

ESTABELECIMENTO E MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE PORTA-ENXERTOS DE *Prunus*¹

APARECIDO LIMA DA SILVA², MARCELO ROGALSKI³, LIZIANE KADINE ANTUNES DE MORAES⁴, CLAUDIA FESLIBINO⁵, LEANDRO CRESTANI⁶, MIGUEL PEDRO GUERRA⁷

RESUMO – A qualidade genética e sanitária das mudas é de fundamental importância para o sucesso da fruticultura moderna. Para o pessegueiro, a micropropagação vem permitindo a produção clonal massal de plantas, com matrizes e mudas de qualidade genética-sanitária comprovada. O presente trabalho objetivou avaliar a taxa de sobrevivência de explantes no estabelecimento *in vitro*, bem como avaliar o potencial de multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus*. Explantes constituídos por ápices caulinares e gemas laterais dos porta-enxertos Capdeboscq e GF677 e da seleção VP411 foram estabelecidos e multiplicados *in vitro* em meio de cultura de Lepoivre suplementado com BAP (0,5 mg.L⁻¹). A taxa média de sobrevivência para os porta-enxertos foi 62,9% para ápices caulinares e 58,8% para gemas laterais. Ápices caulinares e gemas laterais apresentaram 14,8% e 29,8% de contaminação, respectivamente. O genótipo afetou significativamente as taxas de multiplicação *in vitro*. Quanto ao número de brotos por explantes, o porta-enxerto Capdeboscq e a seleção VP411 foram superiores ao porta-enxerto GF677, resultando em 14,7; 16,0 e 10,5 brotos, respectivamente. Para a altura média dos brotos, os porta-enxertos Capdeboscq e GF677 foram superiores à seleção VP411 com 9,3; 8,9 e 7,8 mm, respectivamente. O porta-enxerto Capdeboscq foi superior ao porta-enxerto GF677 e à seleção VP411 na variável número de brotos >20 mm com 2,0; 1,3 e 1,0 brotos, respectivamente.

Termos para indexação: Pessegueiro, porta-enxertos, BAP, micropropagação, mudas.

IN VITRO ESTABLISHMENT AND MULTIPLICATION OF *PRUNUS* ROOTSTOCKS

ABSTRACT – The success of the modern fruit production depend on the genetic and sanitary quality of plants. For the peach tree culture, micropropagation techniques allow a mass clonal production with high genetic quality plants. The present study aimed to evaluate the explant survival rate during *in vitro* establishment period, as well as to evaluate the *in vitro* multiplication potential of *Prunus* rootstocks. Apexes and lateral buds of the rootstocks Capdeboscq and GF677 and of the selection VP411 were introduced *in vitro* in the Lepoivre's medium supplemented with BAP (0.5mg.L⁻¹). The mean values of explant survival for the rootstocks were 62.9% and 58.8%, for apexes and lateral buds, respectively. Cultures of apexes and lateral buds showed 14.8% and 29.8% of contamination, respectively. The genotype significantly affected the *in vitro* multiplication rates. The rootstocks Capdeboscq and GF677, and the selection VP411 showed multiplication rates of 14.7, 16.0 and 10.5 shoots/explant, respectively. As mean values for shoot height of the rootstocks Capdeboscq and GF677 and of the selection VP411, it was observed 9.3, 8.9 and 7.8 mm, respectively. The rootstock Capdeboscq showed superior values as regarded to the number of shoots >20mm as compared to rootstock GF677 and selection VP411 with values of 2.0, 1.3 and 1.0 of shoots, respectively.

Index terms: Peach tree, rootstock, BAP, micropropagation, plant stock.

INTRODUÇÃO

No Brasil e principalmente nas regiões Sul e Sudeste, a cultura do pessegueiro apresenta uma grande importância socioeconômica, ocupando uma área superior a 20 mil hectares, com uma produção estimada em 150 mil toneladas (Sachs & Campos, 1998). Os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina destacam-se como os maiores produtores do País com áreas de 11,9 e 4,5 mil hectares, respectivamente (Epagri, 2001).

Na cultura do pessegueiro, um sistema moderno e tecnificado é determinante para a qualidade dos frutos e para a obtenção de uma alta produtividade dos pomares. Neste contexto, a muda é um insumo básico de fundamental importância para o sucesso na atividade (Fachinello, 2000).

Contudo, o sistema de produção de mudas de pessegueiro no Sul do Brasil ainda repousa sobre o emprego de porta-enxertos obtidos de sementes da indústria de conserva, aspecto este que permite a ocorrência de misturas varietais e conseqüente desuniformidade de plantas, a morte precoce de plantas e a falta de uniformidade genética (Fachinello, 2000).

Na propagação vegetativa, via estaquia, a principal limitação é a baixa capacidade de enraizamento para a maioria das cultivares de pessegueiro, aliada ao forte efeito do genótipo, com resultados variáveis de acordo com as cultivares utilizadas (Fachinello et al., 1995; Rufato & Kersten, 2000).

A tecnologia de cultura *in vitro* tem permitido propagar espécies de difícil multiplicação, com obtenção de material de alta qualidade genética através da captura e fixação de ganhos genéticos a partir de genótipos superiores. Para o gênero *Prunus*, o sucesso no estabelecimento e na multiplicação *in vitro* foi descrito pôr vários autores (Hammerschlag, 1982; Pérez-Tornero & Burgos, 2000).

No Brasil, os trabalhos de micropropagação do gênero *Prunus*, especialmente para o pessegueiro, são relativamente escassos. Recentemente, Rodrigues et al. (1999) e Silveira et al. (2001) demonstraram as dificuldades em estabelecer e multiplicar *in vitro* porta-enxertos de *Prunus*.

No presente trabalho, foram estudados os fatores associados ao estabelecimento e multiplicação *in vitro* dos porta-enxertos Capdeboscq e GF677 e da seleção VP411, visando à propagação clonal.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Os porta-enxertos selecionados foram: a) Capdeboscq - *Prunus persica* (L.) Batsch é a cultivar mais utilizada no Sul do Brasil para a produção de mudas de pessegueiro e ameixeira; cultivar de ciclo tardio apresenta uma boa germinação das sementes; b) GF677 - *Prunus amygdalus* x *Prunus persica* possui como característica a robustez decorrente do vigor híbrido, bem como boa compatibilidade com ambas as

¹ (Trabalho 158/2002). Recebido: 26/09/2002. Aceito para publicação: 18/07/2003.

² Prof. Adjunto da Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Fitotecnia, C.P. 476, 88040-900, Florianópolis-SC, (48) 331-5330, alsilva@cca.ufsc.br.

³ Biólogo, Mestre, Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Fitotecnia, C.P. 476, 88040-900, Florianópolis-SC, (48) 331-5330.

⁴ Acadêmica em Agronomia da Universidade Federal de Santa Catarina, C.P. 476, 88040-900, Florianópolis-SC, (48) 331-5330, bolsista RHA/CNPq.

⁵ Acadêmica em Biologia da Universidade do Oeste de Santa Catarina, C.P. 187, 89560-000, Videira-SC, (49) 551-1422, bolsista RHA/CNPq.

⁶ Eng.º. Agr.º. Empresa Vitroplanta - Biotecnologia Ltda, C.P. 150, 89560-000, Videira-SC, (49) 566-2690, bolsista RHA/CNPq.

⁷ Professor Titular da Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Fitotecnia, C.P. 476, 88040-900, Florianópolis-SC, (48) 331-5330.

espécies e tem demonstrado ótimo potencial para a propagação comercial através da micropropagação; c) VP411 - é uma seleção de Capdeboscq, obtida pela Vitroplanta - Biotecnologia Vegetal Ltda (Videira/SC), e encontra-se em testes como porta-enxerto para a redução do porte e melhor qualidade dos frutos em ameixeira.

As plantas-matrizes destes porta-enxertos foram mantidas em casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia/CCA/UFSC e na Vitroplanta em Videira (SC).

Estabelecimento *in vitro*

Os experimentos de cultura *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal do Departamento de Fitotecnia/CCA/UFSC. Das plantas-matrizes foram coletados brotos com crescimento ativo, que foram seccionados em segmentos de três a quatro gemas e posteriormente submetidos ao seguinte processo de desinfestação: lavagem em água e detergente (10 gotas.L⁻¹ de Tween 20) e, posteriormente, sob agitação por 1 minuto em etanol 70%, 15 minutos em hipoclorito de sódio (1,25%) e, finalmente, em câmara de fluxo laminar, os explantes foram submetidos a três lavagens com água destilada autoclavada.

Os ápices caulinares e gemas laterais foram inoculados em tubos de ensaio (25x150mm) contendo 10 mL de meio de cultura composto de sais e vitaminas de Lepoivre (Quoirin et al., 1977), suplementado com sacarose (20g.L⁻¹), ágar (7g.L⁻¹) e 6-benzilaminopurina (BAP) (0,5mg.L⁻¹).

Após 30 dias, ápices caulinares e gemas laterais foram avaliados quanto ao índice de sobrevivência e contaminação.

Multiplificação *in vitro*

O material vegetal foi multiplicado, com subculturas a cada 21 dias, através de segmentos nodais com 1-2cm, desprovidos dos ápices caulinares, no mesmo meio de cultura citado anteriormente na fase de estabelecimento.

Na terceira subcultura *in vitro*, após 28 dias de cultivo, os dados referentes à multiplicação *in vitro* dos porta-enxertos Capdeboscq e GF677, e da seleção VP411 foram avaliados quanto ao número de brotos por explante, altura média das brotações (mm) e número de brotos >20mm por explante.

Condições de cultura *in vitro*

Para as diferentes fases, o pH do meio de cultura foi ajustado para 5,2-5,3 e todos os componentes do meio foram adicionados antes da autoclavagem a 121°C, durante 15 minutos. O material vegetal foi mantido em câmara de crescimento com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40-45µmol.m⁻².s⁻¹, fornecidas por lâmpadas fluorescentes brancas frias.

Análises estatísticas

Na fase de estabelecimento *in vitro*, os dados foram avaliados quanto às porcentagens de sobrevivência e contaminação. Para a fase de multiplicação *in vitro*, utilizou-se o delineamento experimental inteiramente ao acaso, com cinco explantes por repetição e cinco repetições por tratamento. Os dados de número de brotos por explante, altura média das brotações (mm) e número de brotos >20mm por explante foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e ao teste de separação de médias SNK (5%), de acordo com Sokal e Rohlf (1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estabelecimento *in vitro*

Os valores observados para os diferentes explantes no estabelecimento *in vitro* dos três porta-enxertos estão apresentados na Tabela 1. As porcentagens médias de sobrevivência de ápices caulinares e gemas laterais foram, respectivamente, de 62,9% e 58,8%. Estes resultados podem ser considerados eficazes para introdução *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* e estão entre os limites de sobrevivência (27% a 93%) obtidos por Hammerschlag (1982), no estabelecimento *in vitro* de 11 cultivares de pessegueiro.

Os explantes de ápices caulinares e gemas laterais apresentaram taxas de 14,8% e 29,8% de contaminação, respectivamente (Tabela 1). Verifica-se que estes índices foram inferiores a outros estudos já realizados. Rodrigues et al. (1999) obtiveram taxas de 50% a 95,8% de contaminação no estabelecimento *in vitro* de seis porta-enxertos de *Prunus*. Estes autores constataram maior contaminação de gemas laterais e um efeito significativo do genótipo na fase de estabelecimento *in vitro*. Hammerschlag (1982) observou maior ocorrência de contaminação (70%) em gemas dormentes, enquanto, para brotos com crescimento ativo, a taxa de contaminação foi de 27%, no estabelecimento *in vitro* de pessegueiro.

Pode-se destacar que a metodologia usada neste trabalho para introdução e estabelecimento *in vitro* com explantes originários de plantas-matrizes mantidas em casa de vegetação, com controle sanitário e nutricional, permitiu bons resultados no estabelecimento *in vitro* para o material estudado, apresentando baixos índices de contaminação por agentes patogênicos (Figuras 1a e b).

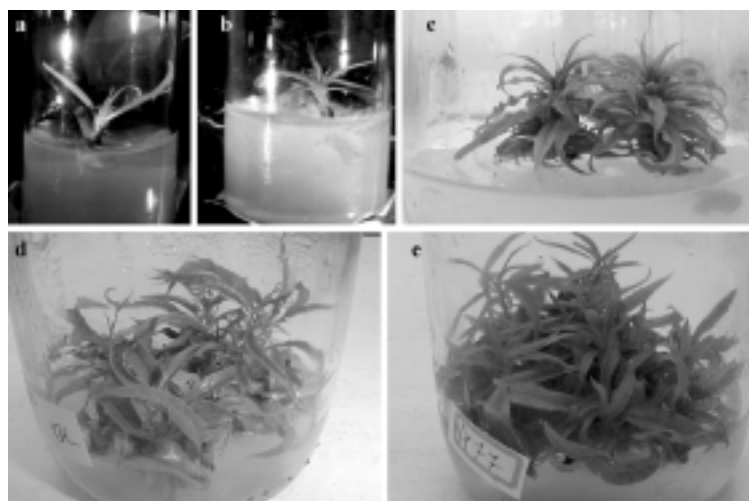


FIGURA 1 - Aspectos morfológicos no estabelecimento e multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus*. a) gema lateral. b) ápice caulinar. c) primeira subcultura. d) segunda subcultura. e) explante em multiplicação. UFSC, Florianópolis-SC, 2002.

Multiplificação *in vitro*

Já no primeiro subcultivo, observou-se que as culturas apresentaram alto potencial de multiplicação *in vitro* (Figura 1). O genótipo apresentou efeito altamente significativo em relação ao número de brotos, altura média dos brotos e ao número de brotos >20mm por explante.

Os porta-enxertos Capdeboscq e GF677 e a seleção VP411 pro-

TABELA 1 - Porcentagens de sobrevivência e contaminação observadas no estabelecimento *in vitro* dos porta-enxertos Capdeboscq e GF677, e da seleção VP411. UFSC, Florianópolis-SC, 2002.

Porta-enxertos	Total		Sobrevivência (%)		Contaminação (%)	
	Ápices caulinares	Gemas laterais	Ápices caulinares	Gemas laterais	Ápices caulinares	Gemas laterais
Capdeboscq	9	30	55,5	63,3	11,1	6,6
GF677	5	17	100,0	58,8	0,0	41,2
VP411	3	24	33,3	54,2	33,3	41,6
Total	17	71	62,9	58,8	14,8	29,8

duziram valores médios de 14,7; 10,5 e 16,0 brotos por explantes, respectivamente. O porta-enxerto Capdeboscq e a seleção VP411 não apresentaram diferenças significativas entre si para este parâmetro, mas foram significativamente superiores ao porta-enxerto GF677 (Figura 2). Estes resultados foram superiores aos obtidos por Parfitt e Almehti (1986), que avaliaram a multiplicação *in vitro* de 56 cultivares e observaram uma variação de 1,3 a 9,9 brotos por explante, com a utilização do meio de cultura AP suplementado com 6,0mg.L⁻¹ de BAP e 0,01mg.L⁻¹ de ácido indolbutírico.

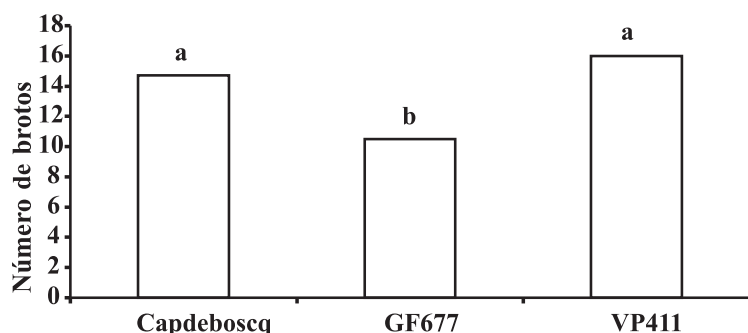


FIGURA 2 - Número de brotos por explante para os porta-enxertos Capdeboscq e GF677, e a seleção VP411, após 28 dias de cultura em meio de cultura de Lepoivre suplementado com BAP (0,5mg.L⁻¹). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.

No presente trabalho, a utilização do meio de cultura de Lepoivre mostrou-se adequada para a multiplicação dos genótipos estudados. Sabe-se que a constituição basal do meio de cultura, o tipo e a concentração dos reguladores de crescimento são fatores determinantes para a obtenção de altas taxas de multiplicação *in vitro*, em diferentes genótipos do gênero *Prunus* (Arena & Caso, 1992; Pérez-Tornero & Burgos, 2000; Pérez-Tornero et al., 2000).

Para a altura média dos brotos, os porta-enxertos Capdeboscq e GF677, com altura de 9,3 e 8,9 mm, respectivamente, apresentaram maior crescimento, diferindo significativamente da seleção VP411 com altura de 7,8mm (Figura 3). A altura média dos brotos é uma variável determinada principalmente pela concentração e tipo do regulador de crescimento (Harada & Murai, 1996; Leontiev-Orlov et al., 2000), meios de cultura (Arena & Caso, 1992; Pérez-Tornero & Burgos, 2000; Pérez-Tornero et al., 2000) e genótipo (Arena & Caso, 1992; Pérez-Tornero & Burgos, 2000).

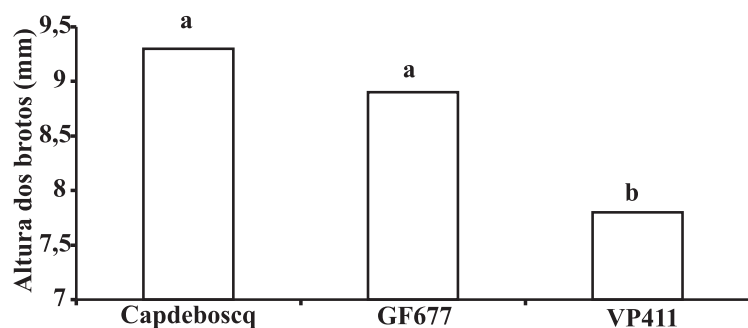


FIGURA 3 - Altura média dos brotos (mm), para os porta-enxertos Capdeboscq e GF677, e a seleção VP411, após 28 dias de cultura em meio de cultura de Lepoivre suplementado com BAP (0,5mg.L⁻¹). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.

Em relação ao número de brotos maiores que 20mm por explante, o porta-enxerto Capdeboscq resultou em 2,0 brotos, sendo significativamente superior ao porta-enxerto GF677 e à seleção VP411 com 1,3 e 1,0 brotos, respectivamente (Figura 4). Esta variável é de grande importância para a próxima fase da micropropagação, o enraizamento *in vitro*. Para Harada & Murai (1996) e Leontiev-Orlov et al. (2000), a obtenção de brotos aptos para o enraizamento, maiores que 20mm, tem sido difícil para algumas espécies do gênero *Prunus*. Entretanto, com resultados

similares ao observado neste trabalho, Arena & Caso (1992) e Pérez-Tornero et al. (2000) conseguiram obter com sucesso brotos com comprimentos adequados para o enraizamento *in vitro* de *Prunus*.

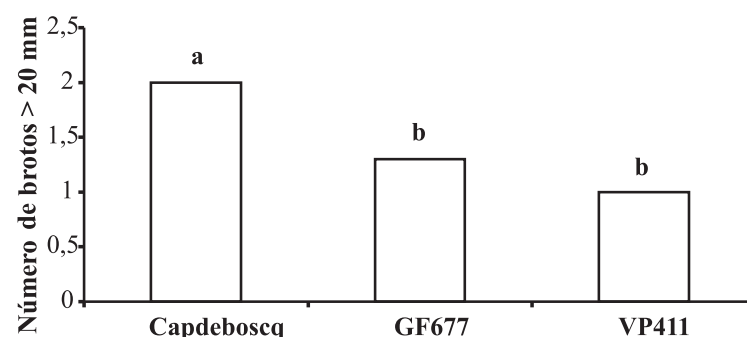


FIGURA 4 - Número de brotos >20 mm para os porta-enxertos Capdeboscq e GF677, e a seleção VP411, após 28 dias em meio de cultura de Lepoivre suplementado com BAP (0,5mg.L⁻¹). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.

Os resultados obtidos no presente trabalho também confirmaram uma resposta dependente do genótipo de porta-enxertos de pessegueiro, com respeito ao meio de cultura, como demonstraram Parfitt & Almehti (1986), Arena & Caso (1992) e Pérez-Tornero & Burgos (2000) para diversas prunáceas. Isto poderia ser atribuído à necessidade de diferentes níveis de reguladores de crescimento suplementados ao meio de cultura, bem como a possíveis interações entre os reguladores de crescimento e os sais presentes no meio de cultura (Pérez-Tornero & Burgos, 2000; Pérez-Tornero et al., 2000). Observa-se que algumas cultivares podem apresentar biossíntese diferencial de hormônios endógenos e/ou eficiência diferencial na absorção e metabolização dos compostos presentes no meio de cultura (Parfitt & Almehti, 1986). Associado a estes aspectos, os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que os porta-enxertos Capdeboscq e GF677 e a seleção VP411 podem ser eficientemente estabelecidos, multiplicados e mantidos *in vitro* no meio de cultura Lepoivre.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que o estabelecimento e a multiplicação *in vitro* dos genótipos selecionados de *Prunus* pode ser eficientemente realizado a partir de ápices caulinares e gemas laterais inoculados em meio de cultura de Lepoivre, suplementado com BAP (0,5mg.L⁻¹). A taxa de multiplicação *in vitro* foi de 14,7; 10,5 e 16,0 brotos/explante para os porta-enxertos Capdeboscq e GF677, e a seleção VP411, respectivamente. O porta-enxerto Capdeboscq foi superior para altura média das brotações e número de brotos >20mm por explante. Estes valores são considerados satisfatórios para o estabelecimento de um protocolo de micropropagação dos genótipos mencionados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARENA, M.E.; CASO, O.H. Factores que afectan la multiplicación *in vitro* de los brotes de portainjertos de *Prunus*, *PHYTON*, Buenos Aires, v.53, p.29-38, 1992.
- EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA S.A. Epagri. **Frutas de clima temperado**: situação da safra 1999-2000, Previsão da safra 2000/2001. Videira: Epagri, 2001. 21p.
- FACHINELLO, J.C. Problemática das mudas de plantas frutíferas de caroço. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE FRUTAS DE CAROÇO: PÊSSEGOS, NECTARINAS E AMEIXAS, 1., 2000, Porto Alegre. **Anais...** p.25-40.
- FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; FORTES, G.R. de L. **Propagação de plantas frutíferas de clima**

- temperado**. Pelotas-RS: Editora UFPel, 1995.178p.
- HAMMERSCHLAG, F. Factors affecting establishment and growth of peach shoots *in vitro*, **HortScience**, Alexandria, v.17, n.1, p.85-86, 1982.
- HARADA, H.; MURAI, Y. Micropropagation of *Prunus mume*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.46, p.265-267, 1996.
- LEONTIEV-ORLOV, O.; MOSSI, A. J.; CANSIAN, R.L.; ROGALSKI, M.; VENDRUSCOLO, T. Diferentes reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de ameixeira (*Prunus domestica* L.) cultivar Kantimirovskaja, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n.2, p.268-271, 2000.
- PARFITT, D.E.; ALMEHDI, A.A. *In vitro* propagation of peach: II. A medium for *in vitro* multiplication of 56 peach cultivars, **Fruit Varieties Journal**, v.40, n.2, p.46-47, 1986.
- PÉREZ-TORNERO, O.; BURGOS, L. Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.63, p.133-141, 2000.
- PÉREZ-TORNERO, O.; LÓPEZ, J.M.; EGEEA, J.; BURGOS, L. Effect of basal media and growth regulators on the *in vitro* propagation of apricot (*Prunus armenica* L.) cv. Canino, **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 75, n.3, p.283-286, 2000.
- QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P.; BOXUS, P. Un premier bilan de 10 années de recherches sur les cultures de méristèmes et la multiplication *in vitro* de fruitiers ligneux. **Comptes Rendus des Recherches Agronomiques**, Gembloux, p.93-117, 1977.
- RODRIGUES, A.C.; FACHINELLO, J.C.; STRELOW, E.; FORTES, G.R. de L. Estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* sp., **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.21, n.2, p.229-231, 1999.
- RUFATO, L.; KERSTEN, E. Enraizamento de estacas de pessegueiro (*Prunus persica* (L.) Batsch), cvs esmeralda e Br2, submetidas à estratificação e ao ácido indolbutírico, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.22, n.2, p.191-194, 2000.
- SACHS, S.; CAMPOS, A.D. O Pessegueiro, In: MEDEIROS, C.A.B.; RASEIRA, M.C.B. **A cultura do pessegueiro**. Pelotas: EMBRAPA-CPACT, 1998. p.13-19.
- SILVEIRA, C.A.P.; FACHINELLO, J.C.; FORTES, G.R. de L.; CITADIN, I.; RODRIGUES, A.C.; QUEZADA, A.C.; SILVA, J.B. da. Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos do gênero *Prunus* sob diferentes concentrações de BAP em dois meios de cultura, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.3, p.488-492, 2001.
- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**. New York: W.H. Freeman and Company, 1995.