

Indução *in vitro* de Calos em Duas Espécies de Maracujazeiro Nativo

Milene Alves de Figueiredo¹, Renato Paiva²; Ana Cristina de Souza³; Jorge Marcelo Padovani Porto⁴; Gabriela Ferreira Nogueira⁵; Fernanda Pereira Soares¹

Introdução

A cultura do maracujazeiro no Brasil possui uma posição de destaque, pois atualmente o país é o maior produtor mundial de maracujá [4]. O aumento da demanda do mercado internacional e interno de sucos e da fruta *in natura* fez com que houvesse expansão da área plantada, entretanto, houve o surgimento e agravamento de um grande número de doenças. Algumas espécies não cultivadas, como *Passiflora gibertii* e *Passiflora edulis edulis*, têm acenado com contribuições importantes ao melhoramento genético por apresentarem resistência a doenças [5,10,1] e pragas, maior longevidade, maior adaptação a condições climáticas adversas, período de florescimento ampliado, maior concentração de componentes químicos interessantes para a indústria farmacêutica e outras potencialidades, quase todas, ainda inexploradas.

A cultura de tecidos em *Passiflora* spp. pode contribuir para obtenção de plantas com características agrônomicas desejáveis, utilizando-se as técnicas de micropropagação, hibridação somática ou transformação genética, associadas a programas de melhoramento genético. A indução de organogênese ou embriogênese somática na presença ou ausência de uma fase intermediária de calo é utilizada com a finalidade de regenerar plântulas a partir da(s) célula(s) transformada(s), após a introdução de genes de interesse em uma determinada espécie. Um protocolo de regeneração de plantas *in vitro* é, portanto, imprescindível para trabalhos de transformação genética [7].

A organogênese em *Passiflora cincinnata* Mast ocorre direta e indiretamente dependendo do explante e/ou tempo de cultivo *in vitro*. É um processo assíncrono e o regulador vegetal 6-BA favorece o processo sendo imprescindível a sua adição para a resposta organogênica do disco foliar [6]. Ribas [11] estudando as técnicas de propagação *in vitro* de diferentes acessos do maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) estabeleceu concentração de 8,88 µM de BAP para regeneração de gemas adventícias (a partir de explantes foliares de material adulto) que por sua vez eram pequenas, não alongaram e tornaram-se cloróticas.

Segundo Torres et al. [12], os aditivos orgânicos complexos podem ser adicionados ao meio visando melhor resposta no padrão de crescimento. Segundo Hall et al. [3], para muitas espécies, incluindo *Passiflora*, a água de coco contém substâncias de crescimento essenciais para uma maior regeneração.

Já existem muitos estudos publicados sobre a regeneração *in vitro* de diversas espécies de *Passiflora*, mas o assunto está longe de ser esgotado. Diversos fatores contribuem para isso e um dos principais é a variação da resposta entre genótipos que tem sido extensivamente descrita na literatura. As variações são mais evidentes quando são feitos experimentos com espécies pouco domesticadas de maracujá, em que a variabilidade genética existente é muito grande. As respostas diferentes se acentuam por conta dos vários explantes utilizados, das diferentes espécies estudadas, entre outros.

Objetivou-se, com este trabalho, estabelecer um protocolo para a indução de calos organogênicos de diferentes espécies de *Passiflora* spp que apresentem interesse em programas de melhoramento.

Material e métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, do Departamento de Biologia – Universidade Federal de Lavras. Como explantes foram utilizados segmentos foliares ($\pm 1\text{cm}^2$) e nodais ($\pm 1\text{cm}$) de plântulas oriundas de germinação *in vitro* de sementes de dois acessos de *Passiflora* nativos do cerrado do Distrito Federal: *Passiflora gibertii*, acesso CPAC MJ-22-01 e *Passiflora edulis edulis* (nativo), acesso CPAC MJ-22-01. Utilizou-se meio de cultura MS [9], com metade da concentração dos sais, acrescido de água de coco (5%) e sacarose (3%). O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ e o meio solidificado com ágar (0,5%).

No primeiro experimento, foram testadas diferentes concentrações de BAP (0; 2,22; 4,44; 6,66 e 8,88 µM) utilizando segmentos foliares de diferentes espécies de *Passiflora* spp.

Em um segundo experimento, foram utilizados diferentes segmentos (foliar e nodal) em meio de cultura acrescido de 4,44 µM de BAP em diferentes espécies de

1. Aluna de Pós-graduação do Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras. Caixa Postal 37, Lavras, MG, CEP 37200-000. E-mail: migueiredo@yahoo.com.br

2. Professor Adjunto do Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras. Caixa Postal 37, Lavras, MG, CEP 37200-000.

3. Auxiliar de laboratório do Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras. Caixa Postal 37, Lavras, MG, CEP 37200-000.

4. Bolsista de apoio técnico à pesquisa – CNPq do Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras. Caixa Postal 37, Lavras, MG, CEP 37200-000.

5. Aluna de graduação do Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras. Caixa Postal 37, Lavras, MG, CEP 37200-000. Apoio financeiro: CAPES.

Passiflora spp.

Foi inoculado um segmento por tubo contendo 10 mL de meio. Após a inoculação, os tubos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento com irradiância em torno de $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas, onde permaneceram por 60 dias. Foi avaliada a percentagem de calos, sendo que este valor correspondeu à média de três avaliadores. A análise de variância foi realizada utilizando software estatístico SISVAR pelo teste de F e regressão a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Melhores resultados para percentagem de calos a partir de segmentos foliares foram observados para a espécie *Passiflora gibertii* (41,4%) (Fig. 1). *Passiflora edulis edulis* obteve uma média de 0,66% de formação de calos. Estes resultados confirmam a existência da variação da resposta entre genótipos de diferentes acessos de maracujazeiro nativo, tornando-se, então, necessário o estudo de cada espécie. Os calos formados apresentaram aspecto organogênico, com coloração amarelo-esverdeada e textura friável. Observou-se a presença de pontos esverdeados nos calos e pequenos primórdios foliares, que indica formação de gemas e posteriormente formação de brotos. Resultados semelhantes foram obtidos por Monteiro [7] e Monteiro et al. [8], utilizando explantes foliares de *Passiflora suberosa*, que obteve calos, cultivados na ausência de luz, com aspecto semelhante ao obtido no presente trabalho, utilizando 2,22 e 4,44 μM de BAP em meio MS acrescido de sacarose (3%) e solidificado com ágar (0,8%). Porém estes autores observaram a formação de gemas a partir de calos, após o cultivo em meio de cultura MSM [7] acrescido de 1 mg L^{-1} de GA_3 .

Com o aumento da concentração de BAP, observou-se aumento na percentagem de calos de *Passiflora gibertii*, sendo que na concentração de 8,88 μM de BAP, observou-se formação de 70,6% de calos (Fig. 2). Dornelas & Vieira [2], utilizando espécies de *Passiflora*, observaram organogênese indireta a partir de cotilédone, hipocótilo e discos foliares cultivados em meio contendo 4,44 μM de BAP, sob condições de 16 horas de luz. Lombardi [6] obteve organogênese indireta, a partir de discos foliares, em *Passiflora cincinnata* em meio MS contendo diferentes concentrações (2,22; 4,44; 6,66 e 8,88 μM) do regulador 6-BA e 5% de água de coco.

Não houve diferença significativa entre os diferentes explantes utilizados (Fig. 3 e 4), sendo que a melhor resposta foi obtida para segmento nodal tanto de *Passiflora gibertii* (46,1% calos) como de *Passiflora edulis edulis* (4,1 % calos). Dornelas e Vieira [2] avaliaram o efeito de diferentes fontes de explante, concentrações de fitorreguladores e água de coco na cultura *in vitro* de *P. edulis* f. *flavicarpa*. Os autores observaram que a formação de gemas ocorreu sem a fase de calo e que o meio MS, acrescido de 8,88 μM de BA e 10% de água de coco, favoreceu a organogênese nos explantes cotiledonares e hipocotiledonares, enquanto

para os explantes foliares foram necessárias concentrações de 4,44 μM de BA e 10% de água de coco para promover a organogênese. Similarmente, Hall et al. [3] verificaram a influência do explante bem como da adição de água de coco na organogênese do híbrido australiano *P. edulis* x *P. edulis* f. *flavicarpa*. Os autores enfatizaram que os explantes cotiledonares foram mais eficientes que os explantes foliares no processo de regeneração e que a adição de 10% de água de coco ao meio MS contendo 8,88 μM de BA promoveu um rápido desenvolvimento de gemas.

Conclusões

A espécie *Passiflora gibertii* responde melhor à formação de calos que *Passiflora edulis edulis* nativo. A utilização de 8,88 μM de BAP promove maior percentagem de calos a partir de segmentos foliares de maracujazeiro nativo. Não há diferença entre o tipo de explante utilizado na formação de calos de espécies de *Passiflora* nativo.

Referências

- [1] BARBOSA, L. S. 1995. *Resistência de Passiflora spp a Xanthomonas campestris pv. passiflorae e detecção do patógeno em sementes*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 66 p.
- [2] DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C. 1994. Tissue culture studies on species of *Passiflora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 36 (2): 211-217.
- [3] HALL, R.M.; DREW, R.A.; HIGGINS, C.M.; DIETZGEN, R.G. 2000. Efficient organogenesis of the Australian passionfruit hybrid (*Passiflora edulis* x *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) suitable for gene delivery. *Australian Journal of Botany*, 48: 673-680.
- [4] *ITI Tropicals*. 2005. [Online]. Homepage: <http://www.passionfruitjuice.com>.
- [5] KURODA, N. 1981. *Avaliação do comportamento quanto a resistência de espécies e progênies de maracujazeiro a Xanthomonas campestris pv. passiflorae*. Jaboticabal: FCAV-UNESP. 45 p.
- [6] LOMBARDI, S.P. 2003. [Online]. *Estudos anatômicos e fisiológicos da organogênese in vitro em Passiflora cincinnata Mast*. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP. 60p. Homepage: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11144/tde-01102004-111847/publico/simone.pdf>.
- [7] MONTEIRO, A. C. B. 2000. *Cultivo in vitro de três espécies do gênero Passiflora*. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. 82 p.
- [8] MONTEIRO, A.C.B de A.; NAKAZAWA, G.T.; MENDES, B.M.J.; RODRIGUEZ, A.P.M. 2000. Regeneração *in vitro* de *Passiflora suberosa* a partir de discos foliares. *Scientia Agrícola*, 57 (3).
- [9] MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- [10] OLIVEIRA, J. C. de 1987. Melhoramento genético. In: RUGGIERO, C. (Ed.) *Cultura do maracujazeiro*. Ribeirão Preto: L. Summa, p. 218-246.
- [11] RIBAS A.F. 2001. [Online]. Estudos sobre a cultura de tecidos do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg). *Scientia Agrária*, 2. Homepage: <http://calvados.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/agraria/article/view/1011/837>.
- [12] TORRES, A.C.; BARBOSA, N.V.; WILLADINO, L.; GUERRA M.P.; FERREIRA, C.F.; PAIVA, S.A.V. 2001. *Meio e condições de incubação para cultura de tecidos de plantas*. Brasília: EMBRAPA-CNPq, (EMBRAPA-CNPq. Circular Técnica). 20p.

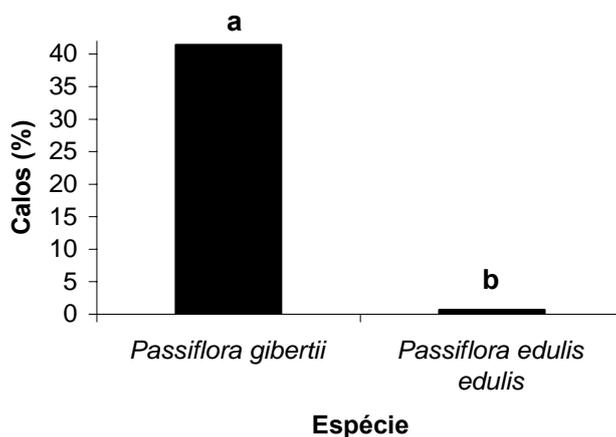


Figura 1. Percentagem de formação de calos em explantes foliares de *Passiflora gibertii* e *Passiflora edulis edulis* em meio MS aos 60 dias de cultivo.

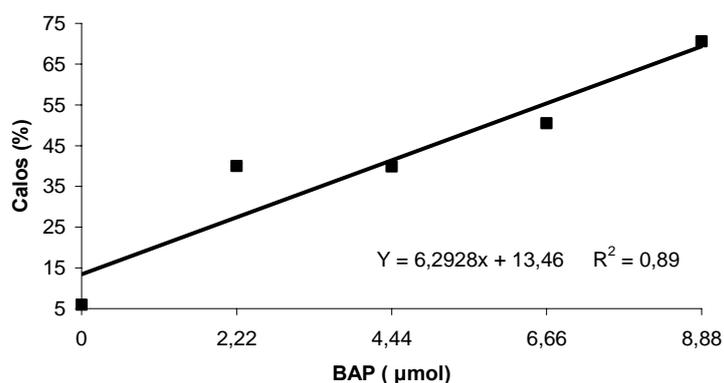


Figura 2. Percentagem de formação de calos em explantes foliares de *Passiflora gibertii* em meio MS na presença de diferentes concentrações de BAP aos 60 dias de cultivo.

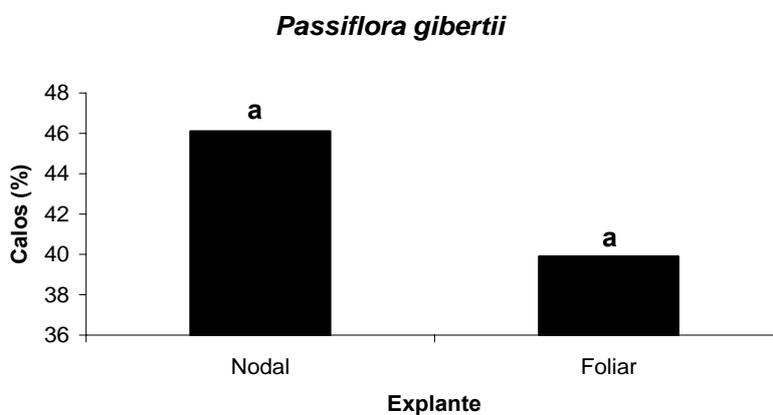


Figura 3. Percentagem de formação de calos em explantes foliares e nodais de *Passiflora gibertii* em meio MS aos 60 dias de cultivo.

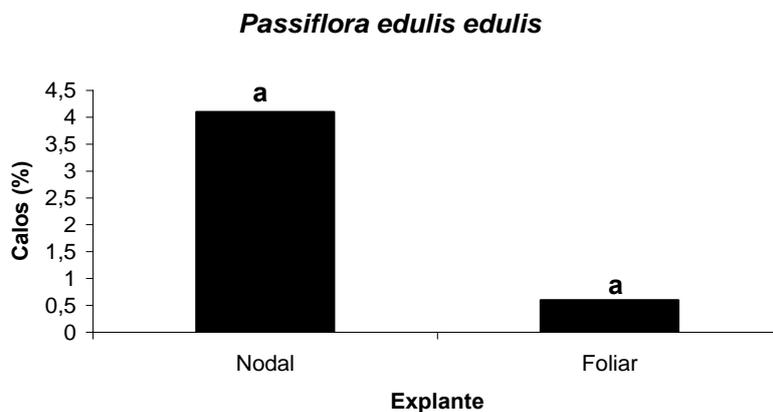


Figura 4. Percentagem de formação de calos em explantes foliares e nodais de *Passiflora edulis edulis* em meio MS aos 60 dias de cultivo.