antioxidantes e outras combinações de reguladores de crescimento deverão ser conduzidos para minimizar a baixa percentagem de brotação e a alta oxidação observadas nesse trabalho.

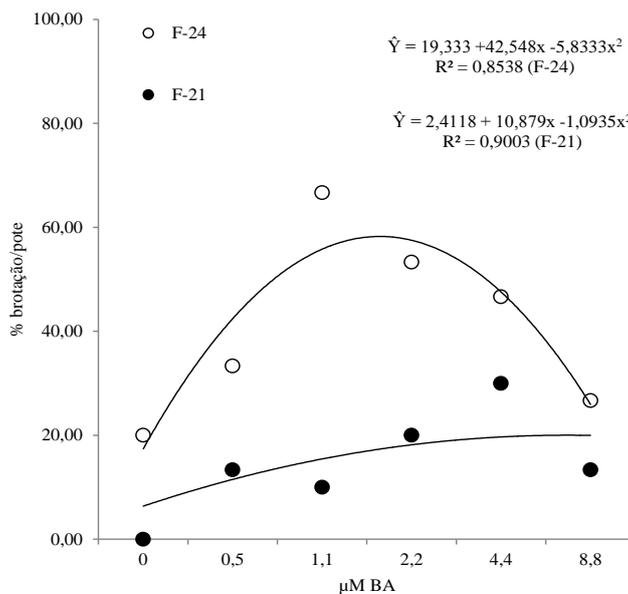


Figura 1: Efeito do BA (benziladenina) na porcentagem de brotação "in vitro" de palma forrageira variedades F-24 (*Opuntia atropes*) e F-21 (*Nopalea cochenillifera*), após 30 dias de incubação em sala de crescimento. \* Os pontos representam média de três repetições, cada repetição continham 5 explantes

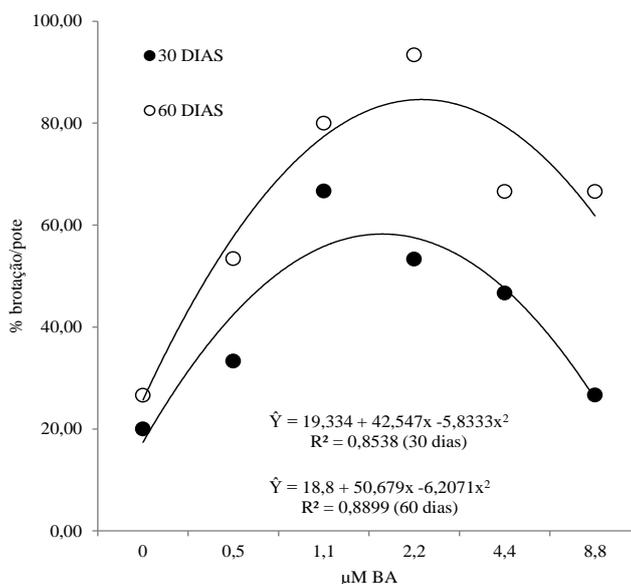


Figura 2: Efeito do BA (benziladenina) na porcentagem de brotação "in vitro" de palma forrageira variedades F-24 (*Opuntia atropes*), após 30 e 60 dias de incubação em sala de crescimento. \*Os pontos representam média de três repetições, cada repetição continham 5 explantes

#### 4. CONCLUSÕES

As concentrações de BA mais efetivas na indução de brotação nos genótipos de palma foram 3,7  $\mu\text{M}$  para variedade F-24 (*O. atropes*), e 4,5  $\mu\text{M}$  para variedade F-21 (*N. cochenillifera*).

## 5. AGRADECIMENTOS

Aos pesquisadores do Instituto Agronômico de Pernambuco-IPA, Djalma Cordeiro dos Santos, Maria da Conceição Silva e Vanda Lucia Arcanjo Pereira por disponibilizar o material utilizado nessa pesquisa. Aos estudantes do Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, pela ajuda técnica prestada. E ao programa de pós-graduação em Agronomia da UFPB, em especial aos professores pelo incentivo a pesquisa.

1. Andrade MW, Luz JMQ, Lacerda AS, Melo PRA. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). *Ciência e Agrotecnologia* 24 (1): 174-180, 2000.
2. Araújo KD, Dantas RT, Andrade AP, Parente HN, Éder-Silva E. Uso de espécies da caatinga na alimentação de rebanhos no município de São João do Cariri-PB. *R. RA'E GA* 20: 157-171, 2010.
3. Calderón-Paniagua N; Estrada-Luna AA, Martínez-Hernández JJ. Efecto de la salinidad en el crecimiento y absorción nutrimental de plantas micropropagadas de nopal (*Opuntia* spp.). *Revista Chapingo: Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 7 (2): 127-132, 2001.
4. Chiacchio FPB, Mesquita AS, Santos JR. Palma forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o semi-árido baiano. *Bahia Agrícola* 7 (3) 39-49, 2006.
5. Escobar A, Villalobos A, Villegas MA. *Opuntia* micropropagation by axillary proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 7: 269-277, 1986.
6. Estrada-Luna AA, Martínez-Hernández JJ, Torres-Torres ME, Chablé-Moreno F. *In vitro* micropropagation of the ornamental prickly pear cactus *Opuntia lanígera* Salm-Dyck and effects of sprayed GA<sub>3</sub> after transplantation to *ex vitro* conditions. *Scientia Horticulturae* 117: 378-385, 2008.
7. Estrada-Luna AA, López-Peralta C, Cárdenas-Soriano E. *In vitro* micrografting and histology of the graft union formation of selected species of prickly pear cactus (*Opuntia* spp.). *Scientia Horticulturae* 92: 317-327, 2002.
8. Frota HM, Carneiro MSS, Llamoca-Zárate RM, Campos FAP, Peixoto MJA. Proliferação e enraizamento *in vitro* de brotos de palma forrageira – *Opuntia ficus-indica* (L.) MILL. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 26 (2): 235-238, 2004a.
9. Frota HM, Carneiro MSS, Llamoca-Zárate RM, Campos FAP, Peixoto MJA. Efeitos do BAP e do AIA na indução e no crescimento *in vitro* de brotos de dez clones de palma forrageira. *Revista Ciência Agronômica* 35: 279-283, 2004b.
10. García-Saucedo PA, Valdez-Morales M, Valverde ME, Cruz-Hernández A, Paredes-López O. Plant regeneration of three *Opuntia* genotypes used as human food. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 80: 125-219, 2005.
11. Gomes JCC. Produção de matrizes de morangueiro por meio de cultura de tecidos. Embrapa Clima Temperado, *Sistemas de Produção* 7. (2005). Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/MatrizesMorangueiro/index.htm>
12. Guevara-Figueroa T, Jiménez-Islas H, Reyes-Escogido ML, Mortensen AG, Laursen BB, Lin L-W, León-Rodríguez AD, Fomsgaard IS, Rosa APBDL. Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia* spp.). *Journal of Food Composition and Analysis* 23: 525-532, 2010.
13. Huxman TE, Snyder KA, Tissue D, Leffler AJ, Ogle K, Pockman WT, Sandquist DR, Potts DL, Schwinning S. Precipitation pulses and carbon fluxes in semiarid and arid ecosystems. *Oecologia* 141: 254-268, 2004.
14. Juárez MC, Passera, CB. *In vitro* propagation of *Opuntia ellisiana* Griff. And acclimatization to field conditions. *Biocell* 26 (3): 319-324 (2002)
15. Llamoca-Zárate RM, Studart-Guimarães C, Landsmann J, Campos FAP. Establishment of callus and cell suspension cultures of *Opuntia ficus-indica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58: 155-157, 1999.
16. Mauseth JD. Cactus tissue culture: a potential method of propagation. *Cactus & Succulent Journal (U.S.)* XLIX (2): 80-81, 1977.
17. Mauseth JD. A new method for the propagation of cacti: sterile culture of axillary buds. *Cactus & Succulent Journal (U.S.)* 51: 186-187, 1979.
18. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497, 1962.

19. Mohamed-Yassen Y, Barringer SA, Splittstoesser WE, Schnell R. Rapid propagation of tuna (*Opuntia ficus indica*) and plant establishment in soil. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 42: 117–119, 1995.
20. Noy-Meir, I. Desert Ecosystems: Environment and Producers. *Annual Review of Ecology and Systematics* 4: 25-51, 1973.
21. Oliveira FT, Silva JS, Silva RP, Andrade-Filho FC, Pereira-Junior EB. Palma forrageira: Adaptação e importância para os ecossistemas áridos e semiáridos. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável* 5 (4): 27-37, 2010.
22. Paz GVS, Silveira DG. Estabelecimento de protocolos para a multiplicação *in vitro* de palma forrageira [*Opuntia ficus-indica* (L.) MILL]. Disponível em: <http://www2.uefs.br/semic/upload/2011/2011XV-033GRE948-210.pdf>
23. Santos DC, Farias I, Lira MA, Santos MVF, Arruda GP, Coelho RSB, Dias FM, Melo JN. Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) em Pernambuco. Recife: IPA, 2006. 48p. (IPA. Documento, 30).
24. Sampaio EVSB. Fisiologia da palma. In: Menezes RSC, Simões DA, Sampaio EVSB. (eds). A palma no Nordeste do Brasil: conhecimento atual e novas perspectivas de uso. Recife: Editora Universitária da UFPE, p.43-55, 2005.
25. Sachar, RC, Iyer, RD. Effect of auxin, kinetin and gibberellin on the placental tissue of *Opuntia dellenii* Haw. Cultured *in vitro*. *Phytomorph* 9: 1-3, 1959.
26. Taiz L, Zeiger E. Fisiologia Vegetal. 5ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
27. Vasconcelos AGV, Lira MA, Cavalcanti VLB, Santos MVF, Willadino L. Seleção de clones de palma forrageira resistentes à cochonilha-do-carmim (*Dactylopius* sp). *Revista Brasileira de Zootecnia* 38 (5): 827-831, 2009.
28. Vasconcelos AGV, Donato VMTS, Brito JZ, Lira MA. Cultura de tecidos vegetais: técnicas utilizadas para multiplicação acelerada da palma forrageira. In: Figueiredo MVB, Burity HÁ, Oliveira JP, Santos CERS, Stamford NP. Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas; Recife: Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA), 2010. p.653-677
29. Vasconcelos AGV, Lira MA, Cavalcanti VAL, Santos MVF, Câmara T, Willadino L. Micropropagação de palma forrageira cv. Miúda (*Nopalea cochenillifera* – Salm Dyck). *Agraria* 2 (1): 28-31, 2007.
30. Zoghalmi N, Bouamama B, Khammassi M, Ghorbel A. Genetic stability of long-term micropropagated *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. plantlets as assessed by molecular tools: Perspectives for *in vitro* conservation. *Industrial Crops and Products* 36: 59-64, 2012.