

ESTABELECIMENTO DO CULTIVO *IN VITRO* DA ACEROLEIRA (*Malpighia emarginata* DC.)

NATONIEL FRANKLIN DE MELO¹
WAGNER YOSHIHIKO OKASAKI²
CRISTINO BEZERRA LEITE²
MIKLÓS FÁRI³

RESUMO - O trabalho teve como objetivo o estabelecimento do cultivo "in vitro" da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.), através da utilização de segmentos nodais provenientes de clones selecionados em programa de melhoramento genético da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA. Foram testados os genótipos IPA-2, IPA-3 e IPA-4a e três formulações de meios de cultura (MS, DKW e WPM), em delineamento fatorial inteiramente casualizado. Pela análise dos resultados, observaram-se diferenças significativas quanto ao número de brotações, (classificadas como tipo grande, tipo médio e tipo pequeno), em função dos

meios nutritivos. Neste caso, quando empregou-se o meio WPM, foi obtida uma média geral de 2,3 brotações do tipo grande por explante. Em relação ao fator genótipo, verificou-se uma melhor resposta da seleção IPA-3, principalmente com o meio WPM, obtendo-se 2,44 brotações por explante, e DKW, com 2,65. Os explantes cultivados em meio MS produziram maior quantidade de brotações pequenas, obtendo-se 1,66 brotações por explante no caso da seleção IPA-2. A concentração salina dos meios testados, principalmente a relação $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$, teve grande influência no desenvolvimento das brotações.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: Cultura de tecidos, sais minerais, micropropagação.

ESTABLISHMENT OF *IN VITRO* CULTURE OF BARBADOS CHERRY (*Malpighia emarginata* DC.)

ABSTRACT - The objective of the present work was the establishment of "in vitro" culture of nodal segments of barbados cherry clones (*Malpighia emarginata* DC.), obtained through the plant breeding program of the Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA. Three genotypes, IPA-2, IPA-3, IPA-4a, and three culture media, MS, DKW and WPM, were combined and tested in a completely randomised design. The results showed significant differences on shoot number (classified as big type, middle type and small type), in function of the culture media. In this

case, when WPM culture medium was used, 2.3 big type shoots per explant were produced. Regarding the genotype, the best response was obtained with the IPA-3 clone which produced 2.44 and 2.65 shoots/explant using WPM or DKW culture media, respectively. All explants cultured on MS medium produced mainly small shoots, with 1.66 shoot per nodal segment, in the case of the IPA-2 clone. According to our observations, the salt content of the culture medium, especially the ratio of $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$ strongly influenced shoot development.

INDEX TERMS: Tissue culture, mineral salts, micropropagation.

INTRODUÇÃO

A aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.) é uma planta arbustiva da família Malpighiaceae. Seus frutos são semelhantes aos da cereja européia, sendo bastante difundida graças ao elevado teor de ácido ascórbico (vitamina C). Em cada 100g de polpa, detecta-se de 2000 a 5000 mg da referida vitamina, valores esses cer-

ca de cem vezes maiores que os da laranja (*Citrus sinensis* Osbeck) e do limão (*Citrus* spp), os quais contêm cerca de 49 mg por cada 100 g de suco (Soave e Coelho, 1992).

O interesse comercial da acerola, desencadeado pelo aumento do consumo interno, abriu espaço para a expansão do seu cultivo, o que vem despertando grande interesse por parte dos institutos de pesquisa e universidades.

1. Pesquisador da EMBRAPA, Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semi-Árido, Caixa Postal 23, 56.300-000, Petrolina-PE. e-mail: natoniel@cpatsa.embrapa.br
2. Graduandos do Curso de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife-PE.
3. Pesquisador Visitante, EMBRAPA/CODEVASF/AGROINVEST, Agricultural Biotechnology Center, Gödöllő, Hungary.

Uma característica observada na cultura da acerola é a grande variabilidade genética constatada nos pomares, ocorrendo freqüentemente plantas com hábitos de crescimento diversificados, produzindo frutos qualitativa e quantitativamente heterogêneos. Desta forma, o fruticultor encontra dificuldades no planejamento das suas atividades, podendo enfrentar problemas, principalmente na hora da comercialização (Gonzaga Neto, Nunes e Amaral, 1993).

Considerando-se esses aspectos, recomenda-se a utilização de técnicas de multiplicação vegetativa (estaquia, enxertia e micropropagação), visando à conservação das características de uma planta-matriz selecionada, além de proporcionar maior precocidade na produção. A propagação sexuada, apesar de ser bastante empregada, apresenta alguns inconvenientes como: segregação de caracteres (responsável pela alta variabilidade genética entre plantas), longo tempo para produção e baixa taxa de germinação das sementes (Nilo Gonzalez, Pípolo e Malaguido, 1994).

Por outro lado, a micropropagação de plantas, como técnica de propagação assexuada, apresenta diversas vantagens, como maior controle sobre a sanidade do material propagado, possibilitando, ainda, a rápida multiplicação de variedades que apresentam poucos indivíduos (Villalobos e Thorpe, 1991). Outro fator importante para o sucesso do sistema de micropropagação é a conjugação de fatores nutritivos, ambientais e endógenos. No caso específico dos fatores ambientais, procura-se estudar os componentes do meio de cultura, como sais minerais, vitaminas, reguladores de crescimento, entre outros. Neste caso, diversas formulações de meios básicos têm sido utilizadas no estabelecimento do cultivo "in vitro". Embora não exista uma formulação padrão, o meio MS (Murashige e Skoog, 1962) desenvolvido para cultura de células de *Nicotiana*, suas modificações e diluições, tem apresentado resultados satisfatórios para diversas espécies. Entretanto, com espécies lenhosas, o meio MS não se mostrou satisfatório em alguns casos, observando-se que composições mais diluídas em macronutrientes tiveram melhor desempenho. Formulações especialmente desenvolvidas para espécies lenhosas como, por exemplo, o meio WPM (Lloyd e McCown, 1980), têm sido descritas e utilizadas freqüentemente como alternativa ao meio MS.

Desta forma, visando a estabelecer o cultivo "in vitro" da aceroleira, o trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento de três genótipos, sob três formulações de meios de cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Experimentos em delineamento inteiramente casualizado foram conduzidos durante o 1º semestre de

1996, testando-se, em fatorial completo, três genótipos de aceroleira em três meios nutritivos, totalizando 9 tratamentos com 25 repetições. A retirada dos explantes foi feita a partir de plantas matrizes (provenientes de estaquia), com seis meses de idade e mantidas em casa-de-vegetação. Os vasos com as plantas receberam aplicações periódicas duas vezes por semana, sobre as folhas e no substrato (areia, vermiculita, matéria orgânica, na proporção 1:1:1) de solução contendo 0,01% do inseticida e acaricida sistêmico Nuvacron [fosfato de cis (2-metil-carbamoil-1-metilvinil) dimetila], 0,5% do fungicida e bactericida sistêmico Kasumin (cloridrato de kasugamicina) e 0,01% do espalhante adesivo Extravon (alquil-fenol-poliglicoleter).

Os três genótipos utilizados - IPA-2, IPA-3 e IPA-4a - foram provenientes do Campo Experimental da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), em Ibimirim-PE, onde vem sendo realizado um trabalho de caracterização de linhagens de aceroleira.

Os três meios nutritivos testados foram: MS (Murashige & Skoog, 1962), DKW/Juglans (McGrannahan, Driver e Tulecke, 1987) e WPM (Lloyd e McCown, 1980), cujas formulações são mostradas na Tabela 1. Cada formulação foi suplementada ainda com 2,0 mg/L de glicina, 100,0 mg/L de *mio*-inositol, 30,0 g/l de sacarose, sendo os meios de cultura gelificados com 7,0 g/l de ágar. O pH dos meios foi ajustado para 5,9 antes da inclusão do ágar. Posteriormente, os meios foram distribuídos em alíquotas de 15 ml por tubo de ensaio e autoclavados a 121 °C, sob pressão de 1 kg/cm², durante 20 minutos.

Seções caulinares herbáceas contendo um nó (segmento nodal) foram utilizadas como explantes primários, os quais foram desinfestados inicialmente com uma lavagem rápida em água destilada contendo uma gota de detergente comercial, seguida de um enxágüe em água destilada. A seguir, foi realizada imersão dos explantes em álcool etílico, a 70% (v/v), durante um minuto, sendo, posteriormente, mergulhados em hipoclorito de sódio comercial (água sanitária), a 40% (v/v), durante 20 minutos e, finalmente, realizadas três lavagens em água autoclavada.

Em câmara de fluxo laminar, segmentos nodais (1,0 a 2,0 cm de comprimento) tiveram as extremidades distal e proximal cortadas em corte reto e em bisel, respectivamente. Em seguida, foram inoculados em tubos de ensaio (25 X 150 mm), os quais foram fechados com papel-alumínio e vedados lateralmente com filme transparente de PVC.

A incubação deu-se em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz, luminosidade de 2,5 Klux e temperatura de 25 ± 2 °C. Os experimentos foram avaliados 30 dias após a inoculação.

TABELA 1 - Composição dos meios MS (Murashige e Skoog, 1962), DKW (McGranahan, Driver e Tulecke, 1987) e WPM (Lloyd e McCown, 1980).

Componentes	MS	DKW	WPM
	mg/L (mM)	mg/L (mM)	mg/L (mM)
NH ₄ NO ₃	1650 (20,6)	1416 (17,68)	400 (4,9)
KNO ₃	1900(18,8)	-	-
H ₃ BO ₃	6,2 (0,1)	4,8 (0,078)	6,2 (0,1)
KH ₂ PO ₄	170 (1,25)	265 (1,95)	170 (1,25)
K ₂ SO ₄	-	1559 (8,96)	990 (5,69)
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	1967 (8,33)	556 (2,35)
KI	0,83 (0,005)	-	-
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25 (0,01)	0,39 (0,0156)	0,25 (0,01)
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025 (0,0001)	-	-
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440 (2,99)	149 (1,01)	96 (0,65)
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370 (1,5)	740,11 (3,0)	370 (1,5)
MnSO ₄ .H ₂ O	-	33,50 (0,19)	22,3 (0,13)
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,3 (0,13)	-	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6 (0,029)	-	8,6 (0,029)
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025 (0,0001)	0,25 (0,001)	0,25 (0,001)
NiSO ₄ .6H ₂ O	-	0,005 (0,00002)	-
Zn(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	-	17 (0,057)	-
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3 (0,1)	45,4 (0,12)	37,3 (0,1)
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,8 (0,1)	33,8 (0,12)	27,8 (0,1)
Tiamina . HCl	0,1 (0,0003)	2,0 (0,006)	1,0 (0,003)
Ácido nicotínico	0,5 (0,004)	1,0 (0,008)	0,5 (0,004)
Piridoxina . HCl	0,5 (0,0024)	-	0,5 (0,0024)

Os parâmetros observados foram: a percentagem de contaminação, a formação e localização de calos, o número total e o comprimento de brotações por explante. Quanto ao tamanho, as brotações foram classificadas em: pequenas (brotações iniciais, com gema axilar intumescida, mas sem folha visível), médias (entre 0,1 e 0,4 cm, com folhas não desenvolvidas) e grandes (a partir de 0,5 cm e com folhas).

Foi realizada a análise de variância para cada característica avaliada, aplicando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparação das médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Tabelas 2 e 3, observam-se os dados obtidos na avaliação feita 30 dias após a inoculação, relacionando-se o número de brotações com os respectivos meios de cultura. Observa-se que a média geral do número de brotações não foi significativamente diferente entre os meios. Entretanto, quando se analisa o número de brotações por tamanho, verifica-se que ocorreram diferenças significativas. A maior parte das brotações obtidas nos explantes inoculados foi do tipo grande, com percentuais variando entre 49,8% e 70,8%. Este último percentual foi obtido quando se utilizou o meio WPM, com 2,30 brotações por explante, sendo este meio também significativamente melhor nas brotações do tipo média. O maior número de brotações do tipo pequena foi observado no meio MS. Neste caso, foi obtido um percentual de 40,9%, com apenas 1,32 brotação por explante.

Do ponto de vista do fator genótipo, o IPA-3 foi o que teve melhor desempenho, seguido do IPA-4a e IPA-2. O meio WPM foi significativamente melhor entre os genótipos, levando-se em consideração o maior percentual do número de brotações consideradas do tipo grande.

Na quase totalidade dos explantes remanescentes, houve a iniciação de calos de consistência friável e coloração branca ou incolor, localizados na parte imersa no meio e/ou, principalmente, sobre o nó, embora não tenham se desenvolvido. Em relação à contaminação, inicialmente foi registrado um percentual entre 90% e 95%, sendo observado o desenvolvimento predominante de bactérias e, em menor escala, de fungos. Com o intensivo tratamento fitossanitário realizado nas plantas matrizes, esta contaminação ficou abaixo de 5%, permitindo, assim, a avaliação após seis repetições do experimento.

Por outro lado, comparando-se na Tabela 1, as composições salinas utilizadas, nota-se que as concentrações de NO_3^- e NH_4^+ são bastante variáveis. Neste caso, o meio MS é o mais concentrado em termos de macronutrientes, tendo uma concentração de 60 mM destes dois componentes, em relação a 52 mM observa-

da no meio DKW, e 14,68 mM no meio WPM. Vale salientar que, apesar do meio MS ser quatro vezes mais concentrado que o WPM, a relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, é de 1,94 nestes dois meios, sendo 1,91 no DKW.

Caldas, Haridasan e Ferreira (1990) discutem a utilização da forma inorgânica do nitrogênio sobre o crescimento e desenvolvimento de culturas de tecidos, destacando o nitrato como a melhor forma para algumas culturas, como cenoura, fumo, álamo, roseira, entre várias outras espécies. Por outro lado, a utilização de nitrogênio somente na forma amoniacal causa sintomas de toxidez às células e tecidos vegetais, devendo-se utilizar, no cultivo "in vitro", uma combinação das duas formas de nitrogênio (Sargent e King, 1974).

Lunsden, Pryce e Leifert (1990) também demonstram diferentes necessidades de nutrientes na absorção "in vitro" em culturas de *Hemerocallis* e *Delphinium*, relacionando ainda o número de explantes por recipiente de cultura e a percentagem de nutriente absorvida, destacando a influência do espaço de tempo em cultura. Mercier e Kerbauy (1991), por sua vez, verificaram o efeito da fonte de nitrogênio sobre o desenvolvimento de *Epidendrum fulgens* Brongn. Neste caso, a forma e a concentração do nitrogênio tiveram uma influência significativa na síntese de citocininas endógenas, resultando em diferentes padrões de crescimento vegetativo da espécie estudada. No caso da aceroleira, uma outra diferença entre os meios utilizados é a concentração de SO_4^- nos meios WPM e DKW ser cerca de quatro a sete vezes menor do que no meio MS. Vale salientar que, apesar de ser absorvido ativamente, o enxofre na forma de sulfato é um dos principais componentes do meio de cultura, influenciando no metabolismo das células vegetais (Mengel e Kirkby, 1987). Outro fator observado foi o amarelecimento das folhas, principalmente no meio MS, provavelmente devido a um acúmulo de etileno nos recipientes de cultura, demonstrando indiretamente o estresse causado por este meio.

Finalizando, os resultados obtidos até o momento são um passo inicial no estabelecimento do cultivo "in vitro" da aceroleira, sendo necessários novos estudos com a utilização de reguladores de crescimento, visando uma maior eficiência na multiplicação e desenvolvimento da tecnologia de propagação desta espécie.

CONCLUSÕES

a) Os meios WPM e DKW favorecem um maior número de brotações, com tamanho a partir de 0,5 cm e com folhas, no cultivo "in vitro" dos genótipos IPA-2, IPA-3 e IPA-4a de aceroleira;

b) O genótipo IPA-3 possui maior potencial de multiplicação "in vitro" do que os genótipos IPA-2 e IPA-4a.

TABELA 2 - Valores médios para número e percentagem de brotações por tamanho, obtidas no cultivo “*in vitro*” de segmentos nodais de aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.), utilizando-se os meios WPM, DKW e MS

Meios	Brotações Grandes	Brotações Médias	Brotações Pequenas	Total (100%)
WPM	2,30 <i>a</i> (70,8%)	0,45 <i>a</i> (13,8%)	0,50 <i>c</i> (15,4%)	3,25 <i>a</i>
DKW	2,12 <i>a</i> (65,2%)	0,42 <i>b</i> (12,9%)	0,71 <i>b</i> (21,9%)	3,25 <i>a</i>
MS	1,61 <i>b</i> (49,8%)	0,30 <i>c</i> (9,3%)	1,32 <i>a</i> (40,9%)	3,23 <i>a</i>

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

TABELA 3 - Valores médios para número de brotações, por tamanho e por genótipo, obtidas no cultivo “*in vitro*” de segmentos nodais de aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.), utilizando-se os meios WPM, DKW e MS

Meios	Brotações Grandes			Brotações Médias			Brotações Pequenas		
	IPA-2	IPA-3	IPA-4a	IPA-2	IPA-3	IPA-4a	IPA-2	IPA-3	IPA-4a
WPM	2,17 <i>a</i>	2,44 <i>a</i>	2,29 <i>a</i>	1,06 <i>a</i>	0,00 <i>b</i>	0,32 <i>b</i>	0,00 <i>c</i>	0,86 <i>b</i>	0,68 <i>c</i>
DKW	2,02 <i>a</i>	2,65 <i>a</i>	1,70 <i>b</i>	0,40 <i>b</i>	0,00 <i>b</i>	0,88 <i>a</i>	0,80 <i>b</i>	0,64 <i>c</i>	0,71 <i>b</i>
MS	1,23 <i>b</i>	1,80 <i>b</i>	1,81 <i>ab</i>	0,40 <i>b</i>	0,23 <i>a</i>	0,27 <i>c</i>	1,66 <i>a</i>	1,18 <i>a</i>	1,14 <i>a</i>
Média	1,80 <i>B</i>	2,29 <i>A</i>	1,94 <i>B</i>	0,62 <i>A</i>	0,07 <i>C</i>	0,49 <i>B</i>	0,80 <i>C</i>	0,89 <i>A</i>	0,84 <i>B</i>

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

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Egídio Bezerra Neto da UFRPE (Universidade Federal Rural de Pernambuco), pelo envio do material e apoio na formação dos recursos humanos. À EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), à FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) e à CAPES (Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo financiamento deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p. 99-170.

GONZAGA NETO, L. G.; NUNES, R. F. M.; AMARAL, M. Q. G. **Introdução e avaliação de germoplasma de acerola na região do submédio São Francisco**. Petrolina: EMBRAPA-CPATSA, 1993. (Pesquisa em Andamento, 71).

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings of International Plant Propagators' Society**, Seattle, v.30, p.421-427, 1980.

LUNSDEN, P.J.; PRYCE, S.; LEIFERT, C. Effect of mineral nutrition on the growth and multiplication of “*in vitro*” cultured plants. In: NIJKAMP, H.J.J.; VAN DER PLAS, L.H.W.; VAN AARTRIJK, J. (eds.). **Progress in plant cellular and molecular biology**, London: Kluwer Academic, 1990, p.108-113.

- McGRANAHAN, G. H.; DRIVER, J. A.; TULECKE, W. Tissue culture of Juglans. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (eds.). **Cell and tissue culture in forestry**: Case histories: Gymnosperms, Angiosperms and Palms. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987, v.3, p. 261-271.
- MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. Nutrient uptake and assimilation. In: _____. **Principles of plant nutrition**. 4th Ed. Bern: International Potash Institute, 1987, cap.3, p.140-191.
- MERCIER, H.; KERBAUY, G.B. Effects of nitrogen source on growth rates and levels of endogenous cytokinins and chlorophyll in protocorms of *Epidendrum fulgens*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.138, p.195-199, 1991.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised method for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NILO GONZALEZ, M. G.; PÍPOLO, V. C.; MALAGUIDO, A. B. Influência da consistência física no enraizamento de estacas de aceroleira (*Malpighia emarginata*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 13., 1994, Salvador. **Resumos...** Salvador: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1994. p.80.
- SARGENT, P.A.; KING, J. Investigations of growth-promoting factors in conditioned soybean root cells and in the liquid medium in which they grow: ammonium, glutamine, and amino acids. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.52, n.7, p.1747-1755, july 1974.
- SOAVE, D.; COELHO, S. M. B. M. A acerola, boa fonte natural de vitamina C. **O Agrônomo**, Campinas, v.44, n.1, 2, 3, p.18-19, jan/dez 1992.
- VILLALOBOS, V. M.; THORPE, T. A. Micropropagación: concepto, metodología y resultados. In: ROCA, W. M.; MROGISNKI, L. A. (ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura**: fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT, 1991. cap.6, p.127-142.