

Assepsia e germinação *in vitro* de *Passiflora edulis* Sims

Kamila de Andrade Pederiva¹

Murilo Ficcagna Oliveira¹

Dayane Ávila Fernandes²

RESUMO

Para produção comercial de mudas, a propagação é feita basicamente por sementes. Existem pesquisas realizadas, com diversas técnicas e meios de biotecnologia no cultivo de maracujazeiros, com o objetivo de regenerar plantas *in vitro* e obter novas variedades. O presente trabalho objetivou-se comparar o uso de fungicida e doses de hipoclorito na assepsia e germinação de sementes de maracujá amarelo. O experimento foi realizado no laboratório de biotecnologia, do Centro Universitário de Várzea Grande – UNIVAG, nos meses de abril a junho de 2018. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 5, com e sem fungicida Standak Top (0,5 ml), e com cinco doses de hipoclorito de sódio (0, 1, 2, 3 e 4%), com oito repetições, totalizando 10 tratamentos. Foi realizada uma avaliação aos 60 dias, os parâmetros avaliados foram: contaminação por fungos e bactérias entre as sementes e o meio de cultura e a porcentagem de germinação. Não houve diferença significativa quanto ao uso de fungicida. A dose com maior germinação foi de 0,0%. Concluiu-se que doses de até 2% de hipoclorito foram eficientes no controle de micro-organismos e apresentaram maior porcentagem de germinação.

Palavras-chave: Maracujá, micropropagação, hipoclorito de sódio.

Ascites and *in vitro* germination of *Passiflora edulis* Sims

ABSTRACT

For commercial production of seedlings, the propagation is done basically by seeds. There are researches, with several techniques and means of biotechnology in the cultivation of passion fruit, with the aim of regenerating plants *in vitro* and obtaining new varieties. The present work aimed to compare the use of fungicide and hypochlorite doses in aseptic and germination of yellow passion fruit seeds. The experiment was carried out in the biotechnology laboratory of the University Center of Várzea Grande - UNIVAG, from April to June 2018. The experimental design was completely randomized in a 2 x 5 factorial scheme, with and without fungicide Standak Top (0.5 ml), and with five doses of sodium hypochlorite (0, 1, 2, 3 and 4%), with eight replications, totaling 10 treatments. An evaluation was performed at 60 days, the parameters evaluated were: contamination by fungi and bacteria between seeds and the culture medium and the percentage of germination. There was no significant difference in fungicide use. The highest germination dose was 0.0%. It was concluded that doses of up to 2% of hypochlorite were efficient in the control of microorganisms and presented a higher percentage of germination.

Key words: Passion fruit, micropropagation, sodium hypochlorite.

¹ Discentes do curso de Agronomia do Univag Centro Universitário. Email: kamila123pederiva@gmail.com, muriloficcagna@hotmail.com

² Docente do curso de Agronomia do Univag Centro Universitário. Email: dayavila1@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

O maracujazeiro (*Passiflora edulis sims*), da família Passifloraceas, é uma trepadeira vigorosa e sublenhosa, com grande vigor vegetativa (GOMES, 1972). Na fruticultura, o Brasil ocupa uma posição de destaque na produção de maracujá. O gênero *Passiflora* apresenta um grande número de espécies conhecidas, sem contar as variedades e os híbridos desenvolvidos, divididos em comestíveis, medicinais e ornamentais (SANTOS, 2006).

A produção mundial de maracujá é de 640.000 toneladas, e o Brasil como primeiro produtor, apresenta aproximadamente 70% desse total. O Equador aparece em segundo lugar, com 85.000 toneladas (FERREIRA, 2005). Para produção comercial de mudas, a propagação é feita basicamente por sementes, mas pode ser realizada por estaquia ou enxertia (CAVICHOLI, 2015). A propagação assexuada desenvolvida através de enxertia ou estaquia contém todas as vantagens da propagação *in vitro*, como plantas-filha iguais à planta mãe, garantindo elevado potencial produtivo. Para o sucesso desta propagação, o uso de diferentes matrizes é o mais importante, para o fornecimento de material propagativo, por conta das características de autoincompatibilidade presente nas espécies de maracujá (FERREIRA, 2000).

Existem pesquisas realizadas, com diversas técnicas e meios de biotecnologia no cultivo de maracujazeiros, com o objetivo de regenerar plantas *in vitro* e obter novas variedades (ALVES, 2008). O objetivo principal da micropropagação é o de produzir plantas de qualidade, uma vez que microrganismos podem se manifestar no cultivo *in vitro* (CAMARA et al., 2010).

Algumas espécies apresentam dificuldades para o estabelecimento *in vitro*, pois podem apresentar contaminação e presença de microrganismos (COUTO et al., 2004; GOLLE et al. 2013). Uma importante etapa no processo de estabelecimento de espécie vegetal em laboratório é a desinfecção do material. Inicia-se com uso de bactericidas, como o hipoclorito de sódio (NaHIO) (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; CAMOLESI et al., 2007; PEREIRA et al., 2011). Os tecidos vegetais podem interferir no controle dos microrganismos, sejam destoxificando as substâncias, ou servindo como habitat (SCHERWINSKI-PEREIRA; ALTERTHUM, 2010).

Objetivou-se nesse trabalho comparar o uso de fungicida e doses de hipoclorito na assepsia e germinação de sementes de maracujá amarelo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no laboratório de biotecnologia, do Centro Universitário de Várzea Grande – UNIVAG, nos meses de abril a junho de 2018.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 5, com e sem fungicida Standak Top (piraclostrobina + tiofanato metílico), e cinco doses de hipoclorito (0, 1, 2, 3 e 4%), com oito repetições.

As sementes utilizadas foram adquiridas em loja agropecuária, situada em Várzea Grande – MT, em janeiro de 2018.

Os recipientes utilizados para inocular as sementes foram frascos cilíndricos de vidro com capacidade de 250 ml, de diâmetro externo de 68 mm e altura de 100 mm. Em cada frasco foi adicionado 20 ml de meio de cultura MS, formulado por Murashige e Skoog (1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 3 ml L⁻¹ de BAP, solidificado com 8,0 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado em 5,8 ± 0,2. Após o preparo, os frascos foram levados para esterilização em autoclaves em temperatura de 120 °C e 1 kgf cm⁻² de pressão, por 20 minutos e, em seguida, retirados e armazenados em estante na sala de repicagem para resfriar em temperatura ambiente e solidificar o meio de cultura.

A assepsia das sementes foi realizada com duas gotas do detergente Tween 20® e enxaguada três vezes com água destilada. Em seguida, foi utilizado álcool 70% em cada frasco durante um minuto e enxaguadas três vezes. Na sequência foram colocadas doses de hipoclorito (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0%) por cinco minutos e com subsequentes três enxagues em água destilada.

Após esse processo, metade dos tratamentos foi colocado em contato com fungicida Standak Top (piraclostrobina + tiofanato metílico) em sacos plásticos e homogeneizadas por fricção. A determinação da dose foi feita de acordo com a quantidade adequada para cobertura das sementes e não foi realizado mais nenhum enxágue. Os tratamentos com 0,0% de hipoclorito passaram apenas pela limpeza com detergente Tween 20®, álcool etílico 70% (v/v) e um dos tratamentos em contato com o fungicida.

Após a desinfestação as sementes foram então inoculadas nos frascos contendo meio de cultura previamente preparado em câmara de fluxo laminar previamente homogeneizada com álcool 70% e as pinças utilizadas para colocar as 320 sementes em contato com o meio de cultura dentro dos frascos foram esterilizadas em autoclave. Para cada frasco inoculado, as pinças passaram por flambagem com álcool 95% e as foram utilizadas frias para evitar injúrias ao tecido vegetal.

Foi realizada uma avaliação aos 60 dias após inoculação, os parâmetros avaliados foram: contaminação por fungos e bactérias entre as sementes e o meio de cultura e a porcentagem de germinação. A avaliação foi feita visualmente, e foram consideradas germinadas as sementes que apresentavam protrusão radicular.

Os dados não obedeceram as pressuposições de homogeneidade de variâncias e normalidade dos dados, sendo assim, foram submetidos à análise não paramétrica de Kruskal – Wallis, a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com análise estatística, não houve diferença para fungicida $F = 0,027$ (1;76), com $cv = 61,36\%$, de modo que grande parte das sementes apresentaram contaminação por fungo. Essa contaminação pode ter ocorrido pelo fato de o fungo já estar no interior da semente, e junto com o ambiente favorável ao seu desenvolvimento, diminuindo drasticamente a eficiência do fungicida. Um dos maiores problemas na produção de mudas *in vitro*, é a contaminação por fungos e bactérias, principalmente na superfície dos explantes durante as etapas de micropropagação, além da contaminação endógena (LONDE et al., 2007).

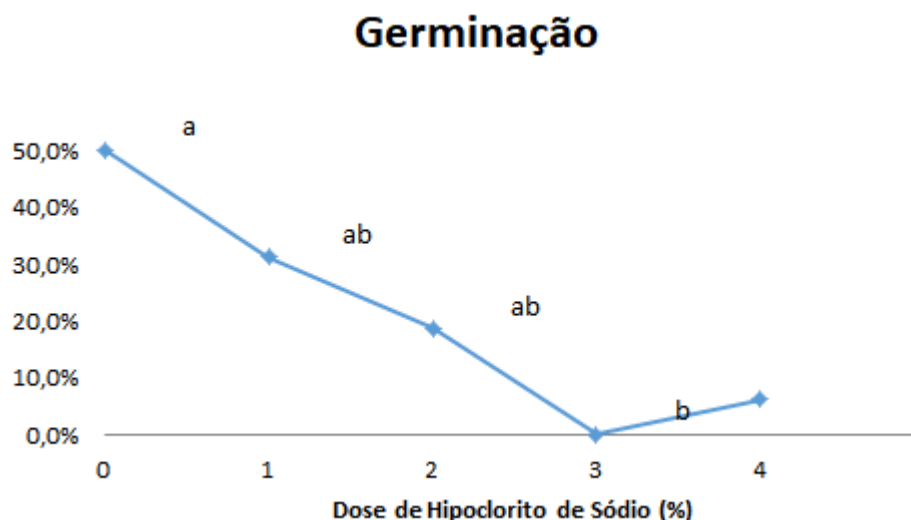
A contaminação estabelece-se no meio de cultura e/ou material vegetal competindo pelos nutrientes, produzindo substâncias tóxicas e inibindo o desenvolvimento do explante, ocasionando, assim, sua perda (SOUZA et al. 2007).

De acordo com Souza et al. (2007), uma das causas de contaminação por fungos está relacionada a cuidados no ambiente. Mesmo com cuidados com assepsia, em biofábricas brasileiras já foram registradas porcentagens de contaminação superiores a 30% causadas tanto por fungos como por bactérias.

As sementes não apresentaram contaminação bacteriana, esse fato pode estar relacionado com o uso de hipoclorito de sódio e o álcool 70% que são bactericidas. O resultado deste estudo está de acordo com o de Andrade et al. (2000), que desinfestaram sementes de aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva*) em álcool 70% por 30 segundos, seguido de hipoclorito de sódio 1% por 10 minutos, e as lavaram três vezes com água destilada, as quais não apresentaram nenhum tipo de contaminante.

A análise estatística revelou que houve diferença significativa na germinação, de acordo com a concentração de hipoclorito de sódio, sendo que em sua ausência houve maior germinação das sementes em relação as maiores doses (Figura 1).

Figura 1. Germinação de sementes (%) de acordo com dose de hipoclorito de sódio.



Médias seguidas da mesma letra não diferiram entre si de acordo com o teste de Kruskal – Wallis a 5% de significância.

A alta taxa de contaminação fúngica provavelmente foi um dos fatores que influenciaram a baixa taxa de germinação, porém não pode ser descartado que a fisiologia da espécie pode também estar relacionada. Muitas informações são conhecidas quanto à germinação do maracujazeiro, porém, é unânime a afirmativa de que o início e o término da germinação das sementes de Passifloráceas ocorrem de forma irregular, podendo, este período, ser de 10 dias a 3 meses, o que dificulta a formação de mudas, por não serem uniformes (LUNA, 1984).

Segundo Carnelossi et al. (1995), em certas sementes, cujos tegumentos não representam barreira física para a germinação, o hipoclorito de sódio pode causar escarificação, provocando danos aos tecidos do embrião.

Couto (2004), verificou 65% de germinação de sementes de aroeira germinadas *in vitro* que não passaram por qualquer tratamento envolvendo álcool e hipoclorito de sódio. Passos (1999), em trabalho sobre a germinação de sementes *in vitro* de *Passiflora nítida*, verificou um máximo de 19,7 % de germinação, sem a embebição prévia das sementes e sem a utilização de ácido giberélico.

4. CONCLUSÃO

A utilização de hipoclorito até 2% foi eficiente no controle de microrganismos. A utilização de hipoclorito de sódio em doses mais altas, afeta o desenvolvimento das sementes, havendo um melhor desenvolvimento na ausência dos mesmos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAMARA, T.R.; WILLADINO, L.; ALBUQUERQUE, C.C. Microrganismos assintomáticos do cultivo *in vitro*: natureza e riscos para o cultivo de plantas. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. (edt.). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p.221-260.

CARNELOSSI, M.A.G.; LAMOUNIER, L.; RANAL, M.A. Efeito da luz, hipoclorito de sódio, escarificação e estratificação na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) cv. Maioba e Moreninha-de-Uberlândia. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.30, n.6, p.779-787, 1995.

CARVALHO, J.M.F.C.; SILVA, M.M.A.; MEDEIROS, M.J.L. **Fatores inerentes à micropropagação**. Campina Grande: Embrapa Algodão. 2006. 28 p. (Documentos, 148.).

CAVICHOLI, José Carlos. Métodos de produção de mudas de maracujá. Campo e negócio. Adamantina: 2015. Disponível em: <http://www.revistacampoenegocios.com.br/metodos-de-producao-de-mudas-de-maracuja/>. Acesso em: 7 junho 2017.

COUTO, J.M.F.; OTONI, W.C.; PINHEIRO, A.L.; FONSECA, E.P. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de Mogno *Swietenia macrophylla* King. R. Árvore, Viçosa-MG, v.28, n.5, p.633-642, 2004.

FERREIRA, F. R. Recursos Genéticos em *Passiflora*. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Orgs.). Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: EMBRAPA CERRADOS, 2005. p. 41-51. v. 1.

FERREIRA, Gisela. Propagação do maracujazeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte: v.21, n. 206, p. 18-24, 2000.

GOMES, Pimentel. **Fruticultura brasileira**. São Paulo: NBL Editora, 1972.

GOLLE, P.D.; REINIGER, L.R.S.; BELLÉ, R.A.; CURTI, A.R. Desinfestação superficial de explantes isolados de ramos semilenhosos e herbáceos de *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). **Cerne**, Lavras, v.19, n.1, p. 77-82, 2013.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, (J.A.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 1998. p.183-260. v.1.

JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Orgs.). Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: EMBRAPA CERRADOS, 2005. p. 41-51. v. 1.

LIMA, D. M. de; GOLOMBIESKI, E. R.; AYUB, Ricardo Antonio. Application of biotechnological processes to passion fruit culture. **Ciência Rural**, Santa Maria: v. 30, n. 2, p. 359-363, 2000.

LONDE, L.N.; SOUZA, C.S.; VIEIRA, C.U.; BONETTI, A.M.; KERR, W.E. Efeito do benomyl e identificação de fitopatógenos em meio MS para controle da contaminação na micropropagação de *Anacardium humile* (Anacardiaceae). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.23, n.3, p. 94-100, 2007.

LUNA, J.V.U. **Instruções para a cultura do maracujá**. Salvador: EPABA, 1984. 25p. (Circular Técnica, 7).

ODA, M.L.; FARIA, R.T.; FONSECA, I.C.B.; SILVA, G.L. Avaliação da fitotoxicidade de fungicidas e germicida na propagação *in vitro* de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae) para o controle de microorganismos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 273-276, 2003.

PASSOS, I. R. S. **Comportamento in vitro em Vitis spp. e em Passiflora nitida** H.B.K. 1999. 112f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

SANTOS, Flávia Carvalho. **Caracterização físico-química do fruto e micropropagação do Maracujá-do-sono (*Passiflora setacea* DC.)**. 2006. 68 f. Dissertação (Mestrado em agronomia). Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2006.

SOUSA, G.C.; CLEMENTE, P.L.; ISAAC, V.L.R.; FARIA, S.P.; CAMPOS, M.R.C. Contaminação microbiana na propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 405-407, jul. 2007.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E.; ALTERTHUM, F. Detecção, isolamento e preservação de microrganismos contaminantes da cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. (editor técnico). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010, p.163-185.