

Tipos e concentrações de citocinina na multiplicação *in vitro* de pitangueira

Types and concentrations of cytokinin on *in vitro* multiplication of 'pitangueira'

Joseane Almeida de Souza^{I*} Márcia Wulff Schuch^{II} Lorena Pastorini Donini^I
Mirian de Farias Ribeiro^{II}

-NOTA-

RESUMO

O trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes tipos e concentrações de citocinina na multiplicação *in vitro* de pitangueira. Os tratamentos constituíram-se de diferentes concentrações de citocinina adicionada ao meio de cultura (zero; cinco; dez μM) e três diferentes citocininas (BAP; 2iP; zeatina). O meio utilizado foi WPM suplementado com 100mg L⁻¹ de mio-inositol, 30g L⁻¹ de sacarose e solidificado com ágar na concentração de seisg L⁻¹. Segmentos caulinares com três ou quatro gemas, sem o ápice, foram incubados em frascos contendo 30mL de meio. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento com 16 horas de fotoperíodo com radiação de 27 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de 25 \pm 2°C. Aos 45 dias de cultivo, foram avaliados o número médio de folhas, o número médio de brotações e o comprimento das brotações. Os resultados permitiram concluir que, para a multiplicação *in vitro* de pitangueira, deve-se utilizar a menor concentração de BAP, a qual apresentou resultado satisfatório e tem menor custo.

Palavras-chave: micropropagação, *Eugenia uniflora* L., frutas nativas.

ABSTRACT

This research aimed to assess the effect of different types (BAP, 2ip, zeatin) and concentrations (zero; five; ten μM) of cytokinin on *in vitro* multiplication of 'Pitangueira'. The different concentrations were added to the culture medium. The medium used was WPM enriched with 100mg L⁻¹ of myo-inositol, 30g L⁻¹ of sucrose and solidified with agar at sixg L⁻¹ concentration. Stem segments with 3 or 4 buds, without apical meristem, were incubated into flasks containing 30mL of medium. After inoculation, the explants were kept in growth room under 16 hours photoperiod with 27 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ radiation and temperature of 25 \pm 2°C. At 45th

days of cultivation, the average number of leaves and shoots and the shoot length were measured. The results showed that by using lesser concentration of BAP there was better performance and less costs for *in vitro* multiplication of 'Pitangueira'.

Key words: micropropagation, *Eugenia uniflora* L., native fruits.

O Brasil é um dos principais centros de diversidade genética de espécies frutíferas. No Sul do Brasil existe uma grande diversidade de fruteiras nativas, entre as quais se destaca a pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), pertencente à família Mirtáceas (RASEIRA et al., 2004). O potencial de utilização desta espécie é ressaltado quando se considera que o fruto de sabor exótico é rico em vitaminas, no entanto, a variabilidade genética pode determinar algumas diferenças nesses valores (BEZERRA et al., 2000).

Os principais métodos de obtenção de mudas desta espécie envolvem sementes, enxertia e estaquia, sendo que o processo mais usual é o realizado por meio de sementes. Em decorrência dessa prática, os pomares formados resultam em plantas desuniformes, de baixa produtividade e com frutos de má qualidade (BEZERRA et al., 2002; BEZERRA, et al., 2004). No entanto, (BEZERRA et al., 2000) afirmam que à medida que a pitangueira vai se tornando uma cultura de interesse comercial, o plantio a partir de sementes deve dar lugar à propagação vegetativa de variedades

^IPrograma de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fruticultura de Clima Temperado, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), CP 354, 96010-900, Pelotas, RS. E-mail: joseas@ufpel.tche.br.

*Autor para correspondência.

^{II}Departamento de Fitotecnia, FAEM/UFPEL, Pelotas, RS, Brasil.

selecionadas, assegurando a formação de pomares com populações de plantas homogêneas. O cultivo *in vitro*, por meio da micropropagação, é um método viável de propagação podendo assegurar a uniformidade dos pomares, além de possibilitar a produção de mudas com alta sanidade e acelerar os métodos de propagação convencional, por meio do rejuvenescimento *in vitro*.

Um dos objetivos da micropropagação é a maximização da multiplicação de gemas (ERIG et al., 2002), podendo ser alcançado na fase de multiplicação *in vitro*. Fatores como meio de cultura, tipo e concentração de citocininas são importantes de serem observados nesta fase (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). A citocinina é indispensável nesta fase para a quebra da dominância apical e a indução da proliferação de gemas axilares (HU & WANG, 1983). Segundo SCHUCH & ERIG (2005), as concentrações de citocininas para a multiplicação estão entre 0,1 e 5,0mg L⁻¹ e entre as citocininas comercialmente disponíveis a benzilaminopurina (BAP), geralmente apresenta melhores resultados.

A micropropagação de pitangueira é ainda incipiente. No entanto, alguns trabalhos iniciais apresentam suporte para otimização de protocolos de multiplicação desta espécie. OLIVIER (1997) observou que o meio MS com 100% dos seus sais e vitaminas adicionado de 1,2µM de BA e 0,3µM de ANA apresentou baixa taxa de multiplicação de pitangueira. SOUZA et al. (2007) concluíram que a utilização de explantes de 1,5cm de comprimento e a utilização de ágar como solidificante no meio de cultura proporcionou um maior estabelecimento *in vitro* desta espécie.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de diferentes tipos e concentrações de citocinina na multiplicação *in vitro* de pitangueira.

O trabalho foi realizado no Laboratório de Micropropagação de Plantas Frutíferas, Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas, RS. O material vegetal utilizado foram mudas de pitangueira, cedidas pela Embrapa-Clima Temperado. Segmentos caulinares com três ou quatro gemas (0,5 a 1,0cm), sem o ápice, provenientes de brotações de pitangueira cultivadas *in vitro*, foram utilizados como explante.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, no esquema fatorial 3 x 3 com quatro repetições por tratamento. Cada repetição composta de um frasco de 250mL com cinco explantes. Os tratamentos foram constituídos por diferentes concentrações de citocinina adicionada ao meio de cultura (zero; 5; 10µM) e três citocininas (6-Benzilaminopurina; Isopenteniladenina; zeatina), totalizando nove tratamentos.

O meio de cultura utilizado foi o WPM (LLOYD & MCCOWN, 1981), suplementado com 100mg L⁻¹ de mio-inositol, 30g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 6g L⁻¹ de ágar, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da inclusão do solidificante e, posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,5atm por 20 minutos. Foram utilizados frascos com 30mL de meio de cultura.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas diárias de luz, temperatura de 25±2°C e densidade de fluxo de fótons do período de luz de 27µmol m⁻² s⁻¹.

Aos 45 dias de cultivo, foram avaliados o número médio de folhas, o número médio de brotações e o comprimento das brotações. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan. Os dados de número médio de folhas e o número médio de brotações foram transformados segundo raiz quadrada de $x + 0,5$, em que x é o número obtido.

Para a variável número médio de gemas, houve efeito da concentração de citocinina, sendo que a ausência do fitoregulador foi inferior aos demais tratamentos (Tabela 1). Estes resultados estão de acordo com GRATTAPAGLIA & MACHADO (1998), que mostram que a adição de citocininas é favorável à multiplicação *in vitro* de algumas espécies. Também ALI & LÜDDERS (2001) observaram maior taxa de multiplicação, em explantes de *Psidium guajava* L., utilizando BAP na concentração de 2,2-4,4µM após quatro semanas de cultivo, comprovando a necessidade da adição de citocininas exógenas para a maioria das espécies.

Para a variável número médio das brotações, observou-se interação entre o tipo e a concentração de citocinina, sendo que a BAP apresentou os melhores resultados, seguida da zeatina e o 2iP apresentou os piores resultados (Tabela 1). Resultados semelhantes foram encontrados por ERIG et al. (2002), em que o maior número de brotações em explantes de amor-preta foi obtido com 2 e 4µM de BAP. Além disso CHAVES et al. (2005) verificaram maior número de brotações, em explantes de *Physalis peruviana* L. utilizando 1,3µM de BAP. BERTONI & BIRICOLTI (1996) observaram que ocorreu proliferação de parte aérea em *Feijoa sellowiana* (Berg.) quando adicionado BA ao meio de cultivo, mas não houve diferença no número de brotações quando utilizaram concentrações de 2,5 a 10,0µM de BA. MOHAMED-YASSEEN et al. (1995) obtiveram maior número de brotações em segmentos nodais de *P. guajava*, utilizando BA na concentração de 4,4µM. Esta diversidade de resultados está de acordo com CALDAS et al. (1998), os quais sugerem

Tabela 1 - Número médio de gemas e número médio das brotações em explantes de pitangueira após 45 dias de cultivo *in vitro* em meio WPM na presença de diferentes tipos e concentrações de citocinina. UFPel, Pelotas, RS. 2006.

Concentrações de citocininas (µM)	Nº médio de gemas	-----Nº médio de brotações-----		
		BAP	ZEATINA	2iP
Dez	3,96 a*	2,44 aA	1,80 aB	1,12 aC
Cinco	3,93 a	2,35 aA	1,53 aB	1,05 aC
Zero	3,24 b	1,20 bA	1,10 bA	1,19 aA

*Médias não seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas diferem entre si pelo teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade de erro.

que a composição e a concentração de hormônios no meio de cultura são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos.

Para a variável comprimento médio das brotações, não foi verificada diferença estatística para os fatores avaliados, verificando-se comprimento médio variando de 0,32cm a 0,45cm de acordo com os tratamentos.

Na multiplicação *in vitro* de pitangueira, deve ser utilizada a menor concentração da citocinina BAP, que apresentou resultado satisfatório e tem menor custo.

REFERÊNCIAS

ALI, M.A.; LÜDDERS, P. *In vitro* culture and its application on the cloning of guava (*Psidium guajava* L.). **Journal of Applied Botany**, Göttingen, v.75, p.164-167, 2001.

BERTONI, P.; BIRICOLTI, S. Preliminary observations on the *in vitro* behaviour of *Feijoa sellowiana* (Berg.) seedlings. **Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura**, Bologna, v.58, n.4, p.61-64, 1996.

BEZERRA, J.E.F. et al. **Pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 30p. (Série Frutas Nativas, 1).

BEZERRA, J.E.F. et al. Propagação de genótipos de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) pelo método de enxertia de garfagem no topo em fenda cheia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.1, p.160-162, 2002.

BEZERRA, J.E.F. et al. Comportamento da pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) sob irrigação na região do vale do rio moxotó, Pernambuco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.26, n.1, p.177-179, 2004.

CALDAS, L.S. et al. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p.183-260.

CHAVES, A.C. et al. Estabelecimento e multiplicação *in vitro*

de *Physalis peruviana* L. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.29, n.6, p.1281-1287, 2005.

ERIG, A.C. et al. 6-benzilaminopurina e ácido indolbutírico na multiplicação *in vitro* da amoreira-preta (*Rubus idaeus* L.), cv. Tupy. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.5, p.765-770, 2002.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p.183-260.

HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D.A. et al. **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. New York: Macmillan, 1983. p.117-227.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagator's Society**, v.30, p.421-327, 1981.

MOHAMED-YASSEEN, Y. et al. *In vitro* shoot proliferation and propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from germinated seedlings. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v.14, p.525-528, 1995.

OLIVER, J. J. Initiation of the Surinam cherry (*Eugenia uniflora*) in tissue culture. **Inligtingsbulletin Instituut vir Tropiese en Sbtropiese Gewasse**, n.295, p.5-6, 1997.

RASEIRA, M.C.B. et al. **Espécies frutíferas nativas do sul do Brasil**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. 122p.

SCHUCH, M.W.; ERIG, A.C. Micropropagação de plantas frutíferas. In: FACHINELO, J.C. et al. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2005. p.155-173.

SOUZA, J.A. et al. Solificante no meio de cultura e tamanho do explante no estabelecimento da propagação *in vitro* de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.13, n.1, p.115-118, 2007.