

MULTIPLICAÇÃO E ALONGAMENTO *IN VITRO* DO PORTA-ENXERTO DE *Prunus*

IN VITRO MULTIPLICATION AND SHOOT ELONGATION OF ROOTSTOCK OF *Prunus*

Paulo Sergio Gomes da ROCHA¹; Márcia Wulff SCHUCH²; Valmor João BIANCHI³; José Carlos FACHINELLO²

1. Doutorando em Fruticultura de Clima Temperado, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel - FAEM, Universidade Federal de Pelotas - UFPel, Pelotas, RS, Brasil. rocha@ufpel.tche.br; 2. Professor, Doutor, Departamento de Fitotecnia – FAEM – UFPel; 3. Departamento de Botânica – FAEM.

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo verificar o efeito do BAP e GA₃ nas fases de multiplicação e alongamento dos explantes do porta-enxerto de *Prunus* cv. Mr. S. 2/5. Os explantes foram multiplicados em meio SH suplementado com 0,0; 0,4; 0,8 e 1,2 mg L⁻¹ de BAP. Após 30 dias, avaliou-se o número de brotações e de gemas por explante e o comprimento médio das brotações. Para alongamento, as brotações foram cultivadas por 30 dias em meio SH suplementado com 0,0; 5,0; 10 e 15 mg L⁻¹ de GA₃. Nesta fase, avaliaram-se o número de brotações e folhas por brotação e comprimento das brotações. Para a etapa de multiplicação, o maior número médio de brotações (3,0) foi observado no meio acrescido com 0,8 e 1,2 mg.L⁻¹ de BAP. No meio sem BAP não houve multiplicação das brotações. O BAP não influenciou o comprimento médio das brotações e o número médio de gemas. Na fase de alongamento, ocorreu uma resposta linear crescente para o comprimento médio das brotações e número médio de gemas, com o aumento da concentração de GA₃ no meio de cultura. Para a variável número médio de folhas, não houve diferença significativa entre as concentrações de GA₃ utilizadas no meio.

PALAVRAS-CHAVE: Micropropagação. Pessegueiro. Mr. S. 2/5. Fitorreguladores.

INTRODUÇÃO

Na região Sul do Brasil são plantadas a cada ano aproximadamente 500 mil mudas de pessegueiro e produzidas 150 mil toneladas de pêssego, sendo o Estado do Rio Grande do Sul responsável por 60% da produção desta fruta (AGRIANUAL, 2003; SILVEIRA, 2000). Todavia, a produção dos porta-enxertos para a produção de mudas de pessegueiro neste Estado é realizada através de sementes provenientes de fábricas de conservas, as quais não possuem garantias genética e sanitária. Sendo a técnica de cultura de tecidos uma alternativa promissora para atender a demanda existente por porta-enxertos de alta qualidade (RODRIGUES et al., 2003).

O porta-enxerto cv. Mr. S. 2/5, recentemente introduzido no Brasil, é utilizado em vários países da Europa e apresenta importantes características agrônomicas como à indução de baixo vigor na cultivar copa e produção precoce, porém por ser um híbrido pentaplóide não produz por meio de sementes (LORETI et al., 1998), necessitando assim que a propagação seja feita via assexuada.

Diante deste contexto, faz-se necessário buscar técnicas mais eficientes para a produção de porta-enxertos. Sendo, as técnicas de cultura de

tecidos uma ferramenta que tem ocupado uma posição de destaque e se mostrado como uma alternativa viável de clonagem de espécies lenhosas, para a formação de pomares clonais ou produção comercial de mudas (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

Na micropropagação, uma das formas de aumentar a taxa de multiplicação dos explantes é por meio de ajustes no protocolo, modificando o tipo e a concentração de citocinina a ser acrescida no meio de cultura (SILVEIRA et al., 2001). Dentre as substâncias com efeito citocinínico utilizadas nos meios de cultivo, a benzilaminopurina (BAP) é a que tem contribuído eficientemente na multiplicação dos explantes, além de ser mais barata que outras fontes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

As brotações multiplicadas que apresentam pequeno comprimento poderão apresentar baixo percentual de enraizamento se estas forem diretamente cultivadas em meios de enraizamento, ou dar origem a mudas de baixa qualidade para a fase de aclimatização (SILVA, 2004). Uma das formas de estimular o crescimento das brotações é através da adição do ácido giberélico (GA₃) ao meio de cultura, o qual promove o aumento do comprimento das brotações, devido ao estímulo da divisão e alongamento das células (MÉTRAUX, 1987).

Objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito das concentrações de citocinina (BAP) na fase de multiplicação e giberelina (GA_3) na fase de alongamento das brotações do porta-enxerto de pessegueiro (*Prunus cerasifera*).

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micropropagação de Plantas Frutíferas do Departamento de Fitotecnia da FAEM/Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.

Fase I: Multiplicação *in vitro*

Utilizou-se segmentos caulinares com aproximadamente 10 mm de comprimento, retirados de brotações do porta-enxerto de *Prunus* cv. Mr. S. 2/5, estabelecidas *in vitro* e com quatro semanas de cultivo em meio MS sem reguladores de crescimento. Os explantes foram inoculados em meio de cultura SH (SCHENK; HILDEBRANT, 1972) suplementado com 30 mg L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 0,06 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) e diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (0,0; 0,4; 0,8 e 1,2 mg L⁻¹ de BAP). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,2 antes da adição do Agar.

Os frascos com os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 1 °C, 16 horas de fotoperíodo e luminosidade de 25 μmol m⁻² s⁻¹. Após 30 dias, foram avaliados o número médio de brotações e gemas por explante e o comprimento médio das brotações.

Fase II: Alongamento *in vitro* das brotações

Nesta fase experimental foram utilizadas as brotações do porta-enxerto provenientes do meio de multiplicação. As brotações com aproximadamente 7 mm de comprimento foram cultivadas em meio SH suplementado com 0,0; 5; 10 e 15 mg L⁻¹ de GA_3 , 30 mg L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 7 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio de cultura em ambos os ensaios foi ajustado para 5,2 antes da adição do Agar, e posteriormente, autoclavado a 121 °C durante 20 minutos.

Os explantes foram inoculados em frascos com capacidade de 250 ml, contendo 40 ml de meio de cultura. Após a inoculação, os frascos contendo as brotações foram mantidos em sala de crescimento nas mesmas condições utilizadas na fase de multiplicação. Após 35 dias de cultivo foram avaliados o comprimento médio das brotações e o número de médio de gemas e de folhas por brotação.

O delineamento experimental utilizado nas duas fases de cultivo foi o inteiramente casualizado, com 4 repetições por tratamento, sendo a unidade experimental, um frasco contendo 40 mL de meio de cultura e 5 explantes.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan ou regressão polinomial ao nível de 5% de probabilidade, através do Programa Estatístico Sanest (ZONTA; MACHADO, 1987).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fase I: Multiplicação *in vitro*

Para o número médio de brotações por explante, foi verificada uma tendência de aumento na produção de brotações até a concentração 0,8 mg L⁻¹ de BAP meio de cultura, a partir da qual não houve incremento adicional. Assim, a máxima produção de brotações (3,0) foi alcançada pela adição de 0,8 e 1,2 mg L⁻¹ de BAP meio de cultura SH (Figura 1). Este resultado é superior aqueles obtidos por Silveira et al. (2001), que multiplicaram o porta-enxerto cv. Mr. S. 2/5 meio MS ¾ suplementado com 0,7 mg L⁻¹ de BAP, e obtiveram apenas 1,37 brotações por explante.

Acrescenta-se ainda que, as novas brotações formadas por explante no presente trabalho estejam relacionadas com o aumento da concentração de BAP no meio de multiplicação, pois esta fonte de citocinina (BAP) é responsável pelo aumento da divisão celular.

Observou-se que as novas brotações formadas *in vitro* desenvolveram-se a partir das gemas axilares existente no explante inoculado. Verificou-se também que os explantes cultivados na ausência de BAP não multiplicaram, evidenciando assim uma dependência pela adição de citocinina para a indução de brotações.

De acordo com Pérez-Tornero et al. (2000) a utilização de uma fonte de citocinina no meio de multiplicação é indispensável para promover a superação da dominância apical do explante e induzir à proliferação de gemas axilares.

Contrariamente, Couto et al. (2004) observaram que os explantes dos porta-enxertos de *Prunus* cv. 'Barrier' e 'Cadman' formaram brotações em meio de cultura desprovido de BAP, uma resposta que foi atribuída ao fator genético e ao efeito residual do BAP, uma vez que os explantes empregados foram provenientes do quinto subcultivo em meio de cultura acrescido de BAP.

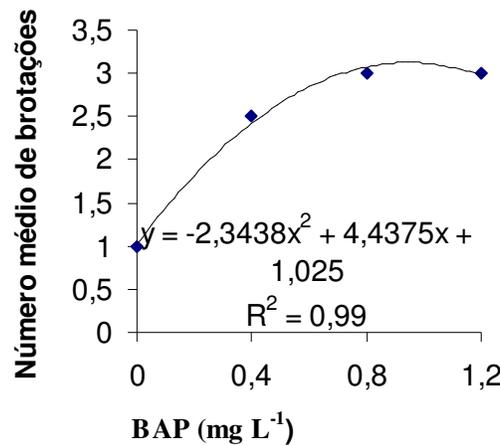


Figura 1. Número médio de brotações do porta-enxerto de *Prunus* cv. Mr. S. 2/5 provenientes do cultivo em meio SH acrescido de diferentes concentrações de BAP. UFPel, Pelotas-RS, 2005.

Em relação ao comprimento médio das brotações e número de gemas, nenhum efeito significativo do acréscimo de BAP no meio de cultura foi observado (Tabela 1).

Trabalhando com o mesmo porta-enxerto em meio de cultura MS ¾ (75% da concentração de

todos os sais e vitaminas) suplementado com 0,7 mg L⁻¹ de BAP, Silveira et al. (2001) obtiveram brotações com 12,6 mm de comprimento, porém apenas uma brotação por explante foi observada. Já quanto à formação do número médio de gemas, estes autores conseguiram 14,5 gemas por brotação.

Tabela 1. Valores médios para o comprimento médio das brotações e número médio de gemas por brotação do porta-enxerto de *Prunus* cv. Mr. S. 2/5, cultivado em meio de cultura SH acrescido por diferentes concentrações de BAP. UFPel, Pelotas-RS, 2005

Variáveis avaliadas	Concentrações de BAP (mg L ⁻¹)			
	0,0	0,4	0,8	1,2
Comprimento médio da brotação (mm)	5,3 a	5,1 a	5,2 a	4,9 a
Número médio de gemas	2,5 a	2,1 a	2,1 a	2,0 a

*Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem pelo teste de Duncan ao nível de 5%.

Fase II: Alongamento *in vitro* das brotações

Observou-se que as diferentes concentrações de ácido giberélico (GA₃) adicionadas ao meio de cultura SH contribuíram positivamente para o alongamento *in vitro* das brotações do porta-enxerto de *Prunus* cv. Mr. S. 2/5, uma vez que foi observada uma tendência de uma resposta linear crescente para o comprimento médio das brotações

com o aumento da concentração de GA₃, sendo o maior comprimento (12,6 mm) obtido com 5 mg L⁻¹ de GA₃ (Figura 2 e 3).

Resultados similares foram relatados por Reeves et al. (1985) com o porta-enxerto de *Prunus* cv. ‘St. Julien A’, que obtiveram maior comprimento das brotações (47,6 mm) com o acréscimo de 12,5 mg L⁻¹ de GA₃.

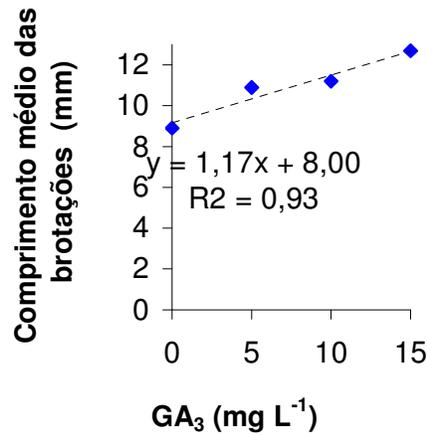


Figura 2. Comprimento médio das brotações do porta-enxerto cv. Mr.S. 2/5 provenientes do cultivo em meio SH, suplementado com ácido giberélico (GA_3). UFPel, Pelotas-RS, 2005.

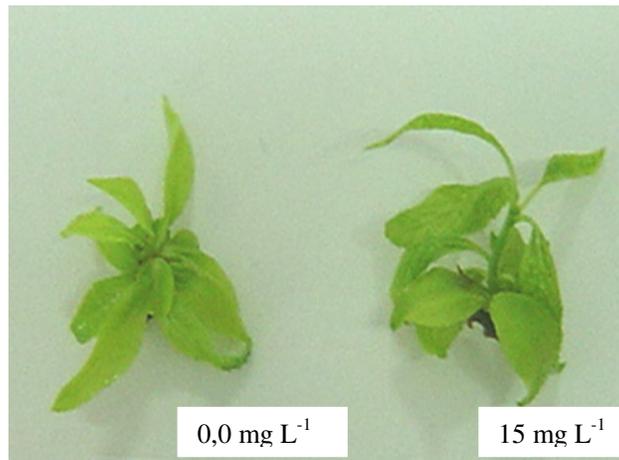


Figura 3. Brotações do porta-enxerto cv. Mr. S. 2/5 provenientes do cultivo em meio SH com $0,0 mg L^{-1}$ de GA_3 (tratamento controle) e $15 mg L^{-1}$ de GA_3 (esquerda/direita). Pelotas-RS, 2005.

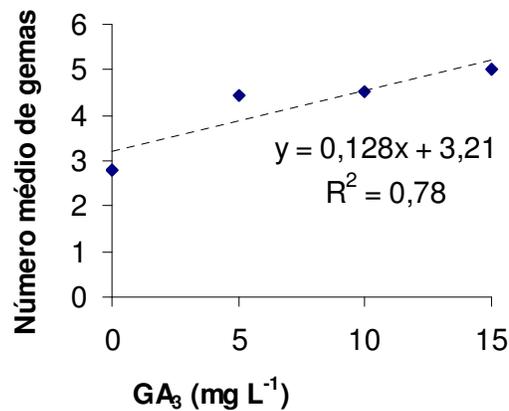


Figura 4. Número médio de gemas formadas das brotações do porta-enxerto cv. Mr. S. 2/5 provenientes do cultivo em meio SH com diferentes concentrações de GA_3 . UFPel, Pelotas-RS, 2005.

CONCLUSÕES

O acréscimo de 6-benzilaminopurina (BAP) ao meio de cultura SH, na concentração de 0,8 ou 1,2 mg L⁻¹ de BAP, promove maior indução das brotações axilares;

O ácido giberélico (GA₃) atua eficientemente no alongamento das brotações do

porta-enxerto de *Prunus* cv. Mr. S. 2/5 cultivadas *in vitro*;

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida, a qual foi fundamental para a realização deste trabalho.

ABSTRACT: The purpose of this work was evaluate BAP and GA₃ effect in the explants multiplication and shoot elongation phases of *Prunus* rootstocks of cv. Mr. S. 2/5. The explants were multiplied in the SH culture medium supplemented with 0.0; 0.4; 0.8 or 1.2 mg L⁻¹ of BAP. After 30 days, it was analyzed the shooting number by explant, the shooting length and the bud number. In the shoot elongation phase, the shoots were cultivated in SH culture medium supplemented with 0.0; 5.0; 10 or 15 mg L⁻¹ of GA₃. After 30 days, it was evaluated the shoot number and length and leaf number for shooting. In the multiplication phase there was an increase in the shoot number, with the BAP increasing, the highest number obtained 3.0 in media added by 0.8 e 1.2 mg L⁻¹ of BAP. In the culture medium without BAP, the explants did not multiply. BAP did not influence the shoot and bud number. The shoot elongation phase, there was a linear increase answer for the shoot length and the buds number, with an increase of GA₃ concentration in the culture medium. For the leaves number, there was no significant difference among the different concentrations of GA₃ used in the medium.

KEYWORDS: Micropropagation. Peach tree. Mr. S. 2/5. Phytohormones.

REFERÊNCIAS

- AGRIANUAL: **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria & AgroInformativos, 2003. 544p.
- ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPq, 1998. v. 1, p. 261-296.
- CHALFUN, N. N. J.; HOFFMANN, A. Propagação do pessegueiro e da ameixeira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 189, p. 23-29, 1997.
- COUTO, M.; OLIVEIRA, R. P.; FORTES, G. R. L. Multiplicação *in vitro* dos porta-enxertos de *Prunus* sp. 'Barrier' e 'Cadman'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 5-7, 2004.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPq, 1998, v. 1, p. 183–260.
- LORETI, F.; GUERRIERO, G.; MASSAI, R. Una nuova ed interessante selezione di susino portinnesto: I' Mr. S. 2/5. **Agricoltura Ricerca**, Roma, n. 102, p. 45-50, 1998.
- MÉTRAUX, J. P. Gibberellins and plant cell elongation. In: DAVIES, P. J. (Ed). **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, p. 296-317, 1987.
- 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.
- 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.

REEVES, D. W.; COUVILLON, G. A.; HORTON, B. D. Effect of gibberellic acid (GA₃) on elongation and rooting of 'St. Julien A' rootstock *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 26, p. 253-259, 1985.

RODRIGUES, A. C.; SILVEIRA, C. A. P.; FORTES, G. R. de L.; FACHINELLO, J. C.; SILVA, J. B. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Prunus* sp. em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Joticabal, v. 25, n. 1, p. 131-133, 2003.

SCHENCK, R. U.; HILDEBRANDT, A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 50, p. 199-204, 1972.

SILVA, E. S. B. **Propagação *in vitro* de *Prunus* spp.** Pelotas, 2004, 115f. Tese (Doutorado em Fruticultura de clima Temperado) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel.

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**, Joticabal, v. 23, n. 3, p. 488-492, 2001.

SILVEIRA, C. A. P., **Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos do gênero *Prunus* sp.** Pelotas, 2000, 65f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel- UFPel.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. SANEST – Sistema de análise estatística para microcomputadores. Pelotas: DMEC/IFM/UFPel, 1987. 138p.