



EFICIÊNCIA DA PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE GEMAS AXILARES EM DISTINTOS GENÓTIPOS DE *Passiflora edulis* Sims.

EFFICIENCY OF *IN VITRO* PROPAGATION OF AXILLARY BUDS IN DISTINCT GENOTYPES OF *Passiflora edulis* Sims.

Elias da Cruz Ribeiro¹; Inaê Mariê de Araújo Silva-Cardoso²; Jonny Everson Scherwinski-Pereira³

¹ Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Av. General Rodrigo Octávio, 6200, Coroado, Manaus – Amazonas, CEP: 69080-900. Brasil. elias.cruz9628@gmail.com. ² Pós-doutoranda CNPq/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, PqEB, Av. W5 Norte, Brasília - Distrito Federal, CEP: 70770-917. Brasil. inaemarie@hotmail.com. ³ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, PqEB, Av. W5 Norte, Brasília - Distrito Federal, CEP: 70770-917. Brasil. jonny.pereira@embrapa.br.

INTRODUÇÃO

O cultivo do maracujazeiro é bastante difundido nas regiões tropicais, podendo ser propagado por sementes, estaquia ou enxertia. A preferência da técnica depende da região e a pouca longevidade do cultivo é um problema para os produtores (FILHO et al., 2005). No Brasil, ocorre cerca de 150 espécies distribuídas em quatro gêneros, sendo *Passiflora edulis* Sims e *Passiflora alata* as mais cultivadas nacionalmente e mundialmente (BERNACCI, 2003).

No entanto, o produtor pode enfrentar alguns obstáculos no cultivo desta fruteira. A cultura é suscetível a algumas pragas que podem afetar a produtividade do pomar. As doenças mais comuns encontradas no maracujazeiro são a antracnose (manchas marrom-escuro), verrugose (verrugas no fruto causadas por fungo) e fusariose (murcha e escurecimento do caule causado por fungo) (MOURA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013). Além destas doenças, insetos também podem causar danos mecânicos e servir de vetor para os microorganismos, como os percevejos, lagarta do maracujazeiro, ácaros, cochonilhas, cigarrinha verde, mosca branca, dentre outros (GONTIJO, 2017).

A propagação de plantas *in vitro* é uma alternativa para a produção de material sadio. A técnica pode ser aplicada na propagação de diferentes espécies de maracujazeiro e apresenta, como principais vantagens, a garantia da produção de material uniforme, selecionado e em larga escala, possibilitando avanços no melhoramento genético e na produção de mudas, o que seria mais demorado por meio de técnicas tradicionais de propagação vegetativa (PRAMMANEE et al., 2011; SOARES et al., 2012). Faria e Segura (1997) obtiveram sucesso na propagação de *P. edulis* por meio da inoculação de gemas axilares provenientes de partes apicais da planta, previamente estabelecidas *in vitro*.

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência da propagação *in vitro* de cinco genótipos de *Passiflora edulis* por meio de gemas axilares de plantas adultas.

MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II (LCT-II) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizado em Brasília, DF. As gemas utilizadas foram derivadas de estacas oriundas de cinco genótipos previamente estabelecidos *in vitro*: CPMSC1, CPGA1, MR1, CPMGA2 e CPF1SSBR. Estes genótipos são as matrizes genitoras de híbridos interespecíficos



produzidos pela Embrapa. O material foi proveniente de plantas matrizes mantidas em casa de vegetação na Embrapa Produtos e Mercado, situada em Riacho Fundo II, Brasília, DF.

Em laboratório, as gemas axilares de microestacas estabelecidas *in vitro* foram excisadas e inoculadas imediatamente em meio de cultura contendo sais de MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose e 4,45 µM de 6-Benzilaminopurina (BAP). Para a solidificação do meio de cultura foram adicionados 2,5 g L⁻¹ de *Phytigel*® (SIGMA). Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo 10 mL de meio de cultura.

Os explantes foram mantidos à 25±2°C, 16 horas de fotoperíodo e irradiação de 100 µmol.m⁻².s⁻¹, fornecida por lâmpadas LED luz do dia (Phillips). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial duplo composto por 15 tratamentos (5 genótipos e 3 subcultivos), cada um com 14 repetições iniciais, sendo um explante por unidade experimental (tubo).

Ao todo foram realizados três subcultivos, um a cada 30 dias, além de uma avaliação ao final de cada subcultivo. Os explantes foram avaliados quanto ao número de gemas por explante, formação de calo e contaminação. Adicionalmente, foram contabilizados o número de gemas, as quais foram classificadas visualmente quanto ao seu desenvolvimento, conforme a seguir: 0 – com apenas uma gema; 1 – diversos primórdios foliares; 2 – diversas folhas formadas; 3 – pelo menos uma folha alongada e 4 – pelo menos uma folha alongada e aberta. Seguindo metodologia realizada por Oliveira, Costa e Scherwinski-Pereira (2008), a estimativa do número de plantas produzidas por explante foi obtida a partir da razão entre o número de subcultivos (ns) realizados: média do número de mudas produzidas por explante (TM^{ns}), representada pela taxa de multiplicação estimada (Tme). Os dados foram transformados por $(x+1)^{0,5}$ e submetidos à análise de variância e, quando significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade utilizando o software estatístico Sisvar.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos resultados demonstrou diferenças estatísticas entre os genótipos na avaliação do número de gemas por explante. Quanto aos subcultivos considerando cada genótipo, verificou-se incremento da taxa de multiplicação, com exceção do genótipo CPF1SSBR (Tabela 1). Segundo Faria et al. (2007), a variação de resposta entre genótipos trata-se de um dos principais fatores que afetam o estabelecimento de protocolos *in vitro* para espécies de *Passiflora*. Apesar do estabelecimento *in vitro* de *P. edulis* ser relativamente bem documentado, ajustes podem ser observados em diferentes trabalhos de propagação e estabelecimento *in vitro*, podendo dificultar a escolha da melhor forma de multiplicação.

Ao final do último subcultivo (90 dias) foram obtidas médias entre 1,4 e 6,3 gemas/explante, sendo os maiores valores observados nos genótipos CPGA1, MR1 e CPGMA2, sem diferenças estatísticas entre as médias. O genótipo CPF1SSBR apresentou a menor média (1,4 gemas/explante) (Tabela 1), mesmo valor encontrado por Soares et al. (2012) após realizar 6 subcultivos de *P. foetida*. em meio de MS acrescido de 4,45 µM de BAP. Faria e Segura (1997) obtiveram valor médio de 3,7

gemas/explante na micropropagação de *P. edulis* em meio de MS contendo 5 μM de BAP e 2 μM de AIA (ácido indol-3-acético), resultado próximo ao obtido para o genótipo CPMSC neste experimento (Tabela 1).

TABELA 1 – Taxa de multiplicação (gemas/explante) de cinco genótipos de *Passiflora edulis* Sims após três subcultivos mensais em meio com 6-Benzilaminopurina.

Subcultivos	Genótipos				
	CPMSC1	CPGA1	MR1	CPMGA2	CPF1SSBR
1	2,1 \pm 0,2 cA	2,6 \pm 0,2 bA	2,7 \pm 0,3 bA	2,8 \pm 0,2 bA	1,2 \pm 0,1 aA
2	3,5 \pm 0,3 bC	6,1 \pm 0,5 aB	8,2 \pm 0,5 aA	5,6 \pm 0,5 aB	1,0 \pm 0,07 aD
3	5,7 \pm 0,4 aA	6,7 \pm 0,4aA	7,4 \pm 0,4 aA	6,7 \pm 0,4aA	2,0 \pm 0,6aB
Média	4,1 \pm 0,3 B	5,4 \pm 0,3 A	6,3 \pm 0,3 A	5,5 \pm 0,3 A	1,4 \pm 0,3 C
Tme	68	157	250	166	2,7

Médias \pm erro padrão seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Tme = Taxa de multiplicação estimada.

A maior taxa de multiplicação estimada foi observada no genótipo MR1, indicando que em três subcultivos pode-se obter 250 gemas. Pode-se considerar a hipótese que cada uma destas gemas tem potencial para dar origem a uma planta. No trabalho de Kawata et al. (1995) foram realizados subcultivos de gemas de *P. edulis* a cada três semanas em um período total de mais de 3 anos, indicando a possibilidade do uso da técnica para multiplicação em larga escala. Ainda neste experimento, a concentração de 10 μM de BAP foi considerada a mais eficiente para multiplicação. Para a formação de brotos, as concentrações de 0,1 e 1 μM foram utilizadas, produzindo respostas morfológicas semelhantes as obtidas neste experimento (Figura 1c).

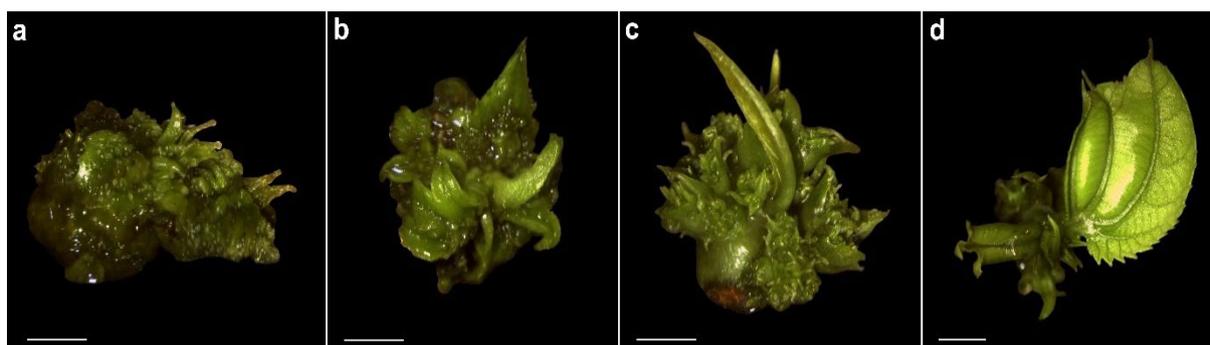


FIGURA 1 – Diferentes padrões morfológicos de desenvolvimento de gemas/brotos observados na micropropagação de *Passiflora edulis* Sims. a) Tipo 1; b) Tipo 2; c) Tipo 3; d) Tipo 4. Barras = 2 mm.

Segundo Vieira et al. (2014), o tipo de explante e regulador de crescimento ideais para proliferação de brotos em *Passiflora* variam de acordo com a espécie, sendo segmentos hipocotiledonares e BAP, respectivamente, os mais indicados para proliferação de gemas em *P. setacea*.



No presente estudo as gemas obtidas após três subcultivos foram classificadas quanto ao nível de desenvolvimento do explante (Figura 1). Verificou-se que os genótipos CPGA1, MR1 e CPMGA2 apresentaram maior porcentagem de explantes mais desenvolvidos, ou seja, com pelo menos uma folha alongada e aberta – tipo 4 (Tabela 2). Na avaliação referente à formação de calo e contaminação, observou-se menos de 6% de formação de calo nos genótipos CPMSC1, MR1 e CPMGA2, 10% no genótipo CPGA1 e 60% no genótipo CPF1SSBR. De modo geral, o experimento apresentou menos de 2% de contaminação dos explantes.

TABELA 2 – Porcentagem de gemas observadas em diferentes genótipos de *Passiflora edulis* Sims ao final de três subcultivos.

Classificação dos tipos de explantes	Porcentagem de ocorrência dos tipos de explantes formados em cada genótipo durante a multiplicação				
	CPMSC1	CPGA1	MR1	CPMGA2	CPF1SSBR
0	18%	14%	8%	11%	0
1	47%	39%	62%	48%	60%
2	18%	32%	22%	26%	20%
3	12%	3%	1%	9%	20%
4	5%	12%	7%	6%	0

Classificação dos explantes: 0 – Com apenas uma gema; 1 – Diversos primórdios foliares; 2 – Diversas folhas formadas; 3 – Pelo menos uma folha alongada; 4 – Pelo menos uma folha alongada e aberta.

Observou-se que a presença de calo no explante interferiu na proliferação de gemas, havendo organogênese apenas quando não houve calo no explante. Vieira et al. (2014) observaram organogênese direta e indireta na proliferação de gemas de *P. setacea* nos explantes utilizados, concluindo que o tipo de explante e regulador de crescimento ideal para proliferação de brotos em *Passiflora* varia de acordo com a espécie. Segundo Faria et al. (2007), a organogênese direta (sem formação de calo) é a rota ideal para conservação e micropropagação de material vegetal, evitando a ocorrência de variantes somaclonais. Logo, a baixa taxa de formação de calo observada nos genótipos, com exceção do genótipo CPF1SSBR, torna o material ideal para conservação e multiplicação clonal.

CONCLUSÕES

A utilização de gemas como explante para micropropagar o maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims) foi eficiente para quatro dos genótipos estudados (CPMSC1, CPGA1, MR1, CPMGA2), sendo necessários ajustes posteriores no protocolo para o genótipo CPF1SSBR.



REFERÊNCIAS

- BERNACCI, L. C. *Passifloraceae*. Em: WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G. J.; MELHEM, T. S.; GIULIETT, A. M.; KIRIZAWA, M (Eds). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: RiMa, 2003. v. 3. p. 247–274.
- 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.
- FARIA, J. L. C.; SEGURA, J. Micropropagation of Yellow Passionfruit by Axillary Bud Proliferation. **HortScience**, Alexandria, v. 32, n. 7, p. 1276–1277, dez. 1997.
- FILHO, G. C. N.; RONCATTO, G.; RUGGIERO, C.; OLIVEIRA, J. C.; MALHEIROS, E. B. Propagacao vegetativa do maracujazeiro-conquista de novas adesões. Em: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.). **Maracujá: Germoplasma e melhoramento genético**. 1. ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 341–358.
- GONTIJO, G. M. **Cultivo do Maracujá**. Governo do Distrito Federal. Brasília: Emater, 2017. p. 8-33.
- KAWATA, K.; USHIDA, C.; KAWAI, F.; KANAMORI, M.; KURIYAMA, A. Micropropagation of Passion fruit from Subcultured Multiple Shoot Primordia. **Journal of Plant Physiology**, Estugarda, v. 147, n. 2, p. 281–284, 1995.
- MOURA, G.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; ALVES, A. P. F.; FRANZENER, G.; STANGARLIN, J.R.. Controle da antracnose em maracujá-amarelo por derivados de capim-limão (*Cymbopogon citratus*). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 79, n. 3, p. 371–379, set. 2012.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, Reino unido, v. 15, n. 3, p. 473–497, jul. 1962.
- OLIVEIRA, E. J.; SOARES, T. L.; BARBOSA, C. J.; SANTOS-FILHO, H. P.; JESUS, H. M. Severidade de doenças em maracujazeiro para identificação de fontes de resistência em condições de campo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 485–492, jun. 2013.
- OLIVEIRA, J.; COSTA, F.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. Micropropagación y estimativa de producción de mudas de bananos para la Amazonia Occidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 10, p. 1429–1432, 2008.
- PRAMMANEE, S.; THUMJAMRAS, S.; CHIEMSOMBAT, P.; PIPATTANAWONG, N. Efficient shoot regeneration from direct apical meristem tissue to produce virus-free purple passion fruit plants. **Crop Protection**, Reino Unido, v. 30, n. 11, p. 1425–1429, nov. 2011.
- SOARES, W. S.; RÊGO, M. M.; RÊGO, E. R.; BARROSO P. A.; NASCIMENTO, K. S.; FERREIRA, K. T. Estabelecimento in vitro e micropropagacao de maracujá silvestre (*Passiflora foetida* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. spe, p. 138–142, 2012.
- VIEIRA, L. M.; ROCHA, D. I.; TAQUETTI, M. F.; SILVA, L. C.; CAMPOS, J. M. S.; VICCINI, L. F.; OTONI, W. C. In vitro plant regeneration of *Passiflora setacea* D.C. (*Passifloraceae*): the influence of explant type, growth regulators, and incubation conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Nova Iork, v. 50, n. 6, p. 738–745, 6 dez. 2014.