

EFEITO DA SACAROSE E SORBITOL NA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE *Passiflora giberti* N. E. Brown¹

GLÁUCIA AMORIM FARIA²; MARIA ANGÉLICA PEREIRA DE CARVALHO COSTA³;
TATIANA GÓES JUNGHANS⁴; CARLOS ALBERTO DA SILVA LEDO⁴; ANTÔNIO DA SILVA SOUZA⁴

RESUMO - Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de um acesso de *Passiflora giberti* N. E. Brown. Para isso, foi instalado um experimento no delineamento inteiramente casualizado, em que foi comparado o tratamento-testemunha (MS padrão) com o meio MS suplementado com três concentrações de sacarose (0; 15 e 30 g L⁻¹) em combinação com três concentrações de sorbitol (10; 20 e 40 g L⁻¹). As avaliações foram realizadas aos 30; 60; 90 e 120 dias de incubação, observando-se o comprimento das brotações (cm), número de raízes, número e coloração das folhas. Os resultados mostram ser possível conservar sob crescimento lento, por quatro meses, microplantas de maracujazeiro em meio de cultura MS suplementado com 10 ou 20 g L⁻¹ de sorbitol, na ausência de sacarose, e mantidas sob condições de fotoperíodo de 16 h (22 μE m⁻²s⁻¹) e temperatura de 27 ± 1 °C. A sacarose promoveu maior desenvolvimento de microplantas. A rizogênese é afetada pelo sorbitol na concentração de 40 g L⁻¹ e pela ausência de sacarose no meio de cultura.

Termos para indexação: crescimento reduzido, fontes de carbono, passifloraceae.

SUCROSE AND SORBITOL EFFECT IN THE *IN VITRO* CONSERVATION OF *Passiflora giberti* N. E. Brown

ABSTRACT - This work objectified the study of sucrose and sorbitol effect in the *in vitro* conservation for *Passiflora giberti* N. E. Brown, access. Therefore, an experiment was conducted in a completely randomized design to compare control treatment (standard MS) to MS medium supplemented with three sucrose concentrations (0, 15 and 30 g L⁻¹) combined with three sorbitol concentrations (10, 20 and 40 g L⁻¹), in a total of 10 treatments with 20 replicas. The experiment evaluation was carried out at 30, 60, 90 and 120 days of incubation, whereas the height of shoots (cm), number of roots, number and color of leaves were observed. The results showed the possibility to maintain passion-fruit microplants for a four months period under slow growth in MS medium supplemented with 10 or 20 g L⁻¹ of sorbitol, without sucrose, and kept under 16 hours photoperiod (22 μ E m⁻² s⁻¹) and temperature of 27 ± 1 ° C. Sucrose sustained the longest development of the microplants. Root formation was affected by the sorbitol in the concentration of 40 g L⁻¹ and by the absence of sucrose in the culture medium.

Index terms: reduced growth, carbon sources, passifloraceae.

INTRODUÇÃO

As técnicas de conservação *in vitro* constituem-se no cultivo das coleções em laboratório, pela cultura de tecidos (Nass, 2001). Esta estratégia possibilita a manutenção de um grande número de acessos num pequeno espaço físico e livre das intempéries e riscos que existem no campo, reduz os custos, garante a manutenção da fidelidade genética, facilita a disponibilidade de material para o melhoramento genético e o intercâmbio de germoplasma.

O crescimento lento tem sido utilizado com sucesso, principalmente para a conservação de meristemas e/ou ápices meristemáticos de muitas espécies, e consiste em reduzir drasticamente o metabolismo da planta, sem afetar sua viabilidade, pela indução de estresse osmótico, redução da intensidade de luz ou temperatura, acréscimo de retardantes de crescimento e/ou diminuindo a concentração dos componentes salinos e orgânicos do meio de cultura (Withers & Williams, 1998). Os agentes osmóticos, tais como manitol, sorbitol, sacarose, dentre outros, ao serem adicionados ao meio de cultura, atuam externamente, removendo o excesso da água intracelular, por gradiente osmótico, fazendo com que o crescimento da cultura ocorra de forma mais lenta (Dumet et al., 1993).

Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas como material vegetal gemas laterais de plantas de *Passiflora giberti* N. E. Brown, de um acesso do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical

cultivadas *in vitro*, no meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose (MS padrão).

Esses explantes foram inoculados em frascos tipo magenta® contendo 20 mL do meio de cultura MS padrão e em meio MS suplementado com a combinação de três concentrações de sorbitol (10; 20 e 40 g L⁻¹) e três concentrações de sacarose (0; 15 e 30 g L⁻¹). Os meios foram solidificados com phytigel® (0,2 g L⁻¹) e pH ajustado a 5,8. As culturas foram incubadas sob fotoperíodo de 16 h (22 μE m⁻²s⁻¹) e temperatura de 27 ± 1 °C.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 20 repetições, em esquema fatorial 3 × 3 + 1: três concentrações de sacarose, três concentrações de sorbitol, mais uma testemunha (MS padrão), totalizando 10 tratamentos: T1 = Testemunha (MS padrão); T2 = 0 g L⁻¹ de sacarose + 10 g L⁻¹ de sorbitol; T3 = 0 g L⁻¹ de sacarose + 20 g L⁻¹ de sorbitol; T4 = 0 g L⁻¹ de sacarose + 40 g L⁻¹ de sorbitol; T5 = 15 g L⁻¹ de sacarose + 10 g L⁻¹ de sorbitol; T6 = 15 g L⁻¹ de sacarose + 20 g L⁻¹ de sorbitol; T7 = 15 g L⁻¹ de sacarose + 40 g L⁻¹ de sorbitol; T8 = 30 g L⁻¹ de sacarose + 10 g L⁻¹ de sorbitol; T9 = 30 g L⁻¹ de sacarose + 20 g L⁻¹ de sorbitol, e T10 = 30 g L⁻¹ de sacarose + 40 g L⁻¹ de sorbitol. A parcela experimental foi representada por um frasco, contendo um explante.

As avaliações do experimento foram realizadas aos 30; 60; 90 e 120 dias de incubação, observando-se o comprimento das brotações (cm); número de folhas; número de raízes, e coloração das folhas. Para esta última variável, foi atribuída a seguinte escala de notas: 1- folhas totalmente verdes; 2- folhas verde-claras, e 3- folhas amareladas (início do secamento). A variável comprimento das brotações foi transformada para ln (x + 10) e, para as variáveis número de raízes e coloração das folhas foi utilizada a transformação de dados $\sqrt{x + 0,5}$,

¹ (Trabalho 179-2005). Recebido: 01-11-2005. Aceito para publicação: 30-05-2006.

² Professora da Faculdade de Ciência e Tecnologia Albert Einstein, Cruz das Almas, BA. Doutoranda em Agronomia da FEIS/UNESP, Av. Brasil, 56, CEP 15385-000, Ilha Solteira-SP. E-mail: glauciaamorim@yahoo.com.br.

³ Centro de Ciências Agrárias e Ambientais da UFBA, CEP. 44.380-000, Cruz das Almas-BA. E-mail: mapcosta@ufba.br

⁴ Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, CEP. 44.380-000, Cruz das Almas-BA, E-mail: tatiana@cnpmf.embrapa.br, ledo@cnpmf.embrapa.br, assouza@cnpmf.embrapa.br.

TABELA 1 - Contrastes entre a média dos tratamentos e a testemunha para as variáveis comprimento das brotações (CB), em cm, número de folhas (NF), número de raízes (NR) e coloração das folhas (CF).

Contraste	CB	NF	NR	CF
T2 – T1	-3,6938*	-1,8250*	-1,7000*	-0,3208
T3 – T1	-3,7916*	-2,0731*	-1,6545*	0,1408
T4 – T1	-3,7275*	-2,3125*	-1,7000*	-0,0708
T5 – T1	-0,7225*	-0,2375	-1,1375*	-0,3003*
T6 – T1	-2,3038*	-0,5750	-1,0125*	-0,3208*
T7 – T1	-3,5857*	-0,8592*	-1,7000*	0,0382
T8 – T1	-1,8225*	-0,2000	-1,2250*	-0,1988
T9 – T1	-2,1150*	0,1875	-0,7750*	-0,0377
T10 – T1	-3,6575*	-1,3375*	-1,6750*	0,3221

* significativo a 5 % de probabilidade, pelo teste de Dunnett. T1 = Testemunha (MS padrão); T2 = 0 g L⁻¹ de sacarose + 10 g L⁻¹ de sorbitol; T3 = 0 g L⁻¹ de sacarose + 20 g L⁻¹ de sorbitol; T4 = 0 g L⁻¹ de sacarose + 40 g L⁻¹ de sorbitol; T5 = 15 g L⁻¹ de sacarose + 10 g L⁻¹ de sorbitol; T6 = 15 g L⁻¹ de sacarose + 20 g L⁻¹ de sorbitol; T7 = 15 g L⁻¹ de sacarose + 40 g L⁻¹ de sorbitol; T8 = 30 g L⁻¹ de sacarose + 10 g L⁻¹ de sorbitol; T9 = 30 g L⁻¹ de sacarose + 20 g L⁻¹ de sorbitol, e T10 = 30 g L⁻¹ de sacarose + 40 g L⁻¹ de sorbitol.

visando ao atendimento das pressuposições da análise de variância. Foi aplicado o teste de Dunnett, a 5% de probabilidade, para a comparação da média dos tratamentos em relação à média da testemunha. Para a comparação das médias, foi aplicado o teste de Tukey, a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico SAS - Statistical Analysis System (SAS Institute, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve efeito significativo da interação sacarose x sorbitol e da interação tripla entre os fatores estudados para as variáveis número de raízes e número de folhas ($P \geq 0,05$), sendo que, para esta última variável, a interação sorbitol x avaliação também não foi significativa ($P \geq 0,05$). Para a coloração das folhas, só houve significância para sorbitol e a interação sacarose x avaliação ($P < 0,05$).

O crescimento e o desenvolvimento das microplantas foram influenciados significativamente pelos açúcares. Observa-se, pela

Tabela 1, que todos os tratamentos apresentaram comprimento das brotações e número das raízes menor que a testemunha ($P < 0,05$). Nos tratamentos com 0 g L⁻¹ de sacarose combinado com 20 g L⁻¹ de sorbitol e 0 g L⁻¹ de sacarose combinado com 40 g L⁻¹ de sorbitol, as microplantas apresentaram menor comprimento, número de folhas e número de raízes. O tratamento com 30 g L⁻¹ de sacarose e 20 g L⁻¹ de sorbitol promoveu a formação de maior número de folhas do que a testemunha, embora essa diferença não tenha sido significativa ($P > 0,5$). Os tratamentos com 20 g L⁻¹ de sorbitol, na presença de sacarose, foram os que induziram maior número de raízes. Os tratamentos 15 g L⁻¹ de sacarose, combinado com 10 e 20 g L⁻¹ de sorbitol, foram os que alcançaram os menores valores para coloração das folhas, indicando maior número de folhas verdes.

Na Tabela 2, observa-se que, para a variável comprimento das brotações, os menores valores foram obtidos com a utilização de 10 ou 20 g L⁻¹ de sorbitol na ausência de sacarose. Dentre as microplantas cultivadas nos tratamentos com utilização simultânea de sorbitol e sacarose, as supridas com 40 g L⁻¹ de sorbitol

TABELA 2 - Valores médios para comprimento das brotações (cm), número de folhas, número de raízes, coloração das folhas em função das concentrações de sacarose e sorbitol (g L⁻¹).

Sacarose	Sorbitol			Média
	10	20	40	
Comprimento das brotações				
0	1,2213 A b	1,1234 A b	1,1875 A a	1,1813 b
15	4,1925 A a	2,6113 B a	1,3293 B a	2,7404 a
30	3,0925 A a	2,8000 A a	1,2575 B a	2,3833 a
Média	2,8354 A	2,2536 B	1,2566 C	2,1182
Testemunha				4,9150
Número de folhas				
0	0,6875 A b	0,4394 A b	0,2000 A b	0,4425 b
15	2,2750 A a	1,9375 A a	1,6533 A a	1,9617 a
30	2,3125 AB a	2,7000 A a	1,1750 B ab	2,0625 a
Média	1,7583 A	1,7699 A	0,9957 B	1,6095
Testemunha				2,5125
Número de raízes				
0	0,0000 A a	0,0455 A b	0,0000 A a	0,0133 b
15	0,5625 AB a	0,6875 A a	0,0000 B a	0,4255 a
30	0,4750 AB a	0,9250 A a	0,0250 B a	0,4750 a
Média	0,3458 AB	0,5841 A	0,0085 B	0,4520
Testemunha				1,7000
Coloração das folhas				
0	1,0000 A a	1,4615 A a	1,2500 A a	1,2188 a
15	1,0204 B a	1,0000 B b	1,3590 A a	1,1163 a
30	1,1220 B a	1,2830 B ab	1,6429 A a	1,3115 a
Média	1,0571 B	1,1963 B	1,4648 A	1,2292
Testemunha				1,3208

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

apresentaram os menores comprimentos. Os meios de cultura suplementados com 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose, combinados com 10 e 20 g L⁻¹ de sorbitol, proporcionaram maiores comprimentos das brotações. Estes dados indicam que a presença da sacarose no meio de cultivo foi fundamental para manter o desenvolvimento das plantas.

Para a cultura de *Prunus cerasus* L., os açúcares sacarose, glicose, frutose e sorbitol favoreceram o crescimento quando as suas concentrações estavam entre 20 g L⁻¹ e 30 g L⁻¹ (Borkowska & Szczerba, 1991). Contudo, de acordo com George (1993), o sorbitol usualmente não é metabolizado pelas plantas, e sua atuação freqüentemente está relacionada em modificar o potencial osmótico do meio de cultura. De acordo com Mello et al. (2001), o sorbitol foi ineficiente para o crescimento *in vitro* de *Bauhinia forficata* L., *Curcuma zedoaria* e *Phaseolus vulgaris* L.

Com relação ao número de folhas emitidas, independentemente da concentração de sorbitol utilizada, os maiores valores foram obtidos quando se utilizou sacarose no meio. A maior concentração de sacarose, combinada com a adição de 40 g L⁻¹ de sorbitol, promoveu a formação de um menor número de folhas (Tabela 2).

Os tratamentos com sacarose no meio de cultivo favoreceram o desenvolvimento de raízes, com exceção daqueles combinados com 40 g L⁻¹ de sorbitol (Tabela 2). Santana (2003), estudando os fatores que afetam o enraizamento *in vitro* em brotações e estacas de *Annona glabra* L., verificou que os maiores percentuais de enraizamento ocorreram em meio de cultura suplementado com 20 g L⁻¹ de sacarose. Faria & Segura (1997) obtiveram altas taxas de enraizamento para espécie *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* em meio MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose. Veierskov et al. (1982) relatam que altas concentrações de carboidrato no meio de cultura têm um efeito negativo sobre o enraizamento, devido ao acúmulo de açúcar acima dos níveis fisiológicos nos tecidos.

Com relação à qualidade da microplanta, medida pela coloração das folhas, verificou-se que, na ausência de sacarose, não houve efeito das diferentes concentrações de sorbitol. Contudo, nas concentrações de 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose, as microplantas apresentaram o melhor vigor quando supridas com 10 e 20 g L⁻¹ de sorbitol.

Santana (2003), utilizando como fonte de carbono sacarose,

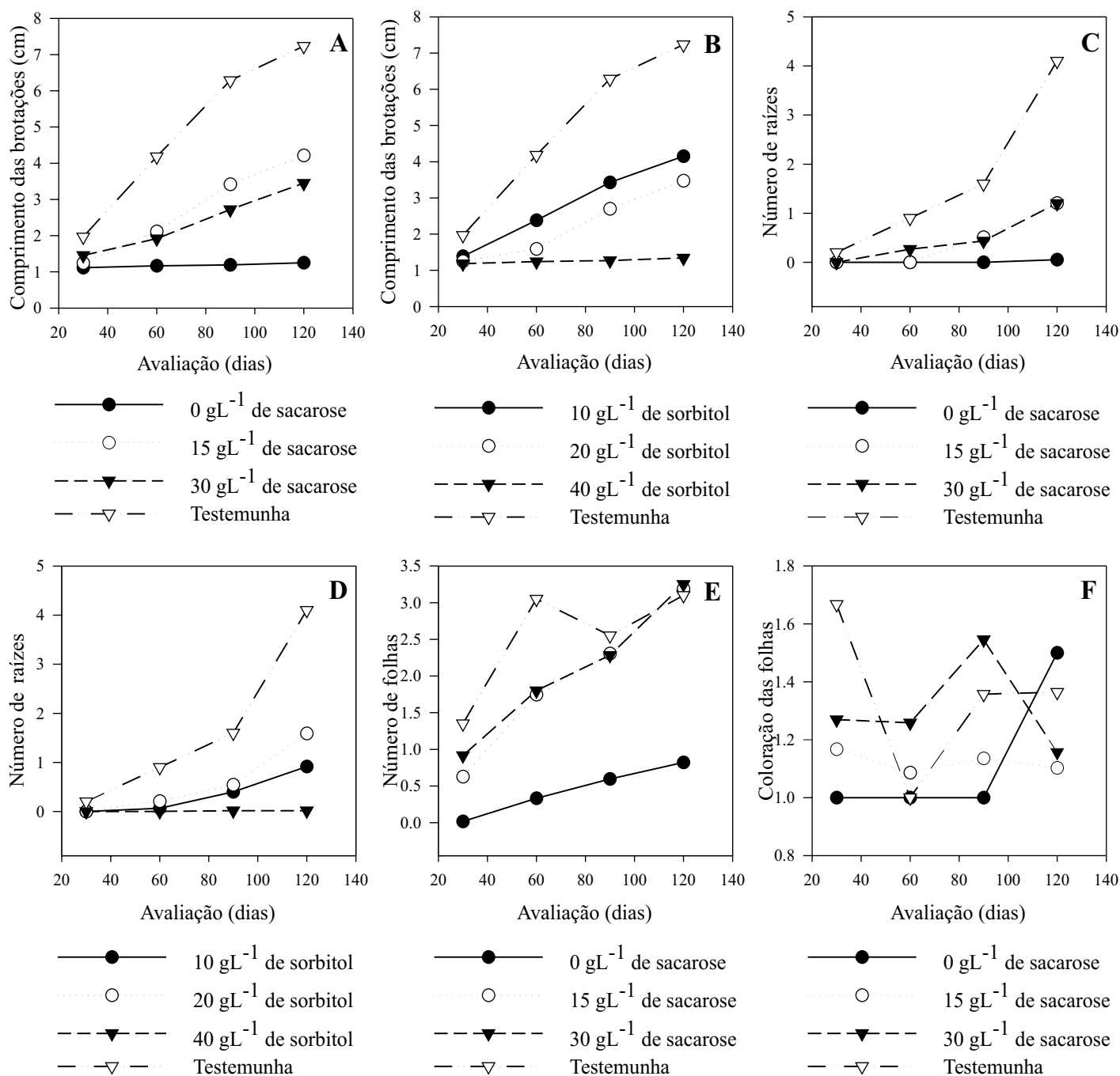


FIGURA 1 - Comprimento das brotações, em cm, em função das concentrações de sacarose (A) e de sorbitol (B); número de raízes em função das concentrações de sacarose (C) e de sorbitol (D); número de folhas (E), e coloração das folhas (F) em função das concentrações de sacarose, ao longo dos períodos de avaliação, em dias.

glicose, frutose, galactose, maltose e sorbitol no cultivo *in vitro* de Anonáceas, evidenciou que as menores taxas de desenvolvimento das microplantas ocorreu no tratamento com sorbitol. Al-Kharyri & Al-Bahirani (2002) relataram baixas taxas de desenvolvimento de calos de arroz na presença de 30 g L⁻¹ de sorbitol. Lemos & Baker (1998) verificaram que a maltose, sorbitol, frutose e polietileno glicol, adicionados ao meio de cultura, não favoreceram o desenvolvimento das brotações de gravioleira, enquanto a sacarose, galactose e glicose induziram a formação de brotações adventícias nos explantes. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), a sacarose é a fonte de carbono mais utilizada nos protocolos de cultivo *in vitro*, sendo considerada a melhor fonte para a diferenciação celular e o desenvolvimento das microplantas. Em geral, a concentração de 30 g L⁻¹ sustenta o desenvolvimento de brotações para a grande maioria das espécies já estabelecidas *in vitro*.

O tratamento-testemunha apresentou as maiores taxas de crescimento e desenvolvimento radicular com valores superiores aos demais tratamentos, ao longo dos 120 dias de avaliação (Figura 1). A utilização dos tratamentos com 0 g L⁻¹ de sacarose e de 40 g L⁻¹ de sorbitol promoveu as menores taxas de crescimento das brotações (Figura 1A e 1B) e as menores taxas de emissão de raízes (Figura 1C e 1D) e folhas (Figuras 1E).

As brotações oriundas do tratamento com 15 g L⁻¹ de sacarose praticamente mantiveram uniformidade na coloração das folhas, com a predominância de folhas verdes, enquanto no meio suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, aos 90 dias, predominaram folhas verde-claras e, a partir de então, houve predominância de folhas com coloração totalmente verde. Possivelmente, este fato tenha ocorrido devido à expansão de novas folhas. Comportamento contrário foi verificado na ausência de sacarose no meio (Figura 1F).

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram ser viável a manutenção de crescimento lento do maracujazeiro por um período de quatro meses.

CONCLUSÕES

1) É possível conservar sob crescimento lento, por quatro meses, microplantas de maracujazeiro em meio de cultura MS suplementado com 10 ou 20 g L⁻¹ de sorbitol, na ausência de sacarose.

2) É possível conservar sob crescimento reduzido com bom desenvolvimento radicular e número de folhas em meio de cultura MS suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose e 20 g L⁻¹ de sorbitol.

3) A sacarose promoveu maior desenvolvimento de microplantas.

4) A rizogênese é afetada pelo álcool açúcar sorbitol na concentração de 40 g L⁻¹ e pela ausência de sacarose no meio de cultura.

REFERÊNCIAS

AL-KHARYRI, J.M.; AL-BAHIRANI, A.M. Callus growth and proline accumulation in response to sorbitol and sucrose-induced osmotic stress in rice. **Biologia Plantarum**. Dordrecht, v. 45, n.4, p. 609 - 611, 2002.

BORKOWSKA, B.; SZCZERBA, J. Influence of different carbon sources on invertase activity and growth of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) shoot cultures. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 42, n. 240, p. 911-915, 1991.

DUMET, D; ENGELMANN, F.; CHABRILLANGE, N.; DUVAL, Y.; DEREUDDRE, J. Importance of source for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **Cryo-Letters**, London, n. 14, p. 243-250, 1993.

FARIA, J.L.C.; SEGURA, J. In vitro control of adventitious bud differentiation by inorganic medium components and silver thiosulfate in explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **In vitro cellular & developmental biology-plant**, Columbia, v. 33, n. 3, p. 209-212, 1997.

GEORGE, F.E. The components of culture media. In GEORGE, F.E. (Ed). **Plant propagation by tissue culture**. London: Exegetics, 1993. p. 273-343.

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

LEMO, E.E.P.; BAKER, D. Shoot regeneration in response to carbon source on internodal explants of *Annona muricata* L. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 25, p. 105-112, 1998.

MELLO, O.M.; DIAS, C.T.S.D.; AMARAL, A.F.C.; MELO, M. Growth of *Bauhinia forficata* Link, *Curcuma zedoaria* Roscoe and *Phaseolus vulgaris* L. cell suspension culture with carbon sources. **Sciencia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, n. 3, p. 1-11, sept. 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 437-497, 1962.

NASS, L.L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I. S. de, VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 30-55.

SANTANA, J.R.F. de. **Controle da morfogênese in vitro em algumas espécies de annonaceae**. 2003. 237f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SAS INSTITUTE. SAS/STAT User's Guide. v. 8.0. Cary NC: SAS Institute, 2000. v.1.

VEIERSKOV, B.; ANDERSEN, A.S.; ERIKSEN, E.N. Dynamics of extractable carbohydrates in *Pisum sativum*. 1- Carbohydrate and nitrogen content in pea plants and cuttings grown at two different irradiances. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 55, n.2, p. 167-173, 1982.

WITHERS, L.A.; WILLIAMS J.T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, C.A.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa - SPI: Embrapa, CNPq, 1998. v.1 p. 297-329.