



Congrega
Urcamp 2016

13ª Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa

REVISTA DA JORNADA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA ISSN:1982-2960

13ª JORNADA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Fontes e concentrações de carboidratos na propagação in vitro de maracujá amarelo

Sources and carbohydrate concentrations on in vitro propagation of yellow passion fruit

Andrio Spiller Copatti⁽¹⁾, Savana Iribarem Costa⁽¹⁾, Paulo Mello-Farias⁽²⁾

(1) Doutorando(a) em Fruticultura de Clima Temperado, PPGA, Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, RS., CAPES, andriocopatti@gmail.com, vana_iribarem@hotmail.com.

(2) Dr. Professor- Fruticultura de Clima Temperado, PPGA, Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, RS. mellofarias@yahoo.com.br.

Resumo

A produção de maracujá concentra-se na América do Sul (Brasil, Equador, Peru e Colômbia) e em alguns países africanos, a produção brasileira representa aproximadamente 70% do maracujá produzido mundialmente. A produção massal é uma exigência corrente, no cultivo in vitro as plantas perdem parcialmente o autotrofismo, necessitando conseqüentemente de uma fonte exógena de carboidratos. Objetivou-se avaliar o efeito de diferentes combinações de fontes de carbono (sacarose e glicose) e das concentrações dos mesmos na propagação in vitro de *P. edulis*. Segmentos caulinares com uma gema e ápices excisados de maracujazeiro-amarelo foram inoculados em meio de cultura MS, contendo diferentes combinações de fontes carbônicas (sacarose e glicose) nas concentrações de 0, 15, 30, 45 e 15+15 g L⁻¹. E após, mantidos em sala de crescimento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema unifatorial, com cinco repetições, sendo cada constituída de um frasco com quatro explantes. Aos 60 dias de cultivo, foram avaliados número médio de folhas, brotações e raízes, comprimento médio das brotações (cm) e da maior raiz (cm). Sacarose e glicose na concentração de 15 g L⁻¹ apresentaram maior média para número de folhas, enquanto que a glicose (15 g L⁻¹) apresentou maior média de brotações. A sacarose na concentração de 15 g L⁻¹ promoveu maior média para o comprimento das brotações, enquanto para o número e comprimento de raízes as dosagens de 15, 30 e 45 g L⁻¹ de sacarose e 45 g L⁻¹ de glicose não diferiram estatisticamente entre si na multiplicação de explantes de maracujazeiro-amarelo cultivados em meio MS. Para a variável número de brotações a fonte de carbono, a glicose foi mais efetiva diferindo da sacarose nas três dosagens empregadas. Entretanto o número e o comprimento médio de raízes foram maiores quando se empregaram 15 e 30 g L⁻¹ e 15 g L⁻¹ de sacarose e glicose respectivamente. As fontes de carboidratos sacarose e glicose na concentração de 15 g L⁻¹ apresentaram maiores médias para números de folhas e brotações em cultivo in vitro de maracujazeiro-amarelo. O aumento no comprimento das brotações é favorecido quando o carboidrato sacarose (15 g L⁻¹) é utilizado como fonte de carbono. A sacarose nas dosagens de 15 e 30 g L⁻¹ é mais efetiva no enraizamento de explantes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* cultivados em meio MS.

Palavras chave: *P. edulis*, micropropagação, sacarose, glicose.

Abstract

Passion fruit production is concentrated in South America (Brazil, Ecuador, Peru and Colombia) and in some African countries. Brazilian production is approximately 70% of passion fruit produced worldwide. Mass production is a current requirement, on in vitro culture plants partially lose autotrophism, requiring therefore an exogenous source of carbohydrates. The aim of this research was to evaluate the effect of different combinations of carbon sources (sucrose and glucose) and concentrations on in vitro propagation of *P. edulis*. Shoot segments with a bud and apices excised from yellow passion fruit were inoculated in culture medium MS, containing different combinations of carbon sources (sucrose and glucose) at concentrations of 0, 15, 30, 45 and 15 + 15 g L⁻¹, and after, kept in growth room. Experimental design was completely randomized in unifactorial scheme, with five repetitions, each consisting of a bottle with four explants. After 60 days of culture, average number of leaves, sproutings and roots, medium sproutings length (cm) and the. Largest roots (cm) were evaluated. Sucrose and glucose (15 g L⁻¹) presented higher average for number of leaves, whereas glucose (15 g L⁻¹) showed higher shoots mean propagation. Sucrose at a concentration of 15 g L⁻¹ promoted greater average for length, while the number and length of root, the dosages of 15, 30 and 45 g L⁻¹ of sucrose and 45 g L⁻¹ of glucose did not differ among themselves in the explant multiplication of yellow passion fruit cultivated on MS medium. Analysing the variable number of shoots, glucose as a carbon source was more effective, differing from sucrose in three dosages employed. However, the number and the average length of the roots were larger when employed 15 and 30 g L⁻¹ and 15 g L⁻¹ of sucrose and glucose, respectively. Sucrose and glucose at a concentration of 15 g L⁻¹ as carbohydrates sources presented higher averages for numbers of leaves and shoots on in vitro cultivation of passion fruit. Increase in the length of shoots is favored when the carbohydrate sucrose (15 g L⁻¹) is used as a carbon source. Sucrose at doses of 15 and 30 g L⁻¹ is more effective in rooting explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* grown in MS culture medium.

Keywords: *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, micropropagation, sucrose, glucose.

Introdução

Pertencentes à família Passifloraceae, os maracujazeiros distribuem-se em mais de 630 espécies, sendo que na maioria pertencentes ao gênero *Passiflora* e habitantes de regiões tropicais e subtropicais da América da Sul (OLIVEIRA, 1987; VANDERPLANK, 1996).

A produção de maracujás concentra-se na América do Sul (Brasil, Equador, Peru e Colômbia) e em alguns países africanos. Nos países Sul-Americanos, predomina a produção do maracujá-amarelo, porém nos países Africanos e na Austrália há predomínio da produção

do maracujá-roxo. O Brasil é o maior produtor mundial de maracujás, e também o maior consumidor de frutos e seus derivados (LIMA et al., 2013).

Em 2010 a produção brasileira de maracujás foi em torno de 920 mil toneladas, representando aproximadamente 70% dos maracujás produzidos mundialmente, com uma área plantada de 62 mil hectares (IBGE, 2012). Porém, a produtividade de frutos por área nos pomares brasileiros ainda é considerada baixa, alcançando no ano de 2012 uma produtividade média de 13,1 t. ha⁻¹ de frutos. Enquanto que na safra 2013 verificou-se uma diminuição de 16% do total de frutos colhidos quando comparada à produção da safra de 2012, isso se deve, principalmente à ocorrência de doenças viróticas e à seca recorrente no nordeste brasileiro (SANTOS et al., 2013).

As espécies *Passiflora alata* Curtis, *Passiflora edulis* Sims e *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener são as mais cultivadas comercialmente no país. Destacando-se a espécie *P. edulis* f. *flavicarpa*, responsável por 95% dos pomares brasileiros, devido principalmente a seus atributos agrônômicos e as adequadas condições edafoclimáticas para seu cultivo (BERNACCI et al., 2008; MELETTI et al., 2010).

A propagação de plantas medicinais in vitro do gênero *Passiflora* tem se mostrado viável para a produção comercial de plantas elite. A cultura de tecidos vegetais é uma alternativa promissora de propagação do maracujazeiro devido à importância da cultura no País (OZAROWSKI; THIEMA, 2013).

Com o cultivo in vitro de tecidos vegetais, as plantas perdem parcialmente o autotrofismo, necessitando conseqüentemente de uma fonte exógena de carboidratos (FARIA et al., 2006; PEREA e TIRADO, 2011). A sacarose é o açúcar mais comum encontrado na seiva do floema da maioria das plantas e, não por acaso, a principal fonte de carbono utilizada em culturas de tecidos (CID et al., 2014).

As fontes carbônicas são indispensáveis para o crescimento celular in vitro (AIRES et al., 2007). O tipo e a concentração dos carboidratos no meio de cultivo têm importante influência da morfogênese de tecidos vegetais. A sacarose é parcialmente hidrolisada em glicose e frutose na passagem pela autoclave, a presença desses compostos é essencial para o crescimento das plantas, visto que a fotossíntese da planta, ou do explante é limitada (CID et al., 2014).

Porém, glicose e frutose raramente são incluídas no meio de cultivo (CID et al., 2014), abrindo-se uma oportunidade para o estudo das concentrações e tipos de carboidratos que podem ser empregados para se obter um desenvolvimento satisfatório de plantas micropropagadas. Assim, objetivou-se avaliar o efeito de diferentes combinações de fontes

de carbono (sacarose e glicose) e das concentrações dos mesmos na propagação in vitro de *P. edulis*.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Propagação de Plantas Frutíferas, Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas, no Município de Capão do Leão, RS, no ano de 2015.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, sendo cada repetição constituída de um frasco com quatro explantes. Os tratamentos foram distribuídos em esquema unifatorial constituídos de combinações entre fontes de carbono (sacarose e glicose) e concentrações dos mesmos (0, 15, 30, 45 e 15+15 g L⁻¹).

Utilizaram-se como explantes, segmentos caulinares com uma gema e ápices excisados, obtidos de plantas já previamente estabelecidas in vitro de maracujazeiro-amarelo (*P. edulis*).

Os explantes foram inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), adicionados de 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 0,5 mg L⁻¹ de BAP. O pH do meio de cultivo foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar na concentração de 6 g L⁻¹ e posteriormente autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Foram utilizados frascos de vidro com capacidade de 300 mL, com 30 mL de meio de cultura por frasco. Os frascos foram fechados com papel alumínio e selados com filme de PVC transparente, e após a inoculação, os mesmos permaneceram em sala de crescimento com temperatura constante de 25 ± 2°C e luminosidade artificial de lâmpadas fluorescentes brancas frias, com fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 27 μmol m⁻² s⁻¹.

Aos 60 dias de cultivo, foi avaliado o número médio de folhas, número médio de brotações, comprimento médio das brotações (cm), número médio de raízes e comprimento médio da maior raiz (cm).

Os valores atípicos (*outliers*) foram identificados com a plotagem dos resíduos estudentizados externamente (RStudent) versus valores preditos (variável Y). A partir do RStudent, valores que se encontravam fora do intervalo -2 a 2 foram considerados *outliers* e suas observações correspondentes foram removidas do banco de dados (ROUSSEEUW; LEROY, 1987; BARNETT; LEWIS, 1994). Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk; à homocedasticidade pelo teste de Hartley; e, à independência dos resíduos por análise gráfica. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância através do teste F (p≤0,05). Constatando-se significância estatística,

os efeitos das diferentes combinações de carboidratos e doses foram comparados pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Resultados e Discussão

Observou-se diferença significativa para as diferentes fontes de carbono e suas dosagens na propagação in vitro de plantas de maracujazeiro-amarelo (Tabela 1). Os tratamentos glicose e sacarose na dosagem de 15 g L^{-1} apresentaram maior produção média de folhas com respectivamente 8,25 e 7,10 folhas por explante. Para Faria et al. (2006), os maiores valores encontrados para número médio de folhas em plantas de *Passiflora giberti* N. E. Brown ocorreu quando houve a adição de 30 g L^{-1} de sacarose, combinada com 20 g L^{-1} de sorbitol, promovendo a formação média de 2,7 folhas por explante. A produção de folhas em plantas de maracujazeiro cultivadas in vitro, assim como pode ser visto no presente trabalho, não sofre influência de altas dosagens de carboidratos no meio nutritivo.

Para a variável número médio de brotações, a adição de glicose na dosagem de 15 g L^{-1} obteve melhores resultados estatísticos (2,13 brotações) quando comparada às outras combinações de fontes e concentrações de carboidratos. É possível observar que as demais dosagens não diferiram entre si, mesmo quando não ocorreu adição de carboidratos ao meio nutritivo. Nicoloso et al. (2003), verificaram que tanto na metade da dose (15 g L^{-1}) como na usualmente recomendada (30 g L^{-1}), a sacarose promoveu o menor número de brotações. Todavia, pelos valores numéricos apresentados observa-se que o número médio de brotações decresce, tanto nas dosagens de sacarose como de glicose quando estas se distanciam de 15 g L^{-1} . Segundo Grattapaglia e Machado (1998), a sacarose é a fonte de carbono mais utilizada nos protocolos de cultivo in vitro, sendo considerada a melhor fonte para a diferenciação celular e o desenvolvimento de plantas cultivadas in vitro.

Tabela 1- **Número de folhas, número de brotações, comprimento da maior brotação, número de raízes e comprimento da maior raiz em plantas de maracujazeiro-amarelo cultivadas in vitro sob diferentes combinações de fontes e concentrações de carbono.**

		Sacarose (g L^{-1})			Glicose (g L^{-1})		
15+15	0	15	30	45	15	30	45

Número de folhas	4,35 Cd ^{1/}	5,37 bc	7,10 a	2,92 de	1,60 e	8,25 a	4,10 cd	4,13 cd
Número de brotações	1,25 b	1,40 b	1,40 b	1,05 b	1,00 b	2,13 a	1,30 b	1,27 b
Comprimento da maior brotação (cm)	2,57 b	0,55 d	3,75 a	2,29 bc	1,29 cd	2,65 b	2,70 b	1,56 bcd
Número de raízes	2,25 ab	0,00 c	1,65 abc	2,97 a	1,83 abc	0,00 c	0,70 bc	1,40 abc
Comprimento da maior raiz (cm)	3,89 a	0,00 b	2,72 ab	1,92 ab	1,51 ab	0,00 b	0,95 b	1,97 ab

^{1/} médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

O comprimento das brotações foi mais influenciado pela adição de sacarose na dosagem de 15 g L⁻¹, do que as outras combinações, apresentando média de 3,75 centímetros de comprimento na maior brotação de cada explante. Faria et al. (2006), observaram que os meios de cultura suplementados com 15 e 30 g.L⁻¹ de sacarose, combinados com 10 e 20 g.L⁻¹ de sorbitol, proporcionaram maiores comprimentos das brotações, sendo a maior média encontrada na combinação de 15 g.L⁻¹ de sacarose com 10 g.L⁻¹ de sorbitol (4,19). Segundo os mesmos autores, estes dados indicam que a presença da sacarose no meio de cultivo foi fundamental para manter o desenvolvimento das plantas.

Entretanto, Nicoloso et al. (2003), verificaram que a altura média das brotações foi maior quando a sacarose foi a fonte de carbono utilizada, nas doses de 30, 45 e 60 g.L⁻¹. Diferentemente do ocorrido no presente trabalho onde, ainda que com menor quantidade do que o usualmente empregado em cultura de tecidos vegetais (30 g L⁻¹), a adição de 15 g L⁻¹ tanto de sacarose quanto de glicose se mostrou efetiva para na propagação de plantas de maracujazeiro-amarelo in vitro.

Com relação às variáveis, número médio de raízes e comprimento médio da maior raiz, os carboidratos apresentaram comportamento semelhante. As dosagens de 15+15, 15, 30 e 45, e 45 g L⁻¹, de sacarose+ glicose, sacarose e glicose respectivamente foram efetivas na produção e crescimento das raízes em maracujazeiros-amarelos cultivados in vitro. Corroborando com os dados obtidos, Faria e Segura (1997), obtiveram altas taxas de enraizamento para a espécie *P. edulis* em meio MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose. Em outro trabalho, Faria et al. (2006), constataram que em meio de cultivo acrescido com sacarose ocorre favorecimento no desenvolvimento radicular de plantas de *P. giberti*. Entretanto Santana (2003), estudando os fatores que afetam o enraizamento in vitro em brotações e estacas de *Annona glabra* L., obteve os maiores percentuais de enraizamento em meio de cultura suplementado com 20 g L⁻¹ de sacarose.

De acordo com Cid et al. (2014), o emprego de glicose em meios de cultivo raramente é realizado, mas devido à sacarose ser parcialmente hidrolisada em glicose e frutose

durante a autoclavagem, seu uso pode ser interessante para a propagação in vitro de *P. edulis*.

Conclusões

As fontes de carboidratos sacarose e glicose na concentração de 15 g L⁻¹ apresentaram maiores médias para números de folhas no cultivo in vitro de maracujazeiro-amarelo.

O número médio de brotações de *P. edulis* foi favorecido pela adição de 15 g L⁻¹ de glicose. Enquanto que o comprimento das brotações foi maior quanto o carboidrato sacarose (15 g L⁻¹) é utilizado como fonte de carbono.

No enraizamento de explantes de *P. edulis* cultivados em meio MS, as dosagens de 0, 15 e 30 g L⁻¹ de glicose não foram efetivas.

Referências Bibliográficas

AIRES, P.S.R.; CARVALHO, J.M.F.C.; PIMENTEL, N.W.; SILVA, H. Efeito da concentração de vitaminas e das fontes de carbono no superbrotamento da mamona utilizando o genótipo BRS Nordestina. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, n. 2, 2007.

BARNETT, V.; LEWIS, T. Outliers in Statistical Data, 3rd Edition, John Wiley & Sons, New York, 1994.

BERNACCI, L.C.; SOARES-SCOTT, M.D.; JUNQUEIRA, N.T.V.; PASSOS, I.R.S.; MELETTI, L.M.M. *Passiflora edulis* Sims: the correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of others colors). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.2, p.566-576, 2008.

CID, L. P. B., ed. Técnico. **Cultivo *in vitro* de plantas**. 3 ed. Brasília, DF, Embrapa, 2014, 325p.

FARIA, G.A.; COSTA, M.A.P. de C.; JUNGHANS, T.G.; LEDO, C.A. da S.; SOUZA, A. da S. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 267-270, 2006.

FARIA, J.L.C.; SEGURA, J. In vitro control of adventitious bud differentiation by inorganic medium components and silver thiosulfate in explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **In vitro cellular & developmental biology-plant**, Columbia, p. 209-212, 1997.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, p.183-260, 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 5 ago, 2016.

LIMA, A. de A.; CARDOSO, C.E.L.; SOUZA, J. da S.; PIRES, M de M. **Comercialização do maracujazeiro**. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 2013. (Boletim, 29). Disponível em: <http://www.cnpq.embrapa.br/publicacoes/produto_em_foco/maracuja_29.pdf>. Acesso em 20 jul. 2016.

MELETTI, L.M.M.; OLIVEIRA, J C. de; RUGGIERO, C. **Maracujá**. Série Frutas Nativas. Jaboticabal: Funep, 2010, 55p.

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

NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C.F. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.1, p.84-90, jan./fev., 2003.

OLIVEIRA, J.C. Melhoramento. In: RUGGIERO, C. (ed.) **Maracujá**. Legis Summa, Ribeirão Preto, São Paulo, p. 218-246, 1987.

OZAROWSKI, M.; THIEMA, B. Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: a mini-review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 23, p. 937-947. 2013.

PEREA, M.; TIRADO, A. **Cultivo de tejidos in vitro. Manual de prácticas de laboratorio.** Facultad de Ciencias Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 2011.

ROUSSEEUW, P.J.; LEROY, A.M. **Robust Regression and Outlier Detection.** Ed. John Wiley & Sons, New York, 1987.

SANTANA, J.R.F. de. Controle da morfogênese in vitro em algumas espécies de annonaceae. 2003. 237f. **Tese (Doutorado)** Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SANTOS, C.E.; KIST, B.B.; CARVALHO, C.; REETZ, E.R.; DRUM, M. **Anuário brasileiro da fruticultura 2014.** Gazeta de Santa Cruz, Santa Cruz do Sul, 2013. 136p.

VANDERPLANK, J. **Passion flowers.** Cambridge Press, 1996, 224p.