

# MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE PORTA-ENXERTOS DO GÊNERO *PRUNUS* SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP EM DOIS MEIOS DE CULTURA<sup>1</sup>

CARLOS AUGUSTO POSSER SILVEIRA<sup>2</sup>, JOSÉ CARLOS FACHINELLO<sup>3</sup>, GÉRSO RENAN DE LUCES FORTES<sup>4</sup>, IDEMIR CITADIN<sup>2</sup>, ALEXANDRE COUTO RODRIGUES<sup>2</sup>, ALBERTO CENTELLAS QUEZADA<sup>2</sup>, JOÃO BAPTISTA DA SILVA<sup>5</sup>

**RESUMO** - Este trabalho teve como objetivo determinar a melhor concentração de BAP (6-benzilaminopurina) e meio de cultura para a multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* sp., recentemente introduzidos no Brasil. Os porta-enxertos G x N<sub>22</sub>, GF 677, Mr.S 2/5, Marianna e Mirabolano foram testados em dois meios de cultura, meio MS e meio MS ¾ (reduzido em 25% dos sais do meio inteiro), combinados com quatro concentrações da citocinina BAP: 0,1; 0,3; 0,5 e 0,7 mg.L<sup>-1</sup>. Observou-se que os genótipos apresentaram comportamentos diferentes entre si em relação às concentrações de BAP e aos meios. Concluiu-se que, para os porta-enxertos G x N<sub>22</sub> e Mr.S 2/5, o melhor meio de multiplicação é o MS ¾ com BAP na concentração de 0,7 mg.L<sup>-1</sup>; para o porta-enxerto Marianna, o meio MS com BAP na concentração de 0,7 mg.L<sup>-1</sup>; para o porta-enxerto Mirabolano, o meio MS ¾ com BAP na concentração de 0,5 mg.L<sup>-1</sup>, sendo que, para este porta-enxerto, o BAP exerce efeito negativo sobre o tamanho das brotações, independentemente do tipo de meio. Já para o porta-enxerto G x N<sub>22</sub>, este efeito se fez notar apenas no meio MS. O porta-enxerto GF 677 não apresentou bons resultados na propagação *in vitro*.

**Termos para indexação:** citocinina; pessegueiro; cultura de tecidos

## *IN VITRO* MULTIPLICATION OF *PRUNUS* ROOTSTOCKS IN DIFFERENT BAP CONCENTRATIONS IN TWO CULTURE MEDIA

**ABSTRACT** - The purpose of this work was to determine the best BAP concentration and culture media for the *in vitro* multiplication of *Prunus* rootstocks starting from nodal segments. The rootstocks G x N<sub>22</sub>, GF 677, Mr.S 2/5, Marianna and Mirabolano were tested in two culture media (MS and MS ¾) combined with four BAP concentrations (0.1; 0.3; 0.5 and 0.7 mg.L<sup>-1</sup>). It was observed that the genotypes had different performance as the two media and BAP concentrations are concerned. BAP provided better results in the MS ¾ for the rootstocks G x N<sub>22</sub> and Mr.S 2/5. For 'Marianna', the best results were found in the MS at 0.7 mg.L<sup>-1</sup> BAP. 'Mirabolano', showed better results in the MS ¾ at 0.5 mg.L<sup>-1</sup> BAP and in the two tested media, the shoot length decreased with the increase for BAP. The rootstock G x N<sub>22</sub>, had the same effect only in the MS medium. The rootstock GF 677 didn't present good results in micropropagation.

**Index terms:** cytokinin, peach, tissue culture

### INTRODUÇÃO

Na multiplicação *in vitro*, os fatores concentração de citocinina e tipo de meio usado são extremamente importantes para obter bons resultados. Vários meios básicos têm sido utilizados na multiplicação de plantas, sendo que a maioria se baseia no meio MS (Murashige e Skoog, 1962). Modificações e diluições deste meio têm apresentado bons resultados para diversas espécies. Em 1974, Boxus e Quoirin (1974) deram início ao cultivo *in vitro* de espécies do gênero *Prunus*, através da cultura de meristemas. Logo após, Tabachnik e Kester (1977) realizaram os primeiros trabalhos de micropropagação de híbridos

de pessegueiro e amendoeira, a partir de gemas apicais. Na Itália, Zuccherelli (1979) deu início à multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de pessegueiro. Ainda na Itália, Marino (1982) realizou vários trabalhos visando a desenvolver protocolos de multiplicação *in vitro* de porta-enxertos híbridos de *Prunus*. Além do tipo de meio, outro aspecto importante na multiplicação *in vitro* está relacionado com o tipo de citocinina e sua concentração, sendo ambos determinantes no sucesso da multiplicação *in vitro* (Grattapaglia e Machado, 1998).

Este trabalho teve como objetivo estabelecer os melhores meios de cultura e concentração de BAP para a multiplicação de porta-enxertos do gênero *Prunus*.

<sup>1</sup> (Trabalho 001/2001). Recebido: 08/01/2001. Aceito para publicação: 31/07/2001. Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor junto ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fruticultura de Clima Temperado, FAEM-UFPEL/Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. E-mail: possers@ufpel.tche.br

<sup>2</sup> Pós-graduandos em Fruticultura de Clima Temperado, FAEM-UFPEL/Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.

<sup>3</sup> Prof. Dr. FAEM/UFPEL, Pelotas, RS.

<sup>4</sup> Prof. Dr., Pesquisador Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.

<sup>5</sup> Prof. Livre Docente, IFM/UFPEL, Pelotas, RS.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS. Os porta-enxertos utilizados foram: G x N<sub>22</sub>, GF 677, Marianna, Mirabolano e Mr.S 2/5. Os explantes (segmentos nodais) originaram-se de subcultivos anteriores do mesmo laboratório. O tamanho do explante variou de acordo com o porta-enxerto, ficando em torno de 5,0 mm e/ou 5 gemas. Foram usados dois meios de cultura, MS e MS ¾ (reduzido em 25% dos sais do meio inteiro), combinados com quatro concentrações da citocinina BAP (6-benzilaminopurina): 0,1; 0,3; 0,5 e 0,7 mg.L<sup>-1</sup>. A ambos os meios foram acrescidos 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 6,5 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 100 mg.L<sup>-1</sup> de mio-inositol. O pH foi ajustado para 5,8 antes da colocação do ágar. Os meios foram distribuídos em frascos de 250 mL com 8 cm de diâmetro. Em cada frasco, colocaram-se 30 mL de meio. Após, foram autoclavados à temperatura de 121 °C, durante 15 minutos. Em cada frasco, foram colocados 5 (cinco) explantes. Após a colocação destes, os frascos foram levados para sala de crescimento, sob condições de luz fluorescente, com intensidade de 20 µE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25±2°C, permanecendo nestas condições por período de 35 dias.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com 4 (quatro) repetições, sendo cada unidade experimental constituída de um frasco contendo 5 (cinco) segmentos nodais. O delineamento de tratamento foi um fatorial 2x4x5, sendo os fatores Meio de cultura (MS e MS ¾), Concentração de BAP (0,1; 0,3; 0,5 e 0,7 mg.L<sup>-1</sup>) e Porta-enxerto (G x N<sub>22</sub>, GF 677, Marianna, Mirabolano e Mr.S 2/5).

As variáveis analisadas foram: número de gemas e de brotações (transformadas segundo  $\sqrt{x+1}$  e  $\sqrt{x+0,5}$ , respectivamente), e tamanho das brotações (em mm). A análise estatística dos dados foi feita através da análise da variação e decomposição da variação para os fatores Meio e Porta-enxerto, pela comparação de médias através do teste de Duncan ( $\alpha = 0,05$ ), e Concentração de BAP, pela análise de regressão polinomial. O nível mínimo de significância adotado em todos os testes foi de 5%. As análises estatísticas foram executadas pelo programa SANEST - Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores (Zonta e Machado, 1984).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, são apresentados os resultados da variável número de gemas. No meio MS ¾, o porta-enxerto G x N<sub>22</sub> foi superior aos demais, enquanto no MS, o porta-enxerto Mirabolano foi melhor (o porta-enxerto G x N<sub>22</sub> foi o único que apresentou resposta significativamente superior em relação ao tipo de meio, preferindo aquele menos concentrado). Os meios baseados em formulações básicas diluídas têm possibilitado melhores resultados para a multiplicação das mais diversas espécies (Preece, 1995). Na Figura 1A, observa-se o comportamento do G x N<sub>22</sub> em função da concentração de BAP nos dois meios testados. No meio MS ¾, o número de gemas aumentou linearmente de acordo com o aumento de BAP, já no meio MS, as melhores respostas foram obtidas na concentração de 0,34 mg.L<sup>-1</sup>.

Os porta-enxertos responderam diferentemente às concentrações de BAP (Figura 1A-1F). De acordo com Zimmerman (1988), as necessidades das cultivares dentro de uma mesma espécie são diferentes, havendo necessidade de modificação do meio e doses de citocinina. O comportamento do porta-enxerto G x N<sub>22</sub> indica que meios ricos em sais dificultam a proliferação de gemas. Este fato se agrava ainda mais quando maiores concentrações de BAP forem adicionadas a meios desse tipo. O porta-enxerto Mirabolano não apresentou resposta significativa aos meios e às concentrações de BAP. Apesar disso, as melhores respostas da variável número de gemas foram observadas nas concentrações de 0,5 e 0,7 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, nos meios MS ¾ e MS, respectivamente.

Para o tamanho das brotações, observou-se diferença significativa apenas para o porta-enxerto G x N<sub>22</sub>, sendo que as melhores respostas foram obtidas no meio MS ¾ (Tabela 2). No meio MS, este mesmo porta-enxerto apresentou os maiores tamanhos de brotações nas menores concentrações de BAP (Figura 1E). Apesar disso, no meio MS ¾, o aumento da concentração de BAP não influenciou significativamente o tamanho das brotações (Figura 1E), indicando que, para esse genótipo, meios com sais reduzidos minimizam os efeitos negativos das citocininas. Tabachnik e Kester (1977) observaram que concentrações de 6-BA (6-benziladenina) de até 1,0 mg.L<sup>-1</sup> foram melhores para a multiplicação de híbridos de amendoeira e pessegueiro. Por outro lado, concentrações maiores inibiram a alongação das brotações, enquanto a concentração de 0,1 mg.L<sup>-1</sup> proporcionou o alongamento das brotações. Harada e Murai (1996), em trabalho com o *Prunus mume*, observaram, no entanto, que o tamanho das brotações não foi influenciado pelas concentrações de benziladenina de até 5 µM, sendo que a maior proliferação de gemas foi obtida nessa concentração. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), muitas vezes, concentrações crescentes de citocininas inibem o alongamento das brotações. Boxus (1986), por sua vez, observou que, além da redução na concentração de BAP no meio de multiplicação, é interessante limitar o número de subcultivos com o objetivo de minimizar os efeitos negativos das citocininas.

Os porta-enxertos Marianna, no meio MS, e Mr.S 2/5 tiveram comportamento semelhante, ou seja, à medida que aumentou a concentração de BAP, aumentou o número de gemas (Figura 1C e 1B, respectivamente). Marino (1982) observou que concentração de BAP de 1,0 mg.L<sup>-1</sup> possibilitou maiores taxas de multiplicação de *Prunus*, porém o tamanho das brotações foi muito pequeno, dificultando a separação das gemas. Analisando conjuntamente as variáveis número de gemas e tamanho das brotações, para os porta-enxertos G x N<sub>22</sub>, no meio MS, e Mirabolano, os resultados obtidos estão de acordo com Marino (1982). O porta-enxerto Mirabolano apresentou, no meio MS, as melhores respostas para o número de brotações, sendo significativamente superior aos demais (Tabela 3). A resposta do porta-enxerto Mirabolano indica um comportamento linear decrescente em função das concentrações de BAP (Figura 1D). Possivelmente, os teores endógenos de citocinina deste porta-enxerto sejam altos, o que, aliado às doses exógenas, contribuiu para o efeito decrescente desta variável. O efeito negativo do aumento de BAP também se fez notar na variável tamanho das brotações (Figura 1F). Em relação ao porta-enxerto GF 677, apesar de ser micropropagado comercialmente na Europa, apresenta uma

**TABELA 1** - Número médio de gemas de porta-enxertos de *Prunus* em dois meios de cultura. FAEM/UFPel - Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 1999.

P o r t a - e n x e r t o	M e i o s			
	M S ¾		M S	
G x N <sub>22</sub>	22,33	a A	16,15	b B
M i r a b o l a n o	19,30	b A	20,04	a A
M r . S 2/5	15,67	c A	14,56	b c A
M a r i a n n a	12,16	d A	13,44	c A
G F 677	10,57	d A	9,27	d A

Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas colunas, e maiúscula, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $\alpha = 0,05$ ).

**TABELA 2** - Tamanho médio das brotações (mm) de porta-enxertos de *Prunus* em dois meios de cultura. FAEM/UFPel - Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 1999.

P o r t a - e n x e r t o	M e i o s			
	M S ¾		M S	
G x N <sub>22</sub>	15,1	a A	12,9	a B
M i r a b o l a n o	11,6	b A	12,7	a A
M r . S 2/5	12,6	b A	12,7	a A
M a r i a n n a	9,9	c A	10,8	b A
G F 677	8,0	c A	6,9	c A

Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas colunas, e maiúscula, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $\alpha = 0,05$ ).

**TABELA 3** - Número médio de brotações de porta-enxertos de *Prunus* em dois meios de cultura. FAEM/UFPel - Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 1999.

P o r t a - e n x e r t o	M e i o s			
	M S ¾		M S	
G x N <sub>22</sub>	1,63	a b A	1,11	b B
M i r a b o l a n o	1,69	a A	1,68	a A
M r . S 2/5	1,37	b A	1,07	b B
M a r i a n n a	1,53	a b A	1,31	b A
G F 677	1,07	c A	1,06	b A

Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas colunas, e maiúscula, nas linhas, não diferem entre si pelo Teste de Duncan ( $\alpha = 0,05$ ).

taxa de proliferação muito baixa (Dimasi-Theriu & Economou, 1995). Estes autores, no entanto, conseguiram um elevado número de brotações deste porta-enxerto apenas controlando o tempo de exposição e a concentração de etileno dentro dos frascos. No presente trabalho, este porta-enxerto não apresentou bons resultados, sendo aquele de pior desempenho em todas as variáveis analisadas, além de ser aquele que apresentou maiores percentagens de contaminação *in vitro* (observações empíricas). É possível que seu desempenho tenha sido influenciado pela presença de bactérias endógenas nos explantes ou mesmo bactérias exógenas presentes no meio de cultura, o que dificultou a absorção dos nutrientes do meio assim como da citocinina. Esse fato certamente mascarou as respostas deste porta-enxerto.

## CONCLUSÕES

1. Para os porta-enxertos G x N<sub>22</sub> e Mr.S 2/5, o melhor meio de multiplicação foi o MS ¾ com 0,7 mg.L<sup>-1</sup> de BAP.
2. Para o porta-enxerto Marianna, o melhor meio é o MS com 0,7 mg.L<sup>-1</sup> de BAP.
3. Para o porta-enxerto Mirabolano, o melhor meio foi o MS ¾ com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP.
4. Para o porta-enxerto Mirabolano, o BAP exerce efeito negativo sobre o tamanho das brotações, independentemente do tipo de meio. Já para o porta-enxerto G x N<sub>22</sub>, este efeito se fez notar apenas no meio MS.
5. O porta-enxerto GF 677 não apresentou bons resultados na propagação *in vitro*.

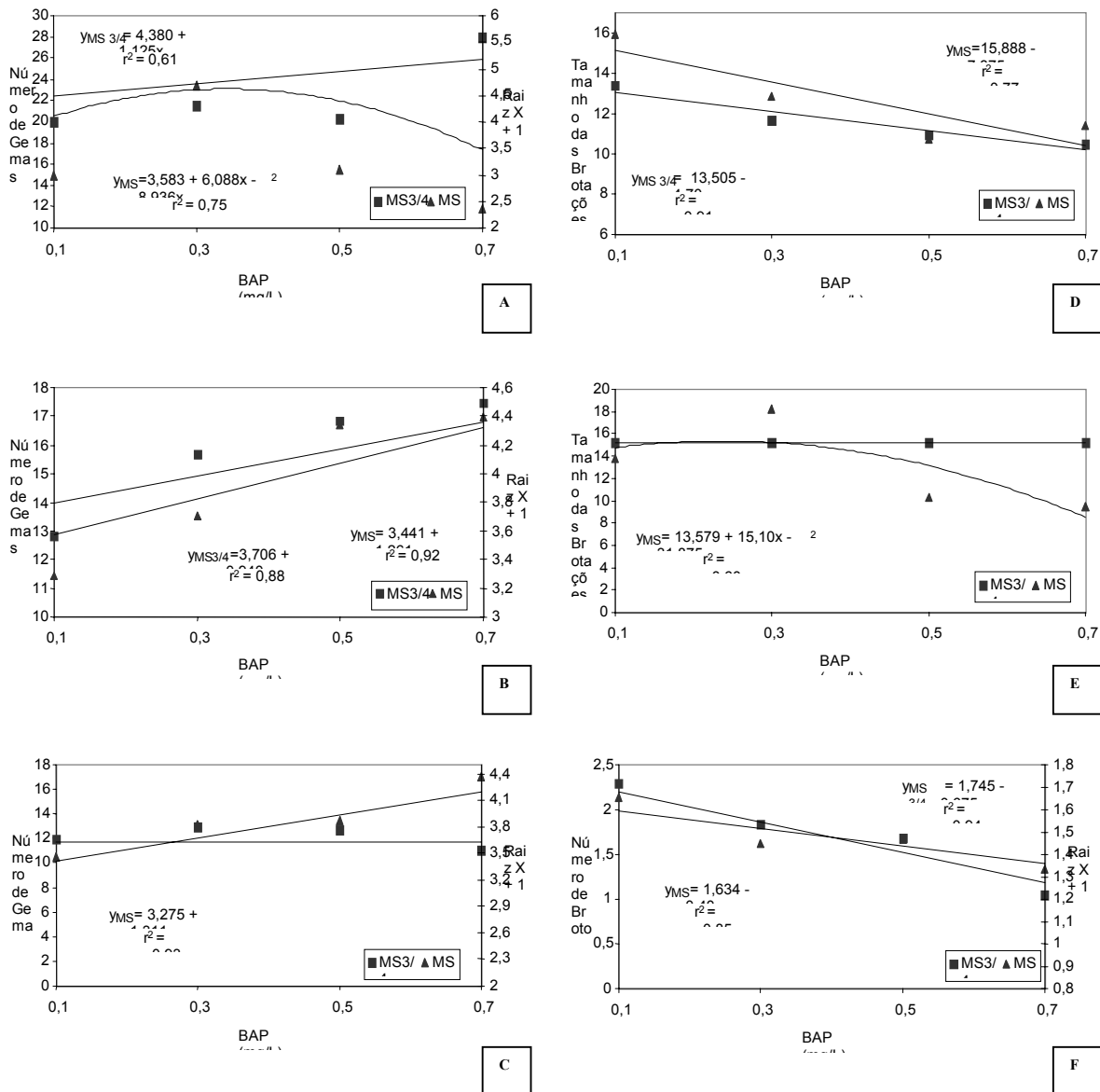


FIGURA 1A A 1F - Regressão polinomial para as variáveis número de gemas e de brotações e tamanho das brotações de porta-enxertos de *Prunus* em função das concentrações de BAP. FAEM/UFPEL - Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 1999.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOXUS, P. The production of strawberry plants by *in vitro* micropropagation. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.49, p.209-210, 1986.

BOXUS, P.; QUOIRIN, M. La culture de méristèmes apicaux de quelques espèces de *Prunus*. **Bulletin de la Société Royale de Botanique de Belgique**, Bruxelles, v.107, p.91-101, 1974.

DIMASI-THERIOU, K.; ECONOMOU, A.S. Ethylene enhances shoot formation in cultures of the peach rootstock GF-677 (*Prunus persica x Prunus amygdalus*). **Plant Cell Reports**, New York, v.15, p.87-90, 1995.

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**, V.1, Brasília: Embrapa - Serviço de Produção de Informação/Embrapa - CNPH,

1998, p.183-260.

HARADA, H., MURAI, Y. Micropropagation of *Prunus mume*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.8, p.265-267, 1996.

MARINO, G. Primi risultati sulla moltiplicazione *in vitro* di quattro portinnesti, ibridi di susino e pesco, selezionati in Francia. **Rivista della Ortoflorofrutticoltura Italiana**, Firenze, v.66, p.369-375, 1982.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

PREECE, J.E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators? **Plant, Tissue Culture and Biotechnology**, Rehovot, v.1, n.1, p.26-37, 1995.

QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Étude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.78, p.437-442, 1977.

TABACHNICK, L.; KESTER, D.E. Shoot culture of almond peach hybrid clones *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v.12, n.6, p.545-547, 1977.

ZIMMERMAN, R.H. Cultivo de tejidos. In: MOORE, J.N.,

JANICK, J. **Métodos genotécnicos en frutales**. Mexico: AGT, 1988. p.167-182.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. SANEST - Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores. Pelotas:UFPel, 1984. 75p.

ZUCCHERELLI, G. Moltiplicazione *in vitro* dei portainnesti clonali del pesco. **Rivista della Ortoflorofrutticoltura Italiana**, Firenze, v.41, n.2, p.15-20, 1979.