

Indução de brotos in vitro em maracujazeiro doce brs mel do cerrado**Induction of brotes in sweet brass passion fruit ‘mel do cerrado’ cultivated in vitro**

DOI:10.34117/bjdv6n3-006

Recebimento dos originais: 30/12/2019

Aceitação para publicação: 28/02/2020

Leticia Vanni FerreiraInstituto Federal do Rio Grande do Sul, Campus Ibirubá
letivf@hotmail.com**Marisa Taniguchi**Universidade Federal de Pelotas
marisataniguchi@yahoo.com.br**Caroline Farias Barreto**Universidade Federal de Pelotas
carol_fariasb@hotmail.com**Talis Basílio da Silva**Universidade Federal de Pelotas
talesbs28@gmail.com**Luis Eduardo Correa Antunes**Embrapa Clima Temperado
luis.antunes@embrapa.br**Leonardo Ferreira Dutra**Embrapa Clima Temperado
leonardo.dutra@embrapa.br**RESUMO**

A micropropagação é alternativa à produção de mudas de maracujazeiro, a qual é correntemente realizada por meio de sementes. Por meio do cultivo in vitro podem ser produzidos, em grande escala, clones selecionados de variedades com interesse comercial, como a ‘BRS Mel do Cerrado’. Sendo assim, objetivou-se estabelecer a concentração adequada de 6-benzilaminopurina (BAP) na indução da brotos de maracujazeiro ‘BRS Mel do Cerrado’ visando à sua micropropagação. Gemas de aproximadamente 2 mm, provenientes de plantas pré-estabelecidas in vitro, foram excisadas e inoculadas em placas de Petri contendo 25 mL de meio MS, suplementado com 3% de sacarose, geleificado com 0,7% de ágar e BAP (0,0; 0,5; 1,0 e 1,5 mg L⁻¹). O BAP adicionado ao meio de cultura promoveu a brotação dos explantes, não havendo diferença significativa entre as concentrações do fitorregulador para número e comprimento de brotos. A adição de BAP ao meio de cultura aumenta a produção de massa fresca e seca de plantas de maracujazeiro ‘BRS Mel do Cerrado’.

Palavras-chave: Passiflora alata Curtis; maracujá; brotação; cultura de tecidos

ABSTRACT

Micropropagation offers a good alternative to the production of passion fruit seedlings, which is currently performed through seeds, causing a number of productive drawbacks. Through in vitro cultivation can be produced, on a large scale, selected clones of varieties of commercial interest, such as 'BRS Mel do Cerrado'. Thus, the objective of this study was to establish the adequate concentration of cytokine BAP in the induction of passion fruit budding 'BRS Mel do Cerrado' aiming the micropropagation of the species. Thus, the objective was to establish the appropriate concentration of 6-benzylaminopurine (BAP) in the induction of passion fruit buds 'BRS Honey Cerrado' aiming at its micropropagation. Approximately 2 mm buds from pre-established in vitro plants were excised and inoculated in Petri dishes containing 25 mL MS medium, supplemented with 3% sucrose, gelled with 0.7% agar and BAP (0,0; 0,5; 1,0 e 1,5 mg L⁻¹). The BAP added to the culture medium promoted explant budding, with no significant difference between phytohormone concentrations for number and length of shoots. The addition of BAP to the culture medium increases the fresh and dry mass production of 'BRS Mel do Cerrado' passion fruit plants.

Keywords: *Passiflora alata* Curtis; passion fruit; sprouting; tissue culture.

1 INTRODUÇÃO

Passiflora alata, conhecida popularmente por maracujá doce, é cultivada em todo o território nacional, mas encontrada também, no Peru, Paraguai e Argentina (PEREIRA & VILEGAS, 2000; MELETTI et al., 2011). Destaca-se no cenário nacional como fonte de princípios ativos para indústria farmacêutica, cosmética e medicinal, onde das folhas e dos ramos é extraída a passiflorina, substância tranquilizante (MOREIRA et al., 2012), além de possuir grande potencial para o comércio in natura, tanto no mercado interno quanto para exportação.

O maracujazeiro proporciona alternativa de cultivo entre as frutíferas, por oferecer rápido retorno econômico e receita distribuída durante o ano (MELETTI, 2011). Enquanto a maioria das outras frutíferas necessita de alguns anos para entrar em produção, o maracujazeiro entra em produção já no primeiro ciclo (WEBER et al., 2016), repercutindo em rápido retorno econômico ao produtor (BARRETO et al., 2019).

O Brasil produz aproximadamente 555 mil toneladas de maracujás em 41 mil hectares, sendo apenas 5 mil toneladas produzidas anualmente no estado do Rio Grande do Sul (IBGE, 2019). Dentre as espécies mais cultivadas destacam-se o maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims.) e o maracujazeiro doce (*Passiflora alata* Curtis). estimando-se que essas cultivares ocupem mais de 90% da área cultivada no mundo (FALEIRO et al., 2005; FERREIRA, 2016).

Embora haja grande interesse comercial, a cultivar BRS Mel do Cerrado foi registrada somente em 2017 (OLIVEIRA; FALEIRO; JUNQUEIRA, 2017). É destinada ao mercado de frutas especiais de alto valor agregado, tendo como características principais a alta produtividade, a qualidade física e química de frutos e maior resistência a doenças foliares. A cultivar também possui potencial ornamental devido à beleza de suas flores (EMBRAPA, 2017).

A propagação do maracujazeiro é realizada predominantemente por via sexuada, devido às características florais e principalmente à autoincompatibilidade, que acarretam consequências na produção de plantas com elevada variabilidade genética e desuniformidade em relação às características agrônômicas (BRUCKNER et al., 1995; FERREIRA et al., 2010).

A micropropagação pode ser uma prática utilizada para produção de mudas de maracujazeiro, tornando-se uma alternativa para a produção em grande escala e de clones selecionados de variedades com interesse comercial (FREITAS, 1997; FARIA et al., 2007). Além disso, poderá influir na solução de problemas fitossanitários, visto que o cultivo do maracujazeiro doce tem sido limitado pelo ataque e suscetibilidade a doenças causadas por vírus, bactérias e fungos (PAULA et al., 2010; FISCHER et al., 2010).

A cultura *in vitro* de *P. alata* tem sido descrita a partir de segmentos nodais, de folhas (RODRIGUEZ et al., 2007) e segmentos hipocotiledonares (PINTO et al., 2010). No entanto, a otimização de um protocolo para estabelecimento, desenvolvimento e regeneração *in vitro* de *Passiflora alata* representa grande importância para a multiplicação e conservação de germoplasma (PACHECO et al., 2012).

Considerando o exposto, objetivou-se estabelecer a concentração adequada de 6-benzilaminopurina (BAP) na indução das brotações de maracujazeiro 'BRS Mel do Cerrado' visando à micropropagação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Matrizes de maracujazeiro 'BRS Mel do Cerrado', oriundas de germinação de sementes, mantidas em área experimental da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS (31° 40' S e 52° 26' W e altitude de 70 m), foram utilizadas como fonte de explantes. Destas, foram retirados segmentos nodais que foram inoculados *in vitro*.

Gemas com aproximadamente 2 mm, provenientes das plantas pré-estabelecidas *in vitro*, foram excisadas e inoculadas em placas de Petri, contendo 25 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 3% de sacarose, geleificado com 0,7% de ágar e BAP nas concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5 mg L⁻¹. O tratamento testemunha constou do meio de cultura sem adição do fitorregulador. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, realizada a 120°C por 20 minutos.

Posteriormente à inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento por 30 dias, sob condições de fotoperíodo de 16 horas, a 25±2 °C e com densidade de fluxo de fótons de 36 μmol m⁻² s⁻¹.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições de placas, cada uma contendo cinco explantes. As variáveis foram avaliadas após 30 dias, sendo elas: número médio de brotos, comprimento do maior broto e massa fresca e seca de gemas,

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SISVAR (FERRREIRA, 2014).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O BAP adicionado ao meio de cultura estimulou a brotação dos explantes, entretanto não houve diferença significativa entre as concentrações do fitorregulador para número e o comprimento de brotos (Tabela 1).

Tanto a ausência (0 mg L^{-1}) quanto a menor ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) e maior ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) concentração de BAP tenderam a produzir menos brotações e, por consequência, menor crescimento da parte aérea. Provavelmente, a maior formação de brotos apresentado pelas plantas tratadas com a concentração de 1 mg L^{-1} de BAP pode estar relacionada a alta atividade da citocinina na parte aérea (BAKHTIAR; MIRJALILI; SONBOLI, 2016) e ou ao equilíbrio entre a concentração endógena (explante) e exógena aplicada, estimulando a sinergia entre as diferentes origens da citocinina. Sendo o BAP considerado o fitorregulador sintético de uso mais abrangente, utilizado nas etapas de propagação *in vitro*, com influência mais efetiva para multiplicação de diversas espécies de plantas e com o menor custo de aquisição (ARAGÃO et al., 2011; ROLLI et al., 2015; DZIEDZIC; MCDONALD, 2016), é o mais comumente utilizado nos processos de produção de plantas matrizes a partir da regeneração e multiplicação de tecidos vegetais.

Tabela 1. Número de brotos (NB) e comprimento do maior broto (CB) de explantes de maracujazeiro ‘BRS Mel do Cerrado’ cultivados em meio de cultura contendo diferentes concentrações de BAP. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2020.

BAP (mg L^{-1})	NB	CB (mm)
0	2,50 ^{ns}	2,75 ^{ns}
0,5	2,00	2,75
1,0	5,50	5,50
1,5	3,00	3,25
C.V. (%)	65,33	77,51

C.V.(%) Coeficiente de variação.
*^{ns} (não significativo) a 5% de probabilidade de erro.

Sabe-se que a concentração de reguladores, como as auxinas, ocorre de forma diferenciada ao longo do caule da planta e a adição exógena de fitorreguladores como as citocininas, desencadeia alteração do balanço hormonal endógeno dos tecidos dos explantes utilizados, interferindo no seu

desenvolvimento. Isso pode explicar as respostas encontradas neste trabalho, onde não houve diferença significativa para o número de brotos, possivelmente pela presença dos hormônios endógenos e pelo genótipo utilizado.

Pacheco et al. (2012) observaram maior eficiência de regeneração da espécie *P. alata* nas concentrações de 1 e 3 mg L⁻¹ de BAP, obtendo maior número de brotações via organogênese. Os mesmos autores verificaram ainda que a concentração de BAP a 1,0 mg L⁻¹ promoveu maior comprimento e número de brotos da cultivar BRS Mel do Cerrado. Estes dados são semelhantes aos obtidos no presente estudo, onde a concentração de 1 mg L⁻¹ proporcionou maior número de brotos (5,5), embora essa diferença não tenha sido significativa.

Apesar de estatisticamente os dados não apresentarem diferença significativa, numericamente pode-se observar redução do número de brotos na concentração de 1,5 mg L⁻¹ (3,0), comparando-se com 1,0 mg L⁻¹ (5,5), essa redução, pode estar relacionada à resposta das plantas ao aumento do estresse, promovido pelo aumento da concentração de BAP. O estresse ocasionado pelo aumento da concentração de citocinina, pode ativar genes que alteram o balanço hormonal endógeno de citocininas, que estão relacionados à síntese de citocininas oxidases/desidrogenases que se ligam a sítios específicos do substrato, realizando sua catálise (MACKOVÁ et al., 2013; KOPEČNÝ et al., 2016).

As condições fisiológicas e hormonais dos explantes utilizados, aliada às concentrações de reguladores de crescimento, devem proporcionar um equilíbrio adequado entre citocininas e auxinas, para promover maior formação de brotos. É observado que a fonte e a concentração de citocinina, influenciam o processo de desenvolvimento in vitro (CID, 2014). Dessa forma, na busca pelo estabelecimento de um protocolo eficiente de micropropagação de maracujazeiro, os resultados obtidos são promissores. No entanto, avanços podem ser obtidos em função de interações entre fitorreguladores e meios de cultura, além do uso de outras técnicas de micropropagação, como a técnica do hidrogel para o encapsulamento das gemas laterais.

Maior matéria fresca foi obtida nos explantes cultivados em meio de cultura contendo 1,0 mg L⁻¹ de BAP, diferindo significativamente dos demais tratamentos. Resultado semelhante foi obtido com a matéria seca, no entanto, a concentração de 1mg L⁻¹ de BAP diferiu somente do tratamento controle. Neste sentido, de maneira geral e considerando os resultados obtidos, recomenda-se o uso de 1,0 mg L⁻¹ de BAP para multiplicação in vitro de maracujazeiro 'BRS Mel do Cerrado'.

Na concentração de 1,0 mg L⁻¹ de BAP os explantes apresentaram relativamente maior conteúdo de massa fresca e massa seca (Tabela 2). Isso ocorre porque o uso das citocininas além de estimular brotações, por promover a quebra da dominância apical, também aumenta a produção de biomassa ao estimular a formação de brotação lateral (MARTINS et al., 2014). Assim, o acúmulo

adequado de reservas nesta fase pode proporcionar aumento da taxa de sucesso na multiplicação do explante, mitigando perdas de plantas, o que reduz os custos de produção das mudas.

Tabela 2. Massa fresca (MF) e massa seca de gemas (MS) de explantes de maracujazeiro ‘BRS Mel do Cerrado’ cultivados em meio de cultura contendo diferentes concentrações de BAP. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2020.

BAP (mg L ⁻¹)	MF (g)	MS (g)
0	0,13 b	0,04 b
0,5	0,18 b	0,08 ab
1,0	0,96 a	0,14 a
1,5	0,44 b	0,09 ab
C.V. (%)	53,58	48,23

C.V.(%) Coeficiente de variação.

*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

4 CONCLUSÕES

A adição de 1,0 mg L⁻¹ de BAP ao meio de cultura aumenta a produção de massa fresca e seca de explantes de maracujazeiro ‘BRS Mel do Cerrado’.

Número e comprimento de brotos não são afetados pela concentração de BAP adicionada ao meio de cultura.

REFERÊNCIAS

- ARAGÃO, A.K.O.; ALOUFA, M.A.I.; COSTA I.A. O efeito do BAP (6-benzilaminopurina) sobre a indução de brotos em explantes de pau-brasil. *Cerne* [online], Lavras, v. 17, n. 3, p. 339-345, 2011.
- BARRETO, C.F.; COSTA, S.I.; BECKER, T.; FERREIRA, L.V.; NAVROSKI, R.; BENATI, J.A.; FALEIRO, F.; ANTUNES, L.E.C. Produção de Maracujazeiros da Embrapa em Pelotas-RS. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento* 323. 15p. 1ª edição. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2019.
- BAKHTIAR, Z; MIRJALILI, M. H.; SONBOLI, A. In vitro callus induction and micropropagation of *Thymus persicus* (Lamiaceae), an endangered medicinal plant. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 16, n. 1, p. 48-54, 2016.
- BRUCKNER, C.H.; CASALI, V.W.D.; MORAES, C.F. de; REGAZZI, A.J.; SILVA, E.A.M. da. Self-incompatibility in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Acta Horticulturae*, v.370, p.45-57, 1995.
- CID, L.P.B. Editor Técnico. *Cultivo in vitro de plantas*. 3 ed. Brasília, DF, Embrapa, 2014, 325p
- DZIEDZIC, J. A.; MCDONALD, A. G. Mass spectrometry data for in vitro protein profiles in early and late stages of Douglas-fir xylogenesis. *Data in brief*, v. 7, p. 1048-1051, 2016.

EMBRAPA. Maracujá doce - BRS Mel do Cerrado (BRS MC). **Informe técnico**. 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/4126/maracuja-doce---brs-mel-do-cerrado-brs-mc>>. Acesso em: 02 de agosto de 2018.

FARIA, G.A.; COSTA, M.A.P.C.; LEDO, C.A.S.; JUNGHANS, T.G.; SOUZA, A.S.; CUNHA, M. A. P. Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento in vitro de espécies de maracujazeiro. *Bragantia*, Campinas, v.66, n.4, p.535-543, 2007.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Ed.) Maracujá germoplasma e melhoramento genético. Brasília, DF: Embrapa Cerrados. p. 80-108, 2005.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; JUNGHANS, T.; JESUS, O.N.; MIRANDA, D.; OTONI, W.C. Advances in passion fruit (*Passiflora* spp.) propagation. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.41, n.2, Jaboticabal, 2019. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452019155>. Acesso em 20 dez 2019.

FERREIRA, T. G. T.; PENHA, H. A.; ZUCCHI, M. I.; SANTOS, A. A.; HANAI, L. R.; JUNQUEIRA, N.; BRAGA, M. F.; VENCOSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Outcrossing rate in sweet passion fruit based on molecular markers. *Plant Breeding*. v.6, p. 727-730, 2010.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.38, n.2, p.109-112, 2014.

FERREIRA, C.C. Desempenho agronômico e reação de genótipos de maracujazeiro às doenças fúngicas, à bacteriose e à virose do endurecimento do fruto sob condições de campo e casa de vegetação. 228 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2016.

FISCHER, I.H.; BUENO, C.J.; GARCIA, M.J.M.; ALMEIDA, A.M. Reação de maracujazeiro-amarelo ao complexo fusariose-nematoide de galha. *Acta Scientiarum Agronomy*, Maringá, v. 32, n. 2, p. 223-227, 2010.

FREITAS, I.M.N. Micropropagação in vitro de maracujazeiro. *Atas de Horticultura*. Vilamoura, v.18, p.103-106, 1997.

IBGE. Produção Agrícola Municipal. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_%5D/2013/tabelas_pdf/tabela03.pdf. Acesso em: 2 jul. 2019.

Banual%5D/2013/tabelas_pdf/tabela03.pdf. Acesso em: 2 jul. 2019.

KOPEČNÝ, David et al. Kinetic and structural investigation of the cytokinin oxidase/dehydrogenase active site. *The FEBS Journal*, v. 283, n. 2, p. 361-377, 2016.

MELETTI, L. M. M. Advances in passionfruit culture in Brazil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 33, n. Spe 1, p. 83-91, 2011.

MACKOVÁ, H.; HRONKOVÁ, M.; DOBRÁ J.; TUREČKOVÁ, V., NOVÁK, O.; LUBOVSKÁ, Z.; MOTYKA, V.; HASEL, D.; HÁJEK, T.; PRÁŠIL, I.T; GAUDINOVÁ, A.; ŠTORCHOVÁ,H.; GE1,E.; WERNER, T. THOMAS SCHMÜLLING, T.; VANKOVÁ1,R. Enhanced drought and heat stress tolerance of tobacco plants with ectopically enhanced cytokinin oxidase/dehydrogenase gene expression. *Journal of Experimental Botany*, v. 64, n. 10, p. 2805-2815, 2013.

MARTINS, João Paulo Rodrigues et al. Direct organogenesis and leaf-anatomy modifications in vitro of *Neoregelia concentrica* (Vellozo) LB Smith (Bromeliaceae). *Pakistan Journal of Botany*, v. 46, p. 2179-2187, 2014.

MOREIRA, C. P. S.; SILVA, C. G.; ALMEIDA, V. L. Propriedades químicas e medicinais do maracujá. *Informe Agropecuário*, v. 33, p. 7-16, 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, v.15, n.3, p.473-479, 1962.

OLIVEIRA, J. S.; FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V. Importância dos maracujás (*Passiflora* L. spp.) e seu uso comercial. *Revista RG News*, v.3, n.3, p. 72-81, 2017.

PACHECO, G.; GARCIA, E.L.; VIANNA, M.; MANSUR, E. Plant regeneration, callus induction and establishment of cell suspension cultures of *Passiflora alata* Curtis, *Scientia Horticulturae*, v. 144, p. 72-47, 2012.

PAULA, M. S.; FONSECA, M. E. N.; BOITEUX, L. S.; PEIXOTO, J. R. Caracterização genética de espécies de *Passiflora* por marcadores moleculares análogos a genes de resistência. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 32, p. 222-229, 2010.

PEREIRA, C.A.M.; VILEGAS, J.H.Y. Constituintes químicos e farmacológicos do gênero *Passiflora* com ênfase a *P. alata* Dryander, *P. Edulis* Sims e *P. Incarnata*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 3, n.1, p. 1-12, 2000.

PINTO, A. P. C.; MONTEIRO-HARA, A. C. B. A.; STIPP, L. C. L.; MENDES, B. M. J. In vitro 15 organogenesis of *Passiflora alata*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. v.46, p. 28-33, 2010.

ROLLI, Eleonora et al. In vitro micropropagation of the aquatic fern *Marsilea quadrifolia* L. and genetic stability assessment by RAPD markers. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, v. 149, n. 1, p. 7-14, 2015.

RODRIGUEZ, M. V.; SEVERÍN, C. R.; GIUBILEO, G.; GATTUSO, M. A.; PULIDO, L.; DI SAPIO, A. O.; GATTUSO, S. J. Cultivo in vitro de *Passiflora alata*, una forma de conservación genética. *Acta Horticulturae*. v. 4, p. 69-72, 2007.

WEBER, D.; ELOY, J.; GIOVANAZ, M. A.; FACHINELLO, J. C.; NACHTIGAL, J. C. Densidade de plantio e produção do maracujazeiroazedono sul do Brasil. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 38, n. 1, p. 99-106, 2016.