

## CONCENTRAÇÕES DE 6-BENZILAMINOPURINA NO DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE EMBRIÕES DE PÊSSEGOS E NECTARINAS PRECOSES<sup>(1)</sup>

WILSON BARBOSA<sup>(2,3)</sup>, FERNANDO ANTONIO CAMPO-DALL'ORTO<sup>(2,3)</sup>  
e MÁRIO OJIMA<sup>(2)</sup>

### RESUMO

Objetivando melhorar o desenvolvimento in vitro de embriões de pêssegos e nectarinas, de maturação precoce, adicionou-se, em meio básico de cultura, o regulador de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP) nas concentrações de 0, 5, 10, 15 e 20 $\mu$ M. Esse meio consistiu na solução salina de Murashige & Skoog acrescido de tiamina, 1mg/l; ácido nicotínico, 0,5mg/l; inositol, 100mg/l, glicina, 250mg/l; glutamina, 500mg/l; asparagina, 250mg/l, ácido giberélico, 0,1mg/l; sacarose, 30g/l, e ágar, 6g/l. A melhor taxa de desenvolvimento dos embriões, após 30 dias de cultura, ocorreu nas concentrações de 5 e 10 $\mu$ M de BAP, com uma emissão média de 4,5 brotos por embrião. Nas concentrações de 15 e 20 $\mu$ M de BAP, o número de brotações foi maior, porém com menor aproveitamento, devido à presença dos sintomas indesejáveis de vitrificação. O BAP não eliminou, totalmente, a roseta e o ananismo fisiológico dos embriões.

Termos de indexação: pêssego, *Prunus persica*; nectarina, cultura in vitro de embrião, regulador de crescimento, vitrificação, vitropiantula, ananismo, melhoramento genético.

### ABSTRACT

#### IN VITRO EFFECTS OF 6-BENZYLAMINOPURINE (BAP) ON EARLY PEACH AND NECTARINE EMBRYOS DEVELOPMENT

Embryos of early peach and nectarine were cultured on Murashige and Skoog medium containing 3% sacarose, 0.6% agar and (in mg/liter) 1 thiamin, 0.5 nicotinic acid, 100 inositol, 250 glycin, 500 glutamin, 250 asparagin, 0.1

(<sup>1</sup>) Trabalho realizado com subsídios parciais do CNPq e da FAPESP. Recebido para publicação em 23 de abril e aceito em 10 de agosto de 1990.

(<sup>2</sup>) Seção de Fruticultura de Clima Temperado, Instituto Agronômico (IAC), Caixa Postal 28, 13001 Campinas, SP.

(<sup>3</sup>) Com bolsa de pesquisa do CNPq.

giberelic acid, and BAP at concentrations of 0, 5, 10, 15 and 20  $\mu\text{M}$ . The frequency of growth was as high as 100% when BAP was included in the medium. The best development of the embryos occurred with BAP rates of 5 and 10  $\mu\text{M}$ . At these concentrations of BAP, the mean number of adventitious shoots was 4.5 per embryo. The vitrification ratio was higher at concentrations of 15 and 20  $\mu\text{M}$ . The inclusion of BAP, consistently reduced but not fully eliminated the rosette and dwarf appearances in vitro plantules.

**Index terms:** peach, *Prunus persica*; nectarine, breeding, embryo culture, vitrification, vitro plantules, rosette, dwarf.

A cultura in vitro de embriões de pêssegos vem sendo utilizada há décadas no mundo, visando à obtenção de híbridos oriundos de cruzamentos envolvendo paternos de maturação precoce dos frutos. Os pessegueiros com tal característica genética são deficientes na alocação de nutrientes cotiledonares, o que causa baixa ou nula germinação das sementes (DAVIDSON, 1933; LAMMERTS, 1942; GILMORE, 1950; SMITH et al., 1969; BARBOSA et al., 1984). A cultura embrionária, neste caso, constitui eficaz ferramenta auxiliar de trabalho, possibilitando ao melhorista o resgate de inúmeros híbridos de interesse, para posterior seleção em campo.

Essa técnica de cultivo artificial de embriões imaturos é pesquisada no IAC desde o final dos anos setentas, objetivando apoiar os trabalhos de melhoramento genético do pêssego e nectarina da Seção de Fruticultura de Clima Temperado. Nesse período, houve muitas conquistas, principalmente no que concerne à germinação de sementes híbridas malformadas (BARBOSA et al., 1983, 1985) e à recuperação de vitroplântulas com anomalias fisiológicas (BARBOSA et al., 1989). Apesar dos bons resultados obtidos, constata-se a necessidade de pesquisas complementares, visando melhorar o desenvolvimento dos embriões e das vitroplântulas. Tem-se observado, em cultura de tecidos de *Prunus*, que as citoclininas, em especial a 6-benzilaminopurina (BAP), promovem excelente desenvolvimento em diversos tipos de explantes (LANE & COSSIO, 1986). Esse regulador de crescimento, associado às giberelinas, parece auxiliar na quebra da endodormência das sementes, resultando em plântulas normais (DIAZ & MARTIN, 1972). Daí, se empregados na cultura embrionária, poderiam proporcionar adequado desenvolvimento e eliminar as anomalias fisiológicas das plântulas, causadas pela ação dos inibidores de crescimento, presentes nos embriões (MONET, 1983; BARBOSA et al., 1987, 1990b). Sabe-se, no entanto, que o BAP, em concentrações inadequadas, pode ocasionar nos explantes in vitro excessiva calogênese e variados sintomas de vitrificação (JONES, 1967; JORDAN, 1980; PASQUALETTO et al., 1986; BARBOSA et al., 1990a).

## Material e Métodos

Os embriões utilizados na cultura in vitro foram extraídos de sementes de plantas F<sub>1</sub>, cultivadas na Estação Experimental de Jundiá e oriundas de

cruzamentos envolvendo pêssegos e nectarinas precoces, a seguir discriminados: IAC 185<sup>(4)</sup> (IAC N 679-1 x 'Josefina'); IAC 485 ('Josefina' x 'Centenária'); IAC 585 ('Josefina' x 'Jóia-1'); IAC 685 ('Centenária' x 'Tropical'); IAC 785 ('Centenária' x Fla. 7-3P); IAC 885 (IAC N 2080-72 x 'Precocinho'); IAC 985 (IAC N 2680-20 x Fla. 7-3P); IAC 1085 ('Dourado-1' x Fla. 7-3P); IAC 1385 (IAC N 2080-14 x 'Tropical') e IAC 1984 ('Jóia-2' x Fla. 7-3P).

No preparo dos embriões à cultura, empregou-se o método de SMITH et al. (1969) e de BARBOSA et al. (1985).

O meio básico de cultura foi composto de solução salina de MURASHIGE & SKOOG (1962); tiamina, 1mg/l; ácido nicotínico, 0,5mg/l; inositol, 100mg/l; glicina, 250mg/l; glutamina, 500mg/l; asparagina, 250mg/l; ácido giberélico, 0,1mg/l; sacarose, 30g/l, e ágar, 6g/l. A esse meio, adicionou-se o BAP nas concentrações de: 0, 5, 10, 15 e 20 $\mu$ M. Ajustou-se o pH a 6,0, com KOH a 0,1N, considerando-se uma acidificação da ordem de 0,3 após a autoclavagem do meio por 15 minutos a 171°C e 1,1kg/cm<sup>2</sup> de pressão. Utilizaram-se, por frasco de cultura, cerca de 12ml do meio.

Inocularam-se, ao acaso, em cultura, 100 embriões de cada material, com 20 repetições por tratamento, mantendo-os em sala de crescimento, com fotoperíodo de 20 horas e temperatura de 28  $\pm$  2°C. O meio foi renovado a cada 15 dias, com a mesma constituição inicial.

Após 30 dias de cultivo, avaliou-se o experimento através do número de brotos laterais emitidos pelos embriões e da porcentagem de vitroplântulas com sintomas de roseta, ananismo e vitrificação. O crescimento inicial do material foi avaliado depois do 10.<sup>o</sup> dia da inoculação in vitro.

## Resultados e Discussão

Com o emprego do BAP, obteve-se crescimento de 100% em todo o material pesquisado. Os embriões não submetidos ao BAP tiveram um crescimento médio de 80%, verificado após 10 dias da inoculação. A contaminação por fungos e bactérias foi, em geral, menor que 2%, não chegando a prejudicar demasiadamente o desenvolvimento do material afetado.

O crescimento inicial dos embriões não se alterou pelas concentrações de BAP. Crescimento visível foi verificado do 2.<sup>o</sup> ao 5.<sup>o</sup> dia, quando os cotilédones se tornaram fotossintetizantes, coincidindo com a emissão da radícula. O maior efeito de BAP foi notado logo após a primeira semana de cultivo. As gemas da base das folhas cotiledonares desenvolveram-se vigorosamente, originando brotações que não demoraram a se igualar, em tamanho, com o caule principal. Isso ocorreu na totalidade das linhagens. Em condições normais de germinação

(<sup>4</sup>) O(s) primeiro(s) número(s) refere(m)-se à identificação dos paternos e os dois últimos, ao ano do cruzamento.

(BARBOSA et al., 1986), essas gemas dos cotilédones raramente se desenvolvem, permanecendo latentes durante toda a ontogênese do pessegueiro.

Com 22 dias de cultivo *in vitro*, uma semana, portanto, após a renovação do meio, iniciou-se a emissão de brotos laterais das plântulas F<sub>2</sub>. Decorrido um mês nessas condições, as brotações já se multiplicavam progressivamente (Quadro 1).

Apesar de inferiores, as brotações verificadas nas concentrações de 5 e 10  $\mu$ M de BAP se apresentaram, em geral, com aspecto vegetativo mais adequado. Nas concentrações de 15 e 20  $\mu$ M, a taxa de multiplicação foi bem maior, porém ocorreram altas produções de calos na base das plântulas e sintomas de vitrificação nas brotações, reduzindo o número de propágulos aproveitáveis. Essas constatações confirmam os relatos de JONES (1967); JORDAN (1980); ZIMMERMAN (1984); PASQUALETTO et al. (1986); BARBOSA et al. (1990a).

Se, por um lado, as maiores concentrações de BAP aumentaram a porcentagem de vitrificação, por outro promoveram menores sintomas de anomalias fisiológicas (Figura 1), causadas pela presença de inibidores de crescimento (DIAZ & MARTIN, 1972; BONAMY & DENNIS, 1977). Essas anomalias se referem à roseta e ao ananismo, afetando a forma das folhas, tornando-as assimétricas, retorcidas e débeis, devido à redução unilateral de seu crescimento (FLEMION & BEARDOW, 1963; MONET, 1983; BARBOSA et al., 1989). As vitroplântulas anômalas foram recuperadas, de pronto, pelo método de despontagem apical, que elimina eficazmente tais sintomas *in vitro* (BARBOSA et al., 1989).

QUADRO 1. Efeito das concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), no número médio de brotos laterais, em plântulas F<sub>2</sub> de pêssegos e nectarinas precoces cultivados *in vitro* por 30 dias. Seção de Fruticultura de Clima Temperado, IAC, 1989

Material	Concentração de BAP ( $\mu$ M)				
	0	5	10	15	20
	nº				
IAC 185	1,4	3,4	6,5	8,0	11,0
IAC 485	1,5	4,1	8,8	9,5	12,5
IAC 585	0,0	3,9	4,9	6,7	10,9
IAC 685	0,4	4,0	5,1	8,6	10,2
IAC 785	0,2	4,2	5,9	6,8	9,2
IAC 885	0,6	5,0	6,2	7,5	12,0
IAC 985	1,5	4,8	6,8	8,4	9,4
IAC 1085	0,0	3,8	4,2	5,9	7,3
IAC 1385	1,2	4,6	6,2	7,9	9,7
IAC 1984	0,0	4,1	5,1	7,2	7,9

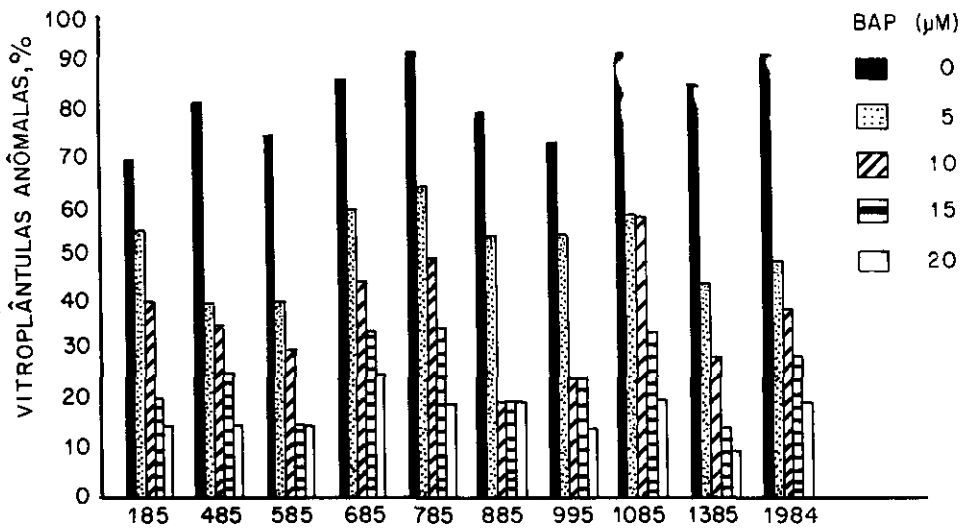


Figura 1. Porcentagem de vitroplântulas F<sub>2</sub> de linhagens de pêsegos e nectarinas com anomalias fisiológicas (roseta e ananism), com base nas concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). Seção de Fruticultura de Clima Temperado, IAC, 1989.

A melhor concentração de BAP, para o desenvolvimento dos embriões do material pesquisado, deve situar-se entre 5 e 10  $\mu\text{M}$ . A associação ao meio de cultura de 0,1mg de GA<sub>3</sub> não eliminou os sintomas fisiológicos comuns de insuficiência de frio das vitroplântulas F<sub>2</sub> (DONOHO & WALKER, 1957; BARBOSA et al., 1987, 1990b). Na tentativa de obtenção de vitroplântulas completamente normais de pessegueiro, nova combinação de GA<sub>3</sub> e de BAP deverá ser experimentada.

As brotações laterais que surgem da base dos cotilédones, ou do próprio caule das plântulas, aumentam a taxa de multiplicação vegetativa de genótipos de interesse para o melhoramento genético. Esses propágulos podem ser repicados e enraizados *in vitro*, para constituição das repetições clonais nos campos de seleção. Se cultivados, em parte, *in vitro*, garantem, por tempo indeterminado, o genótipo do material, sendo, portanto, outra maneira de manter o germoplasma.

### Agradecimentos

Os autores agradecem ao Técnico de Laboratório Onivaldo Camargo o preparo dos meios de cultura e a manipulação do material *in vitro*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, W.; CAMPO-DALL'ORTO, F.A. & OJIMA, M. Aspectos reprodutivos das fruteiras de clima temperado, objetivando o melhoramento genético. *O Agrônomo*, Campinas, 35:15-20, 1983.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Cultura de embriões in vitro para o melhoramento de pessegueiros precoces. *Bragantia*, Campinas, 44(1):465-472, 1985.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Eliminação de anomalias fisiológicas, in vitro, de plântulas de pessegueiro. *Bragantia*, Campinas, 48(1):13-19, 1989.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Relação entre precocidade de maturação e desidratação das sementes de pêssego. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 19(3):337-339, 1984.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_ & IGUE, T. Concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) na taxa de proliferação in vitro da macieira 'Gala'. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 25(5):747-751, 1990a.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; MARTINS, F.P. & RIGITANO, O. Emergência de plântulas do pêssego porta-enxerto 'Okinawa': influência de períodos de estratificação e de ácido giberélico. *Bragantia*, Campinas, 46(2):435-441, 1987.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; SAMPAIO, V. & BANDEL, G. *Ecofisiologia do desenvolvimento vegetativo e reprodutivo do pessegueiro em região subtropical*. Campinas, Instituto Agrônomo, 1990b. 37p. (Documentos IAC, 17)
- \_\_\_\_\_; TOMBOLATO, A.F.C.; CAMPO-DALL'ORTO, F.A.; OJIMA, M.; RIGITANO, O. & MARTINS, F.P. *Conservação de sementes de pêssegos para produção de porta-enxertos*. Campinas, Instituto Agrônomo, 1986. 12p. (Boletim Técnico, 104)
- BONAMY, P.A. & DENNIS JUNIOR, F.G. Abscisic acid levels in seeds of peach: II. Effects of stratification temperature. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, New York, 102(1):26-28, 1977.
- DAVIDSON, O.W. The germination of "now-viable peach seed". *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, Ithaca, 30:129-132, 1933.
- DIAZ, D.H. & MARTIN, G.C. Peach seed dormancy in relation to endogenous inhibitors and applied growth substances. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, New York, 97(5):651-654, 1972.
- DONOHO JUNIOR, C.W. & WALKER, D.R. Effect of gibberellic acid on breaking of rest period in Elberta peach. *Science*, Washington, D.C., 126(3284):1178-1179, 1957.
- FLEMION, F. & BEARDOW, J. Histological studies of physiologically dwarfed peach seedlings: I. Structure of anomalous leaves. *Contributions from Boyce Thompson Institute*, Yonkers, 22(3):117-131, 1963.

- GILMORE, A.E. A technique for embryo culture of peaches. *Hilgardia*, Berkeley, 20(8):147-170, 1950.
- JONES, O.P. Effect of benzyl adenine on isolated apple shoots. *Nature*, London, 215(5109):1514-1515, 1967.
- JORDAN, W.S. Immature embryo culture in the development of early ripening peach cultivars. *HortScience*, Alexandria, 15(3):284, 1980.
- LAMMERTS, W.E. Embryo culture an effective technique for shortening the breeding cycle of deciduous trees and increasing germination of hybrid seed. *American Journal of Botany*, Baltimore, 29(2):166-171, 1942.
- LANE, W.D. & COSSIO, F. Adventitious shoots from cotyledons of immature cherry and apricot embryos. *Canadian Journal Plant Science*, Ottawa, 66(4):953-959, 1986.
- MONET, R. *Le pêcher: génétique et physiologie*. Paris, INRA et Masson, 1983. 133p.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 15(3):473-497, 1962.
- PASQUALETTO, P.L.; ZIMMERMAN, R.H. & FORDHAM, I. Gelling agent and growth regulator effects on shoot vitrification of 'Gala' apple in vitro. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, New York, 111(6):976-980, 1986.
- SMITH, C.A.; BAILEY, C.H. & HOUGH, L.F. *Methods for germinating seeds of some fruit species with special reference to growing seedling from immature embryos*. New Jersey, Agricultural Experiment Station, 1969. 29p. (Bulletin, 823)
- ZIMMERMAN, R.H. *Apple*. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMMIRATO, P.V. & YAMADA, Y., eds. *Handbook of plant cell culture: v.2. Crops species*. New York, MacMillan, 1984. p.369-395.