

CIRCULAR TÉCNICA

n. 337 - março 2021

ISSN 0103-4413

Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
Departamento de Informação Tecnológica
Av. José Cândido da Silveira, 1647 - União - 31170-495
Belo Horizonte - MG - www.epamig.br - Tel. (31) 3489-5000



AGRICULTURA,
PECUÁRIA E
ABASTECIMENTO



MINAS
GERAIS

GOVERNO
DIFERENTE.
ESTADO
EFICIENTE.

Multiplicação in vitro de pitáia vermelha por meio de biorreatores de imersão temporária (BIT's)¹

Luciana Cardoso Nogueira Londe²
Jéssica Guerra Calaes³
Selma Silva Rocha⁴

INTRODUÇÃO

O consumo de frutas exóticas tem apresentado um amplo aumento nos últimos anos, manifestando interesse em escala comercial, tanto para produtores, quanto para consumidores internos e externos (LOPES *et al.*, 2016). Dentre as frutas exóticas com grande potencial de comercialização, encontra-se a pitáia vermelha (*Hylocereus costaricensis*) (Fig.1), fruta rústica pertencente à família Cactaceae (CORDEIRO *et al.*, 2015). Sua aparência exótica, sabor doce e suave, polpa firme e suas características nutricionais e funcionais tornam seu cultivo promissor (MARQUES *et al.*, 2011). O alto valor pago pelo quilo da fruta também constitui grande atrativo para o plantio dessa frutífera (LOPES *et al.*, 2016).

Esta Circular Técnica visa abordar a multiplicação in vitro de pitáia vermelha usando a tecnologia dos biorreatores de imersão temporária (BIT's).

PROPAGAÇÃO DA PITAIA

A propagação de pitáia é comumente realizada por meio de sementes ou estaquia. No entanto, a propagação via sementes é desaconselhável devido à juvenilidade, e a propagação vegetativa por estacas pode propagar doenças. Assim, a cultura de te-

Figura 1 - Pitáia vermelha (*Hylocereus costaricensis*) utilizada para a micropropagação em biorreatores de imersão temporária (BIT's)



Fonte: Jardim Exótico Mudas (2021).

cidos pode auxiliar na propagação de mudas de melhor qualidade, uma vez que esta técnica possibilita obtenção de plantas saudáveis e produção de mudas em larga escala a partir de pequena quantidade de material propagativo (MENEZES *et al.*, 2012).

Na propagação de frutíferas, os fitorreguladores mais utilizados são as auxinas, giberelinas e citocininas. As auxinas são utilizadas para promover a diferenciação e o crescimento de raízes adventícias,

¹Circular Técnica produzida pela EPAMIG Norte-CEGR, (38) 3834-1760, cegr@epamig.br.

²Bióloga, D.Sc., Pesq. EPAMIG Norte-CEGR, Nova Porteirinha, MG, luciana@epamig.br.

³Eng. Agrônoma, Doutoranda Produção Vegetal UNIMONTES - Campus Janaúba, Janaúba, MG, jessica_guerra_calaes@hotmail.com.

⁴Eng. Agrônoma, M.Sc., UNIMONTES - Campus Janaúba, Janaúba, MG, selmauniagro@gmail.com.

as giberelinas para a quebra de dormência de sementes e as citocininas para aumentarem a proliferação de brotações (HARTMANN *et al.* 1997).

Dessa forma, objetivou-se com este experimento avaliar diferentes combinações de citocininas no cultivo *in vitro* da pitiaia vermelha em BIT's, visando a produção de mudas de qualidade.

CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Campo Experimental do Grotuba (CEGR) da EPAMIG Norte, em Nova Porteirinha, MG. As sementes de pitiaia vermelha (*H. costaricensis*) foram coletadas de frutos maduros, separadas da polpa e submetidas aos seguintes procedimentos:

- desinfestação, que se constituiu da imersão em álcool 70% por 1 minuto e em hipoclorito de sódio 1% por 20 minutos, finalizando com tríplice lavagem em água destilada estéril;
- transferência das sementes, após a desinfestação, para frascos contendo meio de cultura semissólido, sais e vitaminas no meio Murashige & Skoog (MS) (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (Fig. 2A e 2B), com adição de 30 g/L de sacarose e solidificado com 6,0 g/L de ágar;
- ajuste do potencial hidrogeniônico (pH) do meio para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C e 1,0 atm de pressão por 20 minutos.

Explantos

Como fonte de explantes, utilizaram-se segmentos de cladódios de 1,0 cm provenientes da germinação *in vitro* das sementes (Fig. 3).

Os explantes foram acondicionados em BIT's contendo meio de cultura com líquido, acrescido 200 mg/L de ácido ascórbico e 0,25 ml de Plant Preservative Mixture Sigma (PPM).

O tempo de imersão dos explantes foi ajustado para 3 minutos a cada 4 horas com os devidos tratamentos.

Os tratamentos consistiram em diferentes combinações de fitohormônios em meio MS basal contendo:

- 4 mg/L de zeatina;
- 4 mg/L de zeatina + 1 mg/L de cinetina;

Figura 2 - Sementes de pitiaia vermelha (*Hylocereus costaricensis*)



Nota: A - Sementes que passaram pelo processo de desinfestação; B - Sementes germinadas *in vitro*.

Fotos: Selma Silva Rocha

Figura 3 - Cladódios de pitiaia vermelha (*Hylocereus costaricensis*) utilizados na micropropagação da espécie e acondicionados em biorreatores de imersão temporária (BIT's)



Selma Silva Rocha

- c) 4mg/L de zeatina + 1mg/L de AIB;
- d) 4 mg/L de zeatina + 1 mg/L de cinetina + 1 mg/L de ácido indolbutírico (AIB), acrescido de 30 g/L de sacarose, com pH do meio ajustado para $\pm 5,7$.

Após a introdução, os explantes foram transferidos para sala de crescimento, submetidos a fotoperíodo de 16 horas, obtido a partir de lâmpadas LED branca (40 $\mu\text{mol m}^2/\text{s}$) e temperatura média de 25 °C durante 30 dias. Finalizado este período, foram avaliados:

- a) comprimento da parte aérea;
- b) diâmetro;
- c) número de brotos e raízes;
- d) massa fresca e massa seca.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, totalizando cinco tratamentos com uma repetição, sendo que cada repetição continha 20 explantes por biorreator.

Análise estatística

Após análise das variâncias para as amostras e o não atendimento das suposições sobre distribuição normal e homogeneidade, obtidas pelo teste de Shapiro-Wilk e pelo teste de Bartlett, ambos a 5% de probabilidade de erro, os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal Wallis ($p < 0,05$) e as médias comparadas pelo teste de Bonferroni ($p < 0,05$), por meio do software estatístico R versão 3.5.2, com auxílio do pacote Agricolae.

AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) para as variáveis: comprimento da parte aérea, número de brotos, massa fresca e massa seca (Tabela 1).

Comprimento da parte aérea

Para o comprimento da parte aérea, a dose 4 mg/L zeatina + 1 mg/L AIB apresentou resultados inferiores em relação aos demais tratamentos. Esse fato pode estar relacionado com o desbalanço entre citocinina e auxina. Dependendo da concentração e do tempo de exposição, a auxina inibe ou estimula o crescimento e a diferenciação dos tecidos, existindo um nível ótimo para essas respostas fisiológicas (BOTELHO *et al.*, 2005). Segundo Taiz e Zeiger (2013), a inibição, além da concentração ótima, é em geral atribuída à biossíntese de etileno induzida por auxina.

Número de brotos

Ao contrário do que foi observado neste experimento, Züge (2019) trabalhando com zeatina, verificou efeito negativo ao comparar com a testemunha para variáveis comprimento de brotação e taxa de multiplicação. Já utilizando 6-benzilaminopurina (BAP), apresentou efeito positivo, pois estimulou a emissão de brotação nos explantes e a taxa de multiplicação.

O maior número de brotos foi obtido com 4 mg/L de zeatina sem combinação com outro fitorregulador. As citocininas, em conjunto com outros hormônios

Tabela 1 - Desenvolvimento da pitiaia vermelha (*Hylocereus Costaricensis*) cultivada em diferentes combinações de fitorreguladores

Doses de fitorreguladores	Comprimento parte aérea (cm)	Brotações (n ^o)	Massa fresca (g)	Massa seca (g)
Meio MS basal	1,81 a	0,40 ab	0,07 b	0,022 ab
4 mg/L zeatina	1,91 a	0,80 a	0,12 a	0,05 a
4 mg/L zeatina + 1 mg/L cinetina	1,80 a	0,86 ab	0,13 a	0,05 a
4 mg/L zeatina + 1 mg/L AIB	1,37 b	0,06 b	0,02 c	0,01 b
4 mg/L zeatina + 1 mg/L cinetina + 1 mg/L AIB	1,92 a	0,26 b	0,08 ab	0,027 ab
t-value	2,89	2,89	2,89	2,89
Teste F	0,0001	0,004	5,4x10 ⁻⁸	0,021

Fonte: Elaboração das autoras.

Nota: Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente quanto ao teste de Kruskal-Wallis pelo método de Bonferroni.

t-value - valor do teste.

vegetais, são responsáveis por estimular a divisão (mitose) e a diferenciação celular.

Morfogênese in vitro

A partir desses processos citocínicos, essas células podem ser transformadas em órgãos do vegetal (morfogênese) (CRUVINEL; VASCONCELLOS; MARTELLETO, 2019). Diversos estudos utilizando a citocinina BAP, no cultivo in vitro de pitáia, também induziram maior número de brotações adventícias (MENEZES *et al.*, 2012; FAN *et al.*, 2013).

Em trabalho com a pitáia, Hua *et al.* (2015) observaram que o regulador de crescimento BAP sozinho é capaz de induzir múltiplos brotos. No entanto, o melhor resultado foi obtido com a combinação de cinetinas (zeatina e BAP) para a multiplicação da parte aérea.

Massa fresca e massa seca

Para as variáveis massa fresca e massa seca, as doses 4 mg/L zeatina e 4 mg/L zeatina + 1 mg/L cinetina foram as que proporcionaram maiores valores.

Os ápices vegetativos são responsáveis por controlar a distribuição de citocininas, que por sua vez redirecionam o fluxo de assimilados (MURAI, 2014). Dessa forma, essa variação pode explicar o aumento da massa fresca no experimento.

O aumento observado na matéria fresca também foi observado por Menezes *et al.* (2012), utilizando ácido naftalenoacético (ANA), BAP ou cinetina no meio MS nas concentrações de 0,1 mg/L de ANA e 1 ou 5 mg/L de BAP ou cinetina em relação ao controle meio MS.

Um dos fatores para o sucesso do cultivo in vitro é a escolha dos fitorreguladores e suas adequadas concentrações a serem utilizadas no meio de cultura. O balanço hormonal entre auxinas, citocininas e giberelinas faz-se necessário, sendo variável de acordo com cada espécie. Apesar deste experimento utilizar apenas citocininas no meio de cultura, observa-se que a zeatina isolada de outra citocinina é eficiente para o processo de indução de parte aérea no cultivo de pitáia em BIT's.

Este é o primeiro experimento com a cultura, no qual se utiliza o processo de BIT's para a multiplicação massal de mudas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os biorreatores apresentam-se como alternativa promissora à propagação de pitáia in vitro. A utilização da zeatina, isolada de outra citocinina, foi eficiente para a indução de brotos. Apesar de 4 mg/L zeatina + 1 mg/L cinetina também promoverem o desenvolvimento da parte aérea, brotações e massa seca e fresca, o uso de apenas uma citocinina é mais viável economicamente para o processo de produção de mudas in vitro. O aumento de brotação deverá promover aumento estomático e, conseqüentemente, melhor adaptação ao processo de aclimação das plantas. Ainda é necessário adequar um protocolo eficiente para a produção de raízes in vitro com a utilização de uma auxina eficiente para este processo.

REFERÊNCIAS

- BOTELHO, R.V. *et al.* Efeitos de reguladores vegetais na propagação vegetativa do porta-enxerto de videira "43-43" (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*). **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n.1, p.6-8, abr. 2005.
- CORDEIRO, M.H.M. *et al.* Caracterização física, química e nutricional da pitáia-rosa de polpa vermelha. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.37, n.1, p.20-26, mar. 2015.
- CRUVINEL, F.F.; VASCONCELLOS, M.A. da S.; MARTELLETO, L.A.P. Efeitos da citocinina benzilaminopurina na estaquia da pitáia. **Nativa**, Sinop, v.7, n.1, p.43-49, jan./fev. 2019.
- FAN, Q.J. *et al.* Efficient regeneration of dragon fruit (*Hylocereus undatus*) and an assessment of the genetic fidelity of in vitro: derived plants using ISSR markers. **Journal Horticulture Science Biotechnology**, London, v.88, n.5, p.631-637, Nov. 2013.
- HARTMANN, H.T. *et al.* **Plant propagation: principles and practices**. 6.ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997. p.276-501.
- HUA, Q. *et al.* A protocol for rapid in vitro propagation of genetically diverse pitáia. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.120, n.2, p.741-745, 2015.
- JARDIM EXÓTICO MUDAS. **Pitaya Costa Rica de polpa roxa**. Carapicuíba, SP, 2021. Disponível em: <https://www.jardimexotico.com.br/pitaya-costa-rica-de-polpa-vermelha>. Acesso em: 11 mar. 2021.
- LOPES, C.A. *et al.* Indução de calos, potencial embriogênico e estabilidade genética em pitáia vermelha. **Agrária: Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.11, n.1, p.21-25, 2016.

- MARQUES, V.B. *et al.* Fenologia reprodutiva de pitaiá vermelha no município de Lavras, MG. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.6, p.984-987, jun. 2011.
- MENEZES, T.P. de *et al.* Micropropagação e endoreduplicação em pitaiá vermelha, *Hylocereus undatus* HAW. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.28, n.6, p.868-876, nov./dez. 2012.
- MURAI, N. Review: plant growth hormone cytokinins control the crop seed yield. **American Journal of Plant Sciences**, v.5, p.2178-2187, 2014.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.
- ZÜGE, P. G. U. **Produção de mudas de pitaya através da micropropagação**. 2019. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019. Disponível em: <http://guaiaca.ufpel.edu.br:8080/handle/prefix/4378>. Acesso em: 11 mar. 2021.