

Rápida produção de mudas de pitaiá (*Hylocereus undatus*, Cactaceae) por meio da técnica da micropropagação

Rapid production of pitaiá seedlings (Hylocereus undatus, Cactaceae) using the micropropagation technique

Mayra Juline **GONÇALVES**¹; Samila Silva **CAMARGO**¹; Ana Luiza **ARRUDA**^{1,2} & Leo **RUFATO**¹

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar dois meios de cultura combinados com diferentes concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) na propagação *in vitro* de pitaiá. O experimento foi realizado na Universidade do Estado de Santa Catarina. Os tratamentos constituíram-se de dois meios de cultura (MS e QL modificado) e três concentrações de BAP (0, 1 e 2 mg.L⁻¹), originando um esquema fatorial 2x3 em um delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições de cinco explantes. O uso do meio de cultura QL modificado na ausência de BAP (6-benzilaminopurina) assegura média superior para a variável número de brotações. Para a produção massal de explantes de pitaiá (*Hylocereus undatus*), o meio QL modificado sem a adição de BAP é uma possibilidade de uso na micropropagação, com baixo custo e rendimento superior a meios de cultura com suplementação de BAP.

Palavras-chave: cactácea; citocinina; cultura de tecidos; meio de cultura.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate two culture methods combined with different concentrations of BAP (6-benzylaminopurine) in the *in vitro* propagation of pitaya. The experiment was carried out at the Santa Catarina State University. The treatments consisted of two culture media (MS and QL modified) and three concentrations of BAP (0, 1 and 2 mg .L⁻¹) resulting in a 2x3 factorial scheme in a completely randomized design with 10 replications of 5 explants. The use of culture medium QL modified in the absence of BAP (6-benzylaminopurine) guarantees an higher average for the sprout number variable. For a massive explants production of pitaiá (*Hylocereus undatus*), the QL medium modified without the addition of BAP is a possibility of use in micropropagation with low cost and higher yield than culture media with BAP supplementation.

Keywords: cactacea; culture medium; cytokinin; tissue culture.

Recebido em: 6 nov. 2018

Aceito em: 11 mar. 2020

INTRODUÇÃO

Pertencentes à família Cactaceae, as pitaiás vêm se destacando no mercado de frutas exóticas. Existem várias espécies denominadas “pitaiás”, entre as quais podem ser citadas *Hylocereus undatus* (pitaiá vermelha de polpa branca), *Hylocereus costaricensis* (pitaiá vermelha de polpa vermelha), *Selenicereus megalanthus* (pitaiá amarela) e *Selenicereus setaceus* (pitaiá do cerrado) (JUNQUEIRA *et al.*, 2010).

¹ Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade do Estado de Santa Catarina (Udesc), Avenida Luís de Camões, n.º 2.090, Conta Dinheiro – CEP 88520-000, Lages, SC, Brasil.

² Autor para correspondência: analuiza1arruda@hotmail.com.

A pitáia vermelha de polpa branca (*Hylocereus undatus*) tem despertado a atenção mundial tanto pelo alto potencial agrônomo e econômico quanto pelas suas características ornamentais (JUNQUEIRA *et al.*, 2010; DAHANAYAKE & RANAWAKE, 2011). Atributos como aparência exótica, sabor doce e suave, polpa consistente e sementes abundantes têm gerado expressiva receptividade nos mercados consumidores, o que tem estimulado o interesse dos produtores, assim como o elevado valor pelo quilo da fruta (LOPES *et al.*, 2016).

A propagação da pitáia pode ser feita por sementes, estaquia e cultura de tecidos (KARI *et al.*, 2010; ROMÁN *et al.*, 2014). A utilização de sementes e da estaquia apresenta muitas desvantagens para a produção comercial, visto que plantas propagadas por sementes possuem longo período juvenil, e na propagação por estaquia há grande risco de proliferação de pragas e doenças.

Em contrapartida, o uso da cultura de tecidos possibilita obtenção de plantas saudáveis e a produção de mudas em larga escala, com pequena quantidade de material propagativo (MENEZES *et al.*, 2012).

A composição do meio de cultura empregado nessa técnica tem função importante nas respostas de crescimento de células e tecidos, visto que plantas ou explantes cultivados *in vitro* possuem exigências nutricionais específicas e requerem meios nutritivos compostos por minerais, vitaminas e fontes de energia (BRAGA *et al.*, 2009).

Além do meio de cultura, responsável pela sustentação do explante e pelo fornecimento de nutrientes, a utilização de reguladores de crescimento é essencial para o desenvolvimento dos explantes, pois está intimamente relacionada com a divisão celular e o crescimento (REIS *et al.*, 2008). O uso e o efeito de citocininas na indução de brotações *in vitro* de pitáias vêm sendo relatados por vários autores (VIÑAS *et al.*, 2012; MENEZES *et al.*, 2012; FAN *et al.*, 2013; HUA *et al.*, 2015). Diferentes resultados são encontrados, de acordo com as concentrações e/ou as espécies trabalhadas.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar dois meios de cultura com diferentes concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) na propagação *in vitro* de pitáia (*Hylocereus undatus*).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Micropropagação de Plantas (LMV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (Udesc) – Centro de Ciências Agroveterinárias. A pesquisa foi repetida em dois subcultivos sucessivos, de 30 dias cada um, com o objetivo de alcançar resultados mais conclusivos. A propagação foi realizada pela inoculação dos segmentos obtidos de plântulas preestabelecidas por meio da germinação *in vitro* de sementes de pitáia (*Hylocereus undatus*).

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2x3 (dois meios e três concentrações de BAP), totalizando seis tratamentos com 10 repetições de 5 explantes.

Empregaram-se dois meios de cultivo (MS: Murashige & Skoog, 1962; e QL modificado: Leblay *et al.*, 1991), os quais foram suplementados com três concentrações de 6-benzilaminopurina (0, 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹). A análise foi realizada separadamente por cultivo.

Ambos os meios de cultura foram suplementados com 30 mg.L⁻¹ de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de inositol, pH ajustado para 5,8 antes da adição de 6 g.L⁻¹ de ágar, e complementados com as diferentes concentrações de BAP de acordo com os tratamentos.

Posteriormente os meios foram autoclavados durante 20 minutos a 121°C, sob pressão de 1,5 atm. Os explantes foram cultivados em frascos com capacidade para 250 mL contendo 30 mL de cada meio de cultura e mantidos em sala de crescimento com condições controladas de fotoperíodo (16 horas), temperatura (25 ± 2°C) e radiação fotossinteticamente ativa (27 μmol.m⁻².s⁻¹).

Aos 45 dias de cultivo, analisaram-se as seguintes variáveis: número de brotações, comprimento maior (cm) e comprimento médio de brotações (cm), número de raízes e de raízes aéreas, comprimento maior (cm) e médio de raízes (cm) e intensidade de calos (0 a 2), sendo considerado: 0 – sem calos; 1 – calos pequenos; e 2 – calos grandes.

Os dados de ambos os subcultivos foram submetidos à análise de variância com aplicação do teste F, e as médias, quando significativas, foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

RESULTADOS

Observou-se efeito significativo para a interação entre o meio de cultura e a concentração de citocinina no número de brotações, comprimento da maior brotação e comprimento médio de brotações.

No primeiro subcultivo, para as variáveis número de brotações e comprimento da maior brotação, obtiveram-se melhores resultados ao utilizar o meio de cultura MS com 2 mg.L⁻¹ de BAP e o meio de cultura QL modificado com 0 ou 1 mg.L⁻¹ de BAP. O comprimento médio de brotações foi favorecido com o uso dos meios MS suplementado com 2 mg.L⁻¹ de BAP (2 cm) e QL modificado sem a adição do regulador de crescimento (2,44 cm) (tabela 1). No segundo subcultivo, o maior número de brotações foi obtido com o uso dos meios MS + 1mg.L⁻¹ de BAP e QL modificado + 0 e 2 mg.L⁻¹ de BAP. As variáveis comprimento da maior brotação e comprimento médio de brotações foram favorecidas com o emprego do meio MS ou QL modificado, ambos na ausência de BAP.

Tabela 1 – Número de brotações, comprimento da maior brotação (cm) e comprimento médio de brotações de explantes de pitáia (*Hylocereus undatus*) cultivados em dois meios de cultura e três concentrações de BAP, em dois subcultivos.

Julho de 2016						
BAP	Número de brotações		Comprimento da maior brotação		Comprimento médio de brotações	
	MS	QL modif.	MS	QL modif	MS	QL modif
0	4,13 Ab	4,38 Aa	2,6 Bab	3,9 Aa	1,7 Bab	2,44 Aa
1	4,41 Ab	5,03 Aa	1,4 Bb	3,76 Aa	1,36 Ab	1,64 Ab
2	5,68 Aa	4,68 Ba	3,1 Aa	1,84 Bb	2 Aa	1,53 Bb
Setembro de 2016						
0	4,35 ABb	5,13 Aa	3,83 Aa	3,95 Aa	2,51 Aa	2,49 Aa
1	4,59 Aa	3,42 Bb	2,31 Ba	1,75 Ba	1,85 Bb	1,49 Bb
2	3,71 Bb	4,67 Aa	1,55 Bb	2,57 Ba	1,42 Bb	1,89 Ba

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A Anova para comprimento médio de raízes foi significativa para a interação meio de cultura e concentração de BAP apenas no primeiro subcultivo. O maior comprimento médio de raízes foi verificado com o meio MS ou QL modificado, ambos sem a presença do regulador de crescimento ou com o uso do meio QL modificado acrescido de 1 mg.L⁻¹ de BAP (tabela 2). No segundo subcultivo, houve interação entre os fatores estudados para número de raízes e número de raízes aéreas; os maiores valores obtidos para número de raízes foram observados com a utilização do meio QL modificado sem BAP, e o maior número de raízes aéreas, com o uso do meio MS + 1 mg.L⁻¹ de BAP e QL modificado + 0 e 2 mg.L⁻¹ de BAP (tabela 2).

Tabela 2 – Número de raízes, comprimento médio de raízes (cm) e número de raízes aéreas de explantes de pitaia (*Hylocereus undatus*) cultivados em dois meios de cultura e três concentrações de BAP, em dois subcultivos.

Julho de 2016						
BAP	Número de raízes		Comprimento médio de raízes		Número de raízes aéreas	
	MS	QL modif.	MS	QL modif	MS	QL modif
0	*	*	4,93 Aa	4,56 Aa	*	*
1	*	*	1,07 Bb	4,95 Aa	*	u
2	*	*	1,86 Ab	2,00 Ab	*	*
Setembro de 2016						
0	3,76 Ab	4,51 Aa	**	**	2,6 ABa	1,91 Aa
1	3,18 Ba	2,68 Bb	**	**	3,33 Aa	2,04 Ab
2	2,04 Ca	2,3 Ba	**	**	1,93 Ba	2,4 Aa

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * Dados apresentados na tabela 3. ** Dados apresentados na tabela 4.

Não houve interação entre os fatores meio de cultura e concentrações de BAP para as variáveis comprimento da maior raiz, número de raízes, número de raízes aéreas e intensidade de calos, no primeiro subcultivo (tabela 3). Sendo assim, essas variáveis foram analisadas de forma isolada.

Tabela 3 – Comprimento da maior raiz (cm), número de raízes, número de raízes aéreas e intensidade de calos de explantes de pitaia (*Hylocereus undatus*) em diferentes meios de cultivo e concentrações de BAP. Legenda: ns – não significativo.

Julho de 2016				
	Comprimento da maior raiz	Número de raízes	Número de raízes aéreas	Intensidade de calos
MS	4,11 b	2,66 b	1,91 ns	1,20 ns
QL	5,68 a	3,09 a	2,04	1,24
0	3,25 ns	4,19 a	2,08 ns	1,00 c
1	2,58	2,26 b	1,98	1,24 b
2	2,47	2,16 b	1,86	1,42 a

Médias seguidas pela mesma letra, dentro de cada variável, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O comprimento maior sofreu influência apenas do fator meio de cultura, e a utilização do meio QL modificado proporcionou as maiores médias. O número de raízes diferiu de forma significativa para ambos os fatores, com melhores resultados para o uso do meio QL modificado e sem a adição de BAP. O número de raízes aéreas não diferiu estatisticamente entre os tratamentos em ambos os fatores. A intensidade de calos foi influenciada apenas para o fator concentrações de BAP, em que a menor intensidade foi observada com a não utilização do regulador de crescimento.

Não ocorreu interação entre os fatores estudados para as variáveis comprimento médio e maior de raízes, assim como para intensidade de calos. O meio de cultura empregado não influenciou de forma significativa tais variáveis, entretanto verificaram-se diferenças estatísticas para as concentrações de BAP, em que a ausência da citocinina proporcionou os resultados mais satisfatórios para comprimento da maior raiz e comprimento médio de raízes (tabela 4).

Tabela 4 – Comprimento da maior raiz (cm), comprimento médio de raízes (cm) e intensidade de calos de explantes de pitaia (*Hylocereus undatus*) em diferentes meios de cultivo e concentrações de BAP. Legenda: ns – não significativo.

Setembro de 2016			
	Comprimento da maior raiz	Comprimento médio de raízes	Intensidade de calos
MS	4,90 ns	2,49 ns	0,56 ns
QL	5,02	2,88	0,42
0	10,03 a	5,04 a	1,00 c
1	5,31 b	3,40 b	1,57 b
2	2,55 c	2,63 b	1,92 a

Médias seguidas pela mesma letra, dentro de cada variável, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

DISCUSSÃO

O uso do meio de cultura QL modificado, na ausência de BAP, assegurou média superior para a variável número de brotações e, sendo esta uma das principais variáveis quando o objeto é a produção massal de material vegetal, isso constitui um bom indicativo para a micropropagação de pitaia, visto que se torna possível a redução dos custos de produção de mudas. Possivelmente a concentração endógena de fitormônios da espécie estudada é suficiente para estimular a formação e o comprimento de novas brotações. Viñas *et al.* (2012) observaram que as menores concentrações de BAP (0, 0,2 ou 0,4 mg.L⁻¹) formaram brotações de pitaia sem sintomas de anormalidades ou necrose apical. Além disso, esses mesmos autores verificaram que a redução na suplementação de BAP não afetou de forma significativa a altura da parte aérea das plantas.

A presença de BAP agiu de forma negativa no número de raízes e, à medida que se elevaram as concentrações, houve decréscimo na formação delas. Isso pode ser explicado pelo fato de esse regulador de crescimento promover maior crescimento da parte aérea em detrimento da formação de raízes. Respostas semelhantes foram verificadas no estudo de Costa *et al.* (2015), em que, na ausência de BAP, os explantes de manjeriço formaram raízes, já que, à medida que se elevaram as concentrações de citocinina no meio de cultura, a porcentagem de emissão de raízes diminuiu. Martínez-Cárdenas *et al.* (2007) observaram o enraizamento de brotações de pitaia em meio MS, independentemente da adição de reguladores de crescimento. A redução dos níveis de BAP durante a fase de proliferação das brotações pode ter desencadeado o enraizamento, como observado em outros estudos (ARRUDA *et al.*, 2018). O enraizamento espontâneo é extremamente importante para acelerar o processo de aclimatização, evitando assim uma fase de enraizamento *in vitro*.

Menezes *et al.* (2012), ao estudar a associação de fitorreguladores, notaram que o comprimento médio de raízes de pitaia diminuiu à medida que se elevaram as concentrações de BAP na concentração fixa de 0,1 mg.L⁻¹ de ANA.

No presente trabalho, em ambos os cultivos se observou elevação no número de calos com o aumento de BAP no meio de cultivo. A formação de calos na base dos explantes de pitaia com o aumento dos níveis de BAP no meio de cultura foi relatada por Shishkova *et al.* (2007) e Viñas *et al.* (2012) e em outras espécies de cactos.

CONCLUSÃO

O uso do meio de cultura QL modificado, na ausência de BAP (6-benzilaminopurina), assegura média superior para a variável número de brotações.

Para a produção massal de explantes de pitaya (*Hylocereus undatus*), o meio QL modificado sem a adição de BAP é uma possibilidade de uso na micropropagação, com baixo custo e rendimento superior a meios com suplementação de BAP.

REFERÊNCIAS

- Arruda, A. L., da Silva, P. S., Grimaldi, F., Richter, A. F., Rufato, L. & Kretzschmar, A. A. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira G.202. Revista Científica Rural. 2018; 20(2): 265-277.
doi: 10.1590/s1413-70542006000600009
- Braga, F. T., Nunes, C. F., Favero, A. C., Pasqual, M., de Carvalho, J. G. & de Castro, E. M. Características anatômicas de mudas de morangueiro micropropagadas com diferentes fontes de silício. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 2009; 44(2): 128-132.
doi: 10.1590/S0100-204X2009000200003
- Costa, A. S. da, Blanck, M. de F., Silva, J. H. S., Torres, M. F., Santos, O. N. A. & Blanck, A. F. Multiplicação *in vitro* e indução de calos embriogênicos em híbrido de manjeriço. Scientia Plena. 2015; 11(1): 1-12.
- Dahanayake, N. & Ranawake, A. L. Regeneration of dragon fruit (*Hylocereus undatus*) plantlets from leaf and stem explants. Tropical Agricultural Research and Extension. 2011; 14(4): 85-89.
doi: 10.4038/tare.v14i4.4848
- Fan, Q. J., Zheng, S. C., Yan, F. X., Zhang, B. X., Qiao, G. & Wen, X. P. Efficient regeneration of dragon fruit (*Hylocereus undatus*) and an assessment of the genetic fidelity of *in vitro*: derived plants using ISSR markers. Horticultural Science and Biotechnology. 2013; 88(5): 631-637.
doi: 10.1080/14620316.2013.11513017
- Hua, Q., Chen, P., Liu, W., Ma, Y., Liang, R., Wang, L., Wang, Z., Hu, G. & Qin, Y. A protocol for rapid *in vitro* propagation of genetically diverse pitaya. Plant Cell Tiss Organ Culture. 2015; 120: 741-745.
doi: 10.1007/s11240-014-0643-9
- Junqueira, K. P., Faleiro, F. G., Bellon, G., Junqueira, N. T. V., Fonseca, K. G. da, Lima, C. A. de & Santos, E. C. dos. Variabilidade genética de acessos de pitaya com diferentes níveis de produção por meio de marcadores RAPD. Revista Brasileira de Fruticultura. 2010; 32(3): 840-846.
doi: 10.1590/S0100-29452010005000107
- Kari, R., Lukman, R. L., Zainuddin, R. & Ja'afar, H. Basal media for *in vitro* germination of red-purple dragon fruit *Hylocereus polyrhizus*. Journal of Grobiotechnology. 2010; 1: 88-93.
- Leblay, C., Chevreau, E. & Raboin, L. M. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaves of several pear cultivars (*Pyrus communis* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1991; 25: 99-105.
- Lopes, C. A., Dias, G. M. G., Pio, L. A. S., Silveira, F. A. da, Rodrigues, F. A. & Pasqual, M. Indução de calos, potencial embriogênico e estabilidade genética em pitaya vermelha. Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária). 2016; 11(1): 21-25.
doi: 10.5039/agraria.v11i1a5355
- Martínez-Cárdenas, M. L., Vicente-Solano, R., Martínez-Herrera, A., Carmona, A. & Varela, G. H. Survival and growth on soil of micropropagated pitaya de mayo plants. Acta Horticulturae. 2007; 748: 237-240.
- Menezes, T. P. de, Gomes, W. A., Pio, L. A. S., Pasqual, M. & Ramos, J. D. Micropropagação e endoreduplicação em pitaya vermelha, *Hylocereus undatus* haw. Bioscience Journal. 2012; 28(6): 868-876.

Murashige, T. & Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*. 1962; 15: 473-497.

Reis, E. S., Pinto, J. E. B. P., Rosado, L. D. S. & Corrêa, R. M. Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. *Revista Ceres*. 2008; 55: 160-167.

Román, R. S. S., Caetano, C. M., Ramírez, H. & Osorio, J. G. M. Multiplicación de *Selenicereus megalanthus* (pitahaya amarilla) e *Hylocereus polyrhizus* (pitahaya oja) vía organogénesis somática. *Acta Agronómica*. 2014; 63(2): 272-281.

doi: 10.15446/acag.v63n3.40980

Shishkova, S., García-Mendoza, E., Castillo-Díaz, V., Moreno, N. E., Arellano, J. & Dubrovsky, J. G. Regeneration of roots from callus reveals stability of the developmental program for determinate root growth in Sonoran Desert Cactaceae. *Plant Cell Reports*. 2007; 26: 547-557.

Viñas, M., Fernández-Brenes, M., Azofeifa, A. & Jiménez, V. M. *In vitro* propagation of purple pitahaya (*Hylocereus costaricensis* [F.A.C. Weber] Britton & Rose) cv. Cebra. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 2012; 48: 469-477.

doi: 10.1007/s11627-012-9439-y