

# Propagação *in vitro* de pitaiá vermelha

## *In vitro* propagation of red pitaya

Camila Aparecida Lopes<sup>1</sup>, Gabrielen de Maria Gomes Dias<sup>2\*</sup>, Flávia Aparecida da Silveira<sup>1</sup>,  
Filipe Almendagna Rodrigues<sup>1</sup>, Leila Aparecida Salles Pio<sup>1</sup>, Moacir Pasqual<sup>1</sup>

### RESUMO

A pitaiá vermelha de polpa branca, pertencente à família Cactaceae, é a espécie exótica mais cultivada atualmente. Características como sabor doce e suave, polpa firme e repleta de sementes, têm despertado interesse nos produtores por sua grande aceitação nos mercados consumidores e pelo alto valor pago pelo quilo da fruta. Com objetivo de otimizar o protocolo para micropropagação de pitaiá, quatro experimentos foram realizados: 1) Germinação *in vitro* de pitaiá vermelha na ausência e presença de luz; 2) Germinação *in vitro* de sementes de pitaiá vermelha em concentrações de sais e sacarose; 3) Multiplicação *in vitro* de brotos de pitaiá vermelha sob diferentes concentrações de BA (6-benziladenina) e 4) Alongamento e enraizamento *in vitro* de segmentos de pitaiá vermelha. A germinação *in vitro* de sementes de pitaiá ocorre na presença de luz em meio de cultura contendo 25% dos sais minerais do meio MS e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. A adição de 1,0 mg L<sup>-1</sup> BA no meio de cultura proporciona maior eficiência na fase de multiplicação. A utilização de 4,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB (ácido indolbutírico) promove o enraizamento *in vitro* de *Hylocereus undatus*.

**Termos para indexação:** *Hylocereus undatus*; fruticultura; luz; multiplicação; enraizamento.

### ABSTRACT

Red dragon fruit of white pulp (*Hylocereus undatus*), belonging to the Cactaceae family, is the most cultivated exotic species today. Characteristics such as sweet and soft flavor, firm pulp and full of seeds, have aroused interest in the producers because of their great acceptance in the consumer markets and the high value paid per kilo of the fruit. In order to optimize the protocol for micropropagation of pitaya, four experiments were performed: 1) *In vitro* germination of red dragon in the absence and presence of light; 2) *In vitro* germination of red pitaya seeds at concentrations of salts and sucrose; 3) *In vitro* multiplication of red dragon under different concentrations of BA and 4) *In vitro* elongation and rooting of red dragon segments. *In vitro* germination of red dragon seeds occurs in the presence of light in culture medium containing 25% of the mineral salts of the MS medium and 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose. Addition of 1.0 mg L<sup>-1</sup> BA (6-benzyladenine) in the culture medium provides greater efficiency in the multiplication phase. The use of 4.0 mg L<sup>-1</sup> IBA (indolbutyric acid) promotes the *in vitro* rooting of *Hylocereus undatus*.

**Index terms:** *Hylocereus undatus*; fruticulture; light; multiplication; rooting.

## INTRODUÇÃO

Existem várias espécies denominadas “pitaia”, pertencentes à família Cactaceae, dentre as quais podem ser citadas *Hylocereus undatus* (pitaia-vermelha de polpa branca), *Hylocereus costaricensis* (pitaia vermelha de polpa vermelha), *Selenicereus megalanthus* (pitaia amarela) e *Selenicereus setaceus* (pitaia do cerrado). A espécie mais cultivada atualmente é a *H. undatus*, a qual os frutos são bastante atrativos, de coloração vermelha, polpa firme esbranquiçada, com numerosas sementes pretas e sabor doce e suave. Essas características têm despertado interesse nos produtores por sua grande aceitação nos mercados consumidores. O alto valor pago pelo quilo da fruta

também constitui grande atrativo para o plantio dessa frutífera (Lopes et al., 2016).

No Brasil existem pequenas áreas de produção de pitaiá, situadas principalmente no estado de São Paulo, localizadas na região de Catanduva, e no Sul de Minas Gerais, na cidade de Três Pontas. Nessas regiões a produção dos frutos ocorre durante os meses de dezembro a maio (Bastos et al., 2006), ocorrendo aproximadamente cinco floradas neste período.

A propagação de pitaiá é comumente realizada por meio de sementes ou estaquia. No entanto, a propagação via semínifera é desaconselhável devido à juvenildade e a propagação vegetativa por estacas pode propagar doenças. Assim, a cultura de tecidos pode auxiliar na

Recebido em 23 de Novembro de 2016 e aprovado em 31 de Maio de 2017

<sup>1</sup>Universidade Federal de Lavras/UFLA, Lavras, MG, Brasil

<sup>2</sup>Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira/UNILAB, Redenção, CE, Brasil

\*Autor para correspondência: gabrielen@unilab.edu.br

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).

O sucesso da micropropagação pode estar relacionado a fatores genéticos, fisiológicos e ambientais como a luz, a presença e/ou concentração de sais minerais, açúcares ou tipos de meio de cultura, podendo influenciar na germinação de sementes. Tudo isso pode contribuir para a grande variabilidade nas respostas *in vitro*, levando a necessidade de se definirem protocolos diferenciados (Grattapaglia; Machado, 1998; Moraes et al., 2010).

A adição de uma fonte de carbono, a exemplo da sacarose, em qualquer meio nutritivo é essencial para a germinação, crescimento e desenvolvimento das espécies *in vitro* (Rêgo et al., 2009). A sacarose é considerada como fonte de energia para o crescimento da planta (Salles et al., 2006), e segundo Ferreira et al. (2002), a concentração de sacarose no meio de cultura normalmente varia de 20 a 40 g L<sup>-1</sup>.

Outro fator que é de extrema importância no meio de cultura e pode determinar o sucesso do cultivo *in vitro* é a concentração ideal dos fitorreguladores. A indução de brotações *in vitro* ocorre pelo desequilíbrio hormonal induzido por concentrações adequadas e balanceadas de fitorreguladores adicionados ao meio de cultura, como por exemplo as citocininas. Já o enraizamento é resultante da adição de auxinas no meio de cultura (Reis et al., 2008).

Para que a germinação possa se completar, as sementes podem também requerer luz, que é um fator ambiental. Para o início do processo de germinação, os sinais do ambiente são traduzidos em sinais internos na semente. Os sinais externos, ambientais, percebidos pelas sementes desencadeiam sinais internos em nível molecular, que podem induzir a ativação ou a inativação de compostos e/ou reações metabólicas diversas (Castro; Hilhorst, 2004; Costa; Marchi, 2008).

Ainda que existam trabalhos na literatura como o de Mohamed-Yasseen (2002), Menezes et al. (2012) e Hua et al. (2015) para o estudo de pitaia vermelha de polpa branca *in vitro*, o protocolo de propagação desta espécie ainda não está bem estabelecido. Dessa forma,

objetivou-se com este estudo otimizar o protocolo para micropropagação de pitaia vermelha, definindo o efeito da luz na germinação de sementes, a concentração dos sais minerais do meio de cultura e a concentração da sacarose, estabelecimento das concentrações necessárias de fitorreguladores para a multiplicação e enraizamento de segmentos de cladódios desta espécie, visando a produção de mudas de qualidade.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Germinação *in vitro* de pitaia vermelha na ausência e presença de luz

Sementes de pitaia vermelha de polpa branca (*Hylocereus undatus*) foram coletadas de frutos maduros, colhidos de plantas de quatro anos de idade, no pomar da Universidade Federal de Lavras.

Após separadas da polpa, as sementes foram submetidas ao procedimento de assepsia, que constituiu-se da imersão em água destilada, com duas gotas de tween 20 da marca Sigma® por 1 minuto, em seguida em álcool 70% v/v por 1 min e em hipoclorito de sódio 1% v/v por 20 min, sob agitação constante.

Em câmara de fluxo laminar, os agentes desinfestantes foram lixiviados por tríplice lavagem em água destilada estéril. Após assepsia, as sementes foram transferidas para tubos de ensaio de tamanho 200/25mm, contendo 15 mL de meio completo de cultivo MS (Murashige; Skoog, 1962), com adição de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 5,5 g L<sup>-1</sup> de ágar (HIMEDIA®). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C e 1,0 atm de pressão por 20 minutos. Foram utilizadas duas sementes por tubo de ensaio.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo dois tratamentos (ausência e presença de luz), com seis repetições, e cada repetição foi composta por três tubos. Os tratamentos condicionados à ausência de luz foram transferidos para sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e sem iluminação, e os tratamentos submetidos à presença de luz foram mantidos em sala de crescimento na mesma temperatura e irradiância média de 40,5 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> fornecida por lâmpadas fluorescentes branca fria. A irradiância foi medida fora do tubo de ensaio.

As avaliações de porcentagem de germinação foram realizadas aos 20, 40 e 60 dias após a inoculação das sementes. Plântulas malformadas foram contabilizadas na última avaliação aos 60 dias.

#### **Germinação *in vitro* de sementes de pitaia vermelha em concentrações de sais e sacarose**

As sementes de pitaia assépticas foram inoculadas em frascos contendo 50 mL de meio MS nas concentrações: 0, 25, 50, 100%; acrescido de 5,5 g L<sup>-1</sup> de ágar (HIMEDIA®) e 0, 10, 20, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C e 1,0 atm por 20 minutos.

Após a inoculação em câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas, os frascos foram vedados com tampas plásticas e mantidos em sala de crescimento na presença de luz (25 ± 2 °C, irradiância média de 40,5 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas) por 30 dias. A porcentagem de germinação foi avaliada aos 15 e 30 dias após a inoculação das sementes.

O delineamento foi inteiramente casualizado em fatorial 4 x 4, sendo quatro concentrações dos sais do meio MS e quatro doses de sacarose, totalizando 16 tratamentos, com cinco repetições, sendo cada repetição composta por cinco sementes.

#### **Multiplicação *in vitro* de brotos de pitaia vermelha sob diferentes concentrações de BA**

Como fonte de explantes foram utilizados segmentos de cladódios de 1,0 a 1,5 cm, oriundos da germinação *in vitro* de sementes de pitaia vermelha. Estes segmentos foram inoculados em frascos contendo 50 mL de meio de cultura. Utilizou-se o meio MS 25%, acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 5,5 g L<sup>-1</sup> de ágar (HIMEDIA®). O fator estudado foi a concentração de 6-benziladenina (BA) (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg L<sup>-1</sup>). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C e 1,0 atm por 20 minutos.

Após a inoculação, os explantes foram transferidos para sala de crescimento e mantidos sob condição de temperatura de 25 ± 2 °C, irradiância média de 40,5 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas. Após 60 dias foram avaliados número e comprimento de brotos (cm).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, totalizando 6 tratamentos com 5 repetições, sendo que cada repetição continha 3 explantes por frasco.

#### **Enraizamento *in vitro* de segmentos de pitaia vermelha**

Foram utilizados segmentos de cladódio, com 2,0 a 3,0 cm oriundos da germinação *in vitro* de sementes de pitaia vermelha. Estes segmentos foram inoculados em frascos contendo 50 mL de meio de cultura. Utilizou-se o meio MS 25%, acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 5,5 g L<sup>-1</sup> de ágar (HIMEDIA®). O fator estudado foi a concentração de ácido indolbutírico (AIB) (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C e 1,0 atm de pressão por 20 minutos. Após a inoculação os explantes foram transferidos para sala de crescimento e mantidos à temperatura de 25 ± 2 °C, irradiância média de 40,5 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas.

As avaliações foram realizadas aos 7, 14, 21 e 28 dias para número de raízes. Aos 28 dias foram avaliados o comprimento da maior raiz (cm) e o comprimento da parte aérea (cm).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, totalizando 5 tratamentos com 5 repetições, com 5 explantes por frasco.

#### **Análise estatística**

Os dados foram submetidos aos testes de Lilliefors e Bartlett para verificação da normalidade dos dados e homogeneidade de variância entre os tratamentos. Em seguida, foram submetidos à análise de variância (ANAVA), e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidades de erro, ou análise de regressão de acordo com as análises e ajuste dos dados. Todas as análises foram realizadas utilizando o software estatístico SISVAR (Ferreira, 2014).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **Germinação *in vitro* de pitaia vermelha na ausência e presença de luz**

A luz influenciou positivamente a germinação de sementes de pitaia. Maior porcentagem de germinação foi observada aos 20, 40 e 60 dias na presença de luz (Tabela 1).

Na ausência de luz a porcentagem de germinação das sementes de pitaia foi baixa e a porcentagem de plântulas anormais foi elevada. Por meio dos resultados obtidos no primeiro experimento pode-se afirmar que a pitaia vermelha de polpa branca é caracterizada como uma

espécie fotoblástica positiva. Estudos sobre a influência da luz na germinação de espécies de cactácea demonstram que a maioria delas apresentam fotoblastismo positivo, a exemplo de *Ferocactus peninsulæ* (Yang; Prritchard; Nolasco, 2003). Há alguns relatos de espécies fotoblásticas neutras, como *Neobuxbaumia macrocephala* (Ramirez-Padilha; Valverde, 2005) e *Pachycereus pecten-aboriginum* (Yang; Prritchard; Nolasco, 2003). Porém, não foram encontrados estudos relatando fotoblastismo negativo em espécies dessa família.

Tabela 1 – Germinação de sementes (%) e plântulas anormais (%) *in vitro* de pitáia vermelha (*Hylocereus undatus*) submetidas a presença e ausência de luz.

Tratamentos	Germinação (%)			Plântulas anormais (%)
	20 dias	40 dias	60 dias	60 dias
Presença de luz	19,04 a*	46,03 a	63,49 a	13,75 a
Ausência de luz	4,17 b	15,28 b	22,22 b	56,25 b

\*Médias com a mesma letra nas colunas não apresentam diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

#### Germinação *in vitro* de sementes de pitáia vermelha em concentrações de sais e sacarose

Houve diferença significativa entre os tratamentos, demonstrando que concentração dos sais do meio MS e

a concentração de sacarose influenciaram na germinação de sementes de pitáia.

Maior porcentagem de germinação de sementes de pitáia foi verificada com 25% de sais minerais do meio MS (Figura 1A). A maior concentração de sais e sacarose no meio de cultura pode diminuir o potencial hídrico, reduzindo a entrada de água na semente e consequentemente inibindo a fase I da germinação e a ativação das enzimas que irão hidrolisar as reservas para serem utilizadas no crescimento do eixo embrionário (Bewley, 1997).

Melhores índices de germinação de sementes (78,3%) foram obtidos com adição de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose ao meio de cultivo MS (Figura 1B), corroborando com os resultados encontrados por Mohamed-Yasseen (2002) e Menezes et al. (2012), os quais relatam a utilização de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose no meio de cultura MS para pitáia. No entanto, Rêgo et al. (2009) trabalhando com mandacaru (*Cereus jamacaru* P. DC.) verificaram que a concentração de 25 g L<sup>-1</sup> de sacarose foi mais eficiente na germinação de sementes desta espécie.

No presente trabalho não houve interação significativa entre os fatores estudados e os resultados significativos foram obtidos apenas para os efeitos isolados. Desta forma, é importante conhecer os fatores que afetam a germinação de sementes de cada espécie para se obter sucesso no processo de estabelecimento de plântulas *in vitro*.

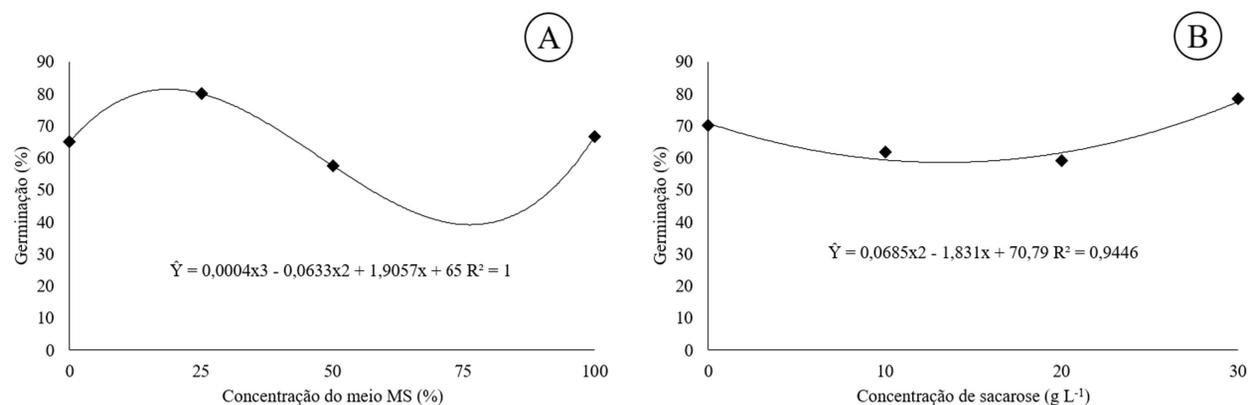


Figura 1 – A) Porcentagem de germinação de sementes de pitáia vermelha (*Hylocereus undatus*) em diferentes concentrações de sais minerais do meio MS e B) Porcentagem de germinação de sementes em diferentes concentrações de sacarose.

### Multiplicação *in vitro* de brotos de pitaia vermelha sob diferentes concentrações de BA

As concentrações de BA influenciaram significativamente na taxa de multiplicação de *H. undatus* para número médio de brotos por plântula (Figura 2A) e tamanho de brotos (Figuras 2 B). Observou-se diferença significativa para número médio de brotos por plântula, com melhor resposta na concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BA (12,2 brotos). Na ausência de BA observou-se maior comprimento de brotos (0,45 cm) (Figuras 2B). Segundo Grattapaglia e Machado (1998), o alongamento do broto pode ser inibido pelo efeito acumulativo do regulador de crescimento presente no meio, no caso o BA. O mesmo resultado foi observado por Rodrigues et al. (2013) trabalhando com indução de brotações *in vitro* da espécie *Physalis peruviana* L., onde verificaram maior comprimento de brotos na ausência do BA. Hua et al. (2015), pesquisaram vários tipos de reguladores de crescimento de plantas para determinar o mais eficaz para proliferação da parte aérea de pitaia. Estes

pesquisadores observaram que o BA sozinho é capaz de induzir múltiplos brotos, no entanto o melhor resultado foi obtido com a combinação de zeatina e BA no meio MS.

### Enraizamento *in vitro* de segmentos de pitaia vermelha

Houve diferença significativa entre os tratamentos, observou-se que a adição de auxina ao meio de cultura proporcionou incremento no enraizamento dos explantes, além de melhores resultados para o número de raízes (15,3) (Figura 3A), maior comprimento de raiz (2,9 cm) (Figura 3B) e comprimento da parte aérea (5,1 cm) (Figura 3C) com a utilização de 4 mg L<sup>-1</sup> de AIB.

Embora não sejam encontrados trabalhos com enraizamento *in vitro* de cactáceas testando apenas diferentes concentrações de AIB, Hua et al. (2015) trabalharam com protocolo *in vitro* para diferentes variedades de pitaia e observaram que o meio de cultura MS suplementado com 13,68 µM de zeatina e 2,46 µM de AIB foram adequados para a propagação e seleções de pitaia.

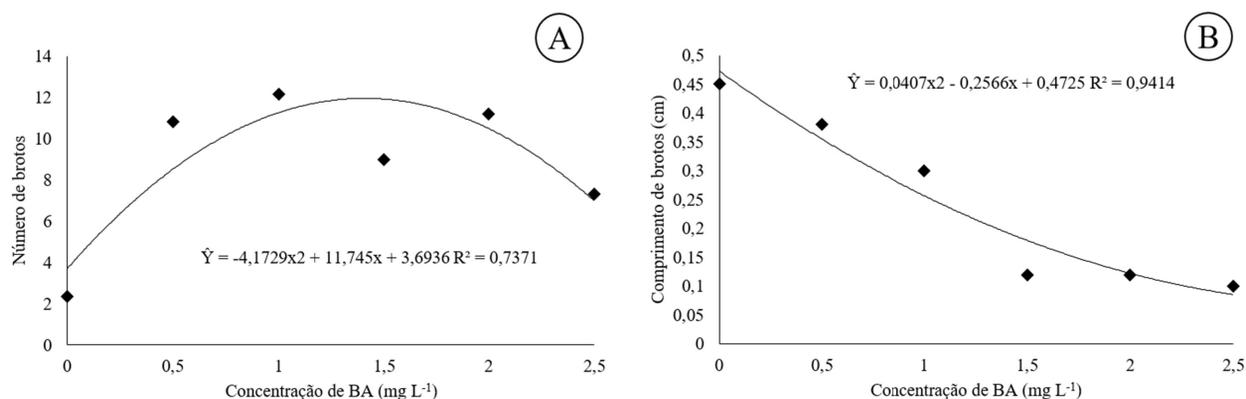


Figura 2 – A) Número de brotos formados em segmentos de cladódios de pitaia vermelha (*Hylocereus undatus*) e B) Comprimento de brotos em diferentes concentrações de BA.

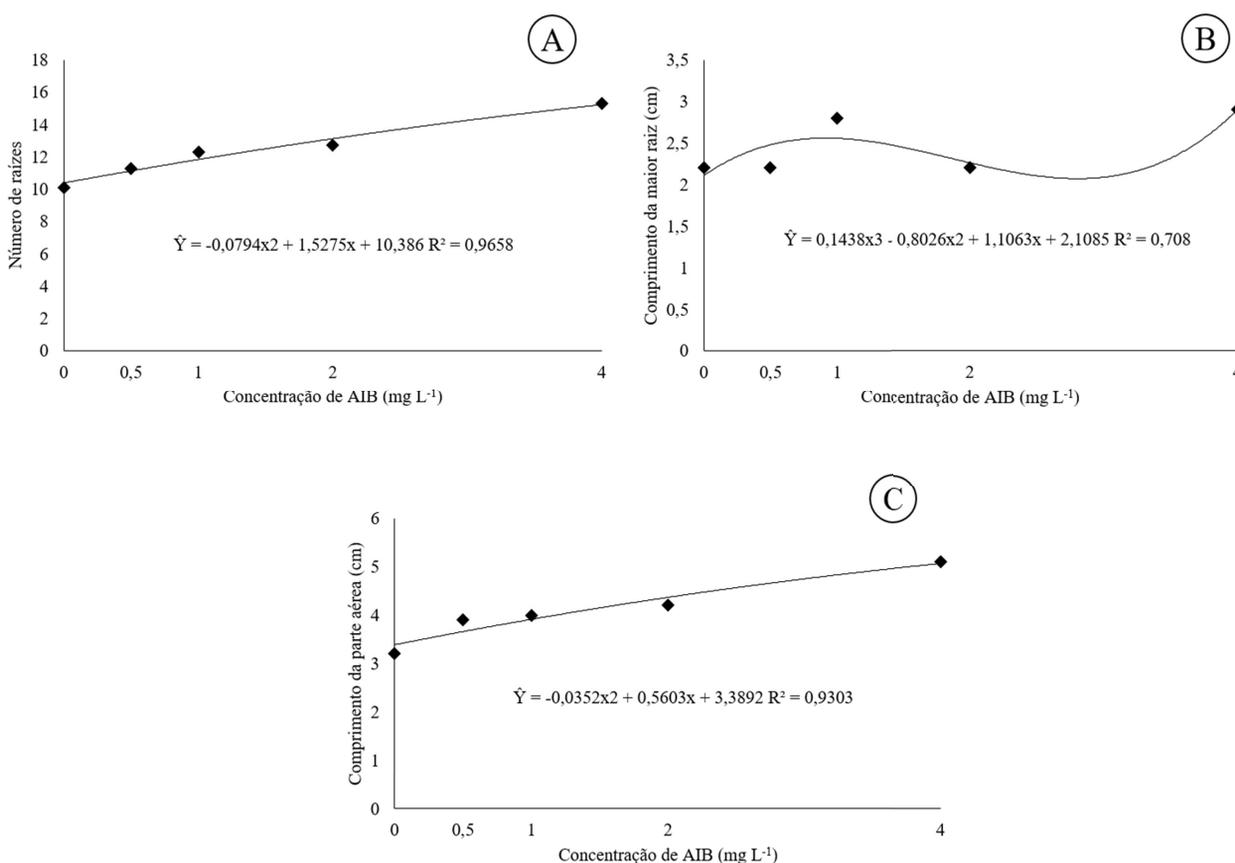


Figura 3 – A) Número de raízes formadas em segmentos de cladódios de pitaita vermelha (*Hylocereus undatus*), B) Comprimento da maior raiz e C) Comprimento da parte aérea em diferentes concentrações de AIB.

## CONCLUSÕES

A germinação *in vitro* de sementes de pitaita vermelha ocorre na presença de luz em meio de cultura contendo 25% dos sais minerais do meio MS e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose.

A adição de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BA no meio de cultura proporciona maior eficiência na fase de multiplicação *in vitro* de pitaita.

A utilização de 4,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB promove o enraizamento *in vitro* de *Hylocereus undatus*.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsas de estudos.

## REFERÊNCIAS

- BASTOS, D. C. et al. Propagação da pitaita vermelha por estaquia. **Ciência e Agrotecnologia**, 30(6):1106-1109, 2006.
- BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. **The Plant Cell**, 9:1055-1066, 1997.
- CASTRO, R. D.; HILHORST, H. W. M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação: Do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.149-162.
- COSTA, C. J.; MARCHI, E. C. S. Germinação de sementes de palmeiras com potencial para produção de agroenergia. **Informativo ABRATES**, 18(1/3):39-50, 2008.

- FERREIRA, D. F. Sisvar: A guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, 38(2):109-112, 2014.
- FERREIRA, M. G. R. et al. Resposta de eixos embrionários de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) à concentração de sais, doses de sacarose e renovação do meio de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 24(1):246-248, 2002.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica/Embrapa Hortaliças. 1998, p.183-260.
- HUA, Q. et al. A protocol for rapid *in vitro* propagation of genetically diverse pitaya. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 120(2):741-745, 2015.
- LOPES, C. A. et al. Indução de calos, potencial embriogênico e estabilidade genética em pitaya vermelha. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, 11(1):21-25, 2016.
- MENEZES, T. P. et al. Micropropagação e endorreducação em pitaya vermelha, *Hylocereus undatus* HAW. **Bioscience Journal**, 28(6):868-876, 2012.
- MOHAMED-YASSEEN, Y. Micropropagation of pitaya (*Hylocereus undatus* Britton et Rose). **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, 38(5):427-429, 2002.
- MORAES, C. F. et al. Germinação *in vitro* de sementes de alcachofra. **Horticultura Brasileira**, 28(1):65-69, 2010.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, 15:473-497, 1962.
- RAMIREZ-PADILHA, C. A.; VALVERDE, T. Germination responses of three congeneric cactus species (*Neobuxbaumia*) with differing degrees of rarity. **Journal of Arid Environments**, 61(2):333-343, 2005.
- RÊGO, M. M. et al. *In vitro* seed germination of mandacaru (*Cerus jamaru* DC.). **Revista Caatinga**, 22(4):34-38, 2009.
- REIS, E. S. et al. Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. **Revista Ceres**, 55(3):160-167, 2008.
- RODRIGUES, F. A. et al. Diferentes concentrações de sais do meio MS e BA na multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. **Bioscience Journal**, 29(1):77-82, 2013.
- SALLES, L. A. et al. Sacarose e pH na germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. **Ciência e Agrotecnologia**, 30(1):170-174, 2006.
- YANG, X.; PRRITCHARD, H. W.; NOLASCO, H. Effects of temperature on seed germination in six species of Mexican Cactaceae. In: SMITH, R. D. et al. **Seed conservation: Turning science into practice**. Royal Botanic Gardens: Corwell Press, 2003. p.575-588.

