

MULTIPLICAÇÃO “*in vitro*” DO PORTA-ENXERTO DE AMEIXEIRA ‘JULIOR’

In vitro MULTIPLICATION OF PLUM ROOTSTOCKS ‘JULIOR’

WAGNER JÚNIOR, Américo¹; COUTO, Marcelo¹; QUEZADA, Alberto C.²

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de BAP e IBA na multiplicação “*in vitro*” do porta-enxerto de ameixeira ‘Julior’ (*Prunus* spp.). O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos, da Embrapa Clima Temperado, Pelotas (RS). Os tratamentos consistiram de cinco diferentes combinações de BAP (6-benzilaminopurina) 0; 0,15; 0,30; 0,45 e 0,60 mg.L⁻¹, e quatro concentrações de IBA (ácido indol-3-butírico) 0; 0,03; 0,06 e 0,09 mg.L⁻¹, perfazendo-se 20 tratamentos. Foi utilizado o delineamento experimental em blocos casualizados, com quatro repetições, sendo cada parcela constituída por cinco tubos de ensaio, contendo um segmento nodal cada. Aos 70 dias foram avaliadas as variáveis: comprimento das brotações (cm); número de brotações/explante e número de gemas/explante. O BAP exerceu papel fundamental para obtenção dos melhores resultados nas diferentes variáveis analisadas, sendo as melhores respostas obtidas no comprimento e no número de brotação utilizando-se as concentrações de 0,45 e 0,6 mg.L⁻¹ de BAP, respectivamente. As diferentes concentrações de IBA não influenciaram na multiplicação “*in vitro*” do porta-enxerto de ameixeira ‘Julior’ (*Prunus* spp.).

Palavras-chave: Citocinina, cultura de tecidos, *Prunus*, ameixa, auxina, IBA, BAP.

INTRODUÇÃO

Na produção de mudas de ameixeira (*Prunus* spp.), frequentemente, utilizam-se porta-enxertos propagados por sementes de *Prunus* spp., cuja prática apresenta como inconvenientes à alta segregação e a mistura de cultivares. Os pomares assim obtidos não são uniformes e, além disso, agrava-se a cada ano os problemas com nematóides, especialmente dos gêneros *Meloidogyne* e *Criconebella* (CARNEIRO et al., 1993), uma vez que os porta-enxertos utilizados são suscetíveis a estes.

Na propagação “*in vitro*” pode-se obter uma grande quantidade de plantas num período curto de tempo em comparação com o método de propagação tradicionalmente utilizado em *Prunus* spp. (MATIAS, 1995). Além disso, possibilita a manutenção das características genéticas idênticas à planta-mãe.

O porta-enxerto de ameixeira ‘Julior’ é um híbrido entre ‘Saint Julien’ e ‘Persshore’, selecionado na Estação Francesa de La Grande Ferrade, e apresenta como principais características porte vigoroso e indução de precocidade na produção das plantas enxertadas (FELIPE, 1994).

Muitos trabalhos, com diversas espécies frutíferas, vem sendo realizados na tentativa de adequar o uso de reguladores de crescimento ao meio de cultura. Segundo SCHWENGBER et al. (1999) a utilização de reguladores de crescimento é imprescindível para obter sucesso na multiplicação “*in vitro*”.

Os principais reguladores de crescimento utilizados nesta fase são as citocininas, porém, não ocorrendo crescimento satisfatório das plantas, pode ser necessário o uso de auxinas e/ou giberelinas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Para o estabelecimento de um eficiente controle no crescimento e na diferenciação das culturas “*in vitro*”, é necessário um adequado balanço entre auxinas e citocinas. Normalmente, as concentrações de auxinas são inferiores as das citocininas, mantendo o balanço auxina/citocinina menor que um (PIERIK, 1990).

Quando o nível de auxina em relação ao de citocinina é alto, ocorre a formação de raízes. Na situação oposta, ocorre a formação de brotos e quando as proporções são aproximadamente iguais, uma massa de calo é produzida (KRICKORIAN, 1995).

O uso de auxinas no meio de multiplicação não é necessário. Porém, podem ser utilizadas com o objetivo de estimular o alongamento das brotações para posterior enraizamento (QUOIRIN & LEPOIVRE, 1977). ALMEHDI & PARFITT (1986) obtiveram bons resultados na multiplicação dos porta-enxertos de pessegueiro ‘Nemaguard’ e ‘Lovell’ utilizando concentrações elevadas de BAP (6,0 mg.L⁻¹) e baixas de auxinas (0,01 mg.L⁻¹).

Entretanto, associações de citocininas e auxinas às vezes podem provocar uma menor multiplicação (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998), como verificaram RUZIC et al. (1984) trabalhando com o porta-enxerto ‘GF 677’. Estes autores utilizaram concentração constante de BAP (0,5 mg.L⁻¹) e concentrações de AIB, AIA, ANA e 2,4 D em meio MS, concluindo que concentrações maiores que 0,01 mg.L⁻¹ destas auxinas influenciaram negativamente a multiplicação.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de 6-benzilamino purina (BAP) e ácido indol-3-butírico (IBA) na multiplicação “*in vitro*” do porta-enxerto ‘Julior’ (*Prunus* spp.).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.

O meio de cultura utilizado foi o ²/₃ MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), reduzido em 33,33% dos sais do meio original, e acrescido 30 g.L⁻¹ de sacarose, 6,0 g.L⁻¹ de ágar e 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol. O pH foi ajustado para 5,8 antes da adição do ágar.

O meio foi distribuído em tubos de ensaio de 150 x 25 mm. Em cada tubo colocou-se 10 mL de meio. Estes foram autoclavados a temperatura de 121°C durante 15 minutos. Em cada tubo de ensaio foi inoculado um explante, com tamanho

¹ Engº Agrº, Mestrando em Agronomia – Fruticultura de Clima Temperado. FAEM/UFPel. Pelotas – RS. Bolsista CAPES. e-mail: americo@ufpel.tche.br/americowagner@hotmail.com;

² Engº Agrº, Doutor. Pesquisador convênio IICA/Embrapa. e-mail: centelas@supernet.bo

(Recebido para publicação em 25/11/2002)

médio de 10 mm, retirados de segmentos nodais do porta-enxerto de ameixeira 'Julior' (*Prunus* spp.), originados de subcultivos "in vitro".

Os tubos foram levados para sala de crescimento com condições controladas de intensidade luminosa ($20 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), fotoperíodo (16 horas) e temperatura ($25\pm 2^\circ\text{C}$).

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com 4 (quatro) repetições, sendo cada unidade experimental constituída por 5 (cinco) tubos de ensaio, contendo um segmento nodal cada. Utilizou-se um esquema fatorial 5×4 , sendo considerados como fatores, as concentrações de BAP (0; 0,15; 0,30; 0,45 e $0,60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e IBA (0; 0,03; 0,06; $0,09 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), perfazendo-se 20 tratamentos.

Aos 70 dias, foram avaliadas as variáveis comprimento das brotações (cm); número de brotações/explante e número de gemas/explante. Para análise dos dados fez-se o uso das equações de regressão utilizando o programa SANEST (Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises de variância para as diferentes concentrações de IBA e para a interação BAP x IBA, não foram significativas para todas as características analisadas. Já as concentrações de BAP apresentaram diferenças significativas nas características comprimento médio das brotações, número médio de brotações/explante e número médio de gemas/explante.

Os maiores comprimentos médios das brotações foram obtidos nos concentrações $0,42 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP (ponto de máxima = $0,96 \text{ cm}$). Enquanto que os piores resultados foram nos concentrações em que o BAP não foi utilizado (Figura 1).

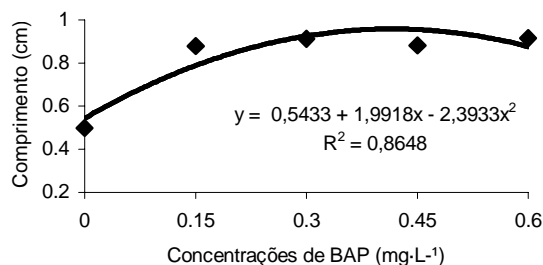


Figura 1 – Comprimento médio das brotações de explantes do porta-enxerto de ameixeira 'Julior' sob diferentes concentrações de BAP. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2002.

De acordo com GRATTAPAGLIA & MACHADO (1998), concentrações mais elevadas de citocininas inibem o alongamento das brotações. Em trabalho realizado por SILVEIRA et al. (2001), o porta-enxerto 'Mirabolano' teve um comportamento linear decrescente em função das concentrações de BAP, ou seja, quando aumentou-se as concentrações de BAP houve uma diminuição no alongamento das brotações, obtendo-se os melhores resultados com o meio $\frac{3}{4}$ MS, com a concentração $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP.

Neste trabalho não se observou efeito negativo do BAP sobre o alongamento das brotações. Resultados semelhantes foram obtidos por PASQUAL & ISHIDA (1992), os quais observaram que, concentrações entre 0,5 e $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP produziram os melhores resultados para o porta-enxerto de macieira 'MI-793'.

Quando se visa a multiplicação "in vitro", o número médio de brotações é fundamental para posteriores multiplicações. Neste trabalho, o aumento na concentração de BAP incrementou o número de brotos obtidos. O maior número de brotações (5,59) foi obtido com $0,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP. Pode-se observar que, na ausência do regulador, não houve uma produção eficiente de novas brotações (Figura 2).

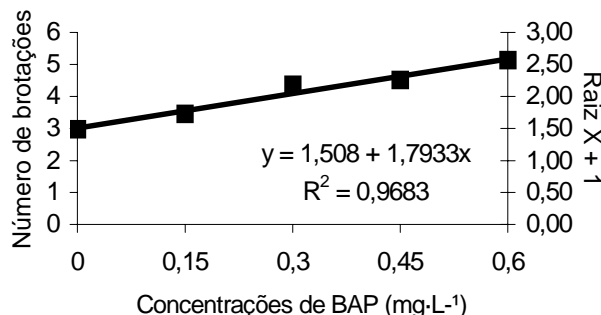


Figura 2 – Número médio das brotações de explantes do porta-enxerto de ameixeira 'Julior' sob diferentes concentrações de BAP. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2002.

MARINO (1982) observou que $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP possibilitou as maiores taxas de multiplicação em *Prunus* spp., porém o tamanho das brotações foi relativamente pequeno, dificultando a separação das gemas. Resultados diferentes foram obtidos no presente trabalho, nos quais as maiores concentrações de BAP favoreceram as melhores respostas no comprimento das brotações.

HAMMERSCHLAG et al. (1987), testando a multiplicação de três cultivares de pessegueiro ('Evergreen', 'Suncrest' e 'Belle of Georgia'), observaram que o maior número de brotações dentre todos os tratamentos foi obtido na presença $10 \mu\text{M}$ ($2,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de BAP. Já MATIAS (1995) obteve os melhores resultados com as cultivares 'Diamante' e 'Flordaprince' utilizando o meio MS com $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP e $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA. No presente trabalho, o uso de concentrações relativamente menores de BAP ($0,45$ e $0,60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) proporcionaram as melhores respostas de alongamento e multiplicação, respectivamente.

Segundo PONCHIA & GARDIMAN (1993), o uso associado de uma citocinina e uma auxina pode levar a um bons resultados de multiplicação. Entretanto, na multiplicação do porta-enxerto 'Julior' esta associação não foi significativa em todas as características analisadas. A ação do BAP mostrou-se benéfica para a formação de explantes com maior comprimento e maior número de brotações. Por outro lado, quando foram utilizadas concentrações acima de $0,15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ocorreu uma redução no número médio de gemas (Figura 3). Provavelmente, isto esteja relacionado com o desbalanço na relação BAP/IBA. Segundo KRICKORIAN (1995) quando o nível de auxina em relação ao de citocinina é alto, pode ocorrer à formação de raízes. Na situação oposta, ocorre a formação de brotos e quando as proporções são aproximadamente iguais, uma massa de calo é produzida.

Pelos resultados percebe-se que nem sempre o regulador de crescimento que induz a formação de explantes de maior comprimento é o que proporciona o maior número de brotações e o maior número de gemas.

Para LANE & Mc DOUGALD (1982), a necessidade de fornecimento de BAP aos meios de cultura está relacionada com a quantidade de citocinina endógena

que cada cultivar e cada explante possui. Segundo estes autores, a citocinina endógena, interagiria com o BAP do meio de cultura influenciando na resposta do explante, sendo isto dependente do meio, da eficiência de transporte do BAP e do metabolismo deste, podendo criar requerimentos menores ou maiores de BAP exógeno.

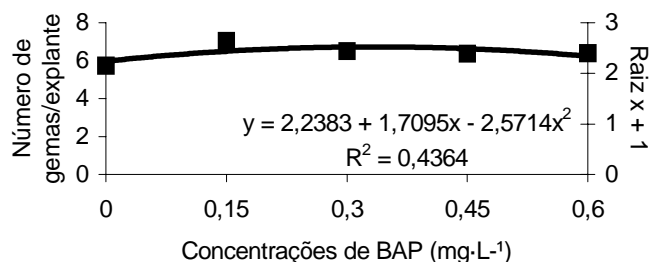


Figura 3 - Número médio de gemas dos explantes do porta-enxerto de ameixeira 'Julior' sob diferentes concentrações de BAP. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2002.

Para CHIARIOTTI & ANTONELLI (1988), o BAP é um componente essencial do meio de multiplicação para *Prunus* spp., sendo sua presença necessária para a sobrevivência e subsequente multiplicação das gemas. Resultados semelhantes foram obtidos neste trabalho, no qual a presença de BAP foi fundamental para obtenção dos melhores resultados.

CONCLUSÕES

O 6-benzilaminopurina (BAP) teve influência na multiplicação "in vitro" do porta-enxerto de ameixeira 'Julior' (*Prunus* spp.), nos quais as concentrações de 0,45 e 0,6 mg.L⁻¹, proporcionaram as melhores respostas no comprimento e número de brotações, respectivamente.

As diferentes concentrações do ácido indol-3-butírico (IBA) não influenciaram na multiplicação "in vitro" do porta-enxerto de ameixeira 'Julior' (*Prunus* spp.).

ABSTRACT

The purpose of this work was to evaluate the effects of different concentrations of BAP and IBA on the "in vitro" multiplication of plum rootstock cv. 'Julior'. The work was accomplished during 70 days, in the Tissue Culture Laboratory at Embrapa Clima Temperado Research Center, in Pelotas (RS-Brazil). Five different BAP concentrations (6-benzilaminopurine) 0; 0.15; 0.30; 0.45 and 0.60 mg.L⁻¹, and four IBA concentrations (indole-3-butyric acid) 0; 0.03; 0.06 and 0.09 mg.L⁻¹, were combined to make 20 treatments. The experiment was designed in a completely randomized block with four replications where each plot consisted of five tubes, with one axillary bud excised in each tube. The following parameters were evaluated: shoot length (cm); number of shoots/explant and bud number/explant. The BAP concentration was important to get the best results in the different variables evaluated. The best results were achieved for shoot length and number of shoots/explants using the concentrations of 0.45 and 0.6 mg.L⁻¹ of BAP, respectively. The use of different IBA concentrations didn't influence in the "in vitro" multiplication of plum rootstocks 'Julior' (*Prunus* spp.).

Key words: Cytokinin, tissue culture, *prunus*, plum, auxin, IBA, BAP.

REFERÊNCIAS

- ALMEHDI, A. A.; PARFITT, D. E. *In vitro* propagation of peach: Propagation of 'Lovell' and 'Nemaguard' peach rootstocks. **Fruit Varieties Journal**, Massachusetts, v. 40, n. 01, p. 12-17. 1986.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; FORTES, J.; ALMEIDA, M.R. Associação de *Criconebella xenoplax* com a morte de pessegueiro no Rio Grande do Sul. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 17, n. 2, p.122-131. 1993.
- CHIARIOTTI, A.; ANTONELLI, M. Effect of 6-BAP and adenine sulphate on peach shoot proliferation. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 227, p. 418-420. 1988.
- FELIPE, A.J. Portainjertos para duraznero y ciruelo. In: **Curso Internacional de Frutales de Carozo**. Rio Negro: INTA, p.1-50. 1994.
- 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**. Brasília: Embrapa - Serviço de Produção de Informação/Embrapa - CNPH. 1998. v. 1, p. 183 - 260.
- HAMMERSCHLAG, F.A.; BAUCHAN, G.R.; SCORZA, R. Factors influencing *in vitro* multiplication and rooting of peach cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 8, p. 235-242. 1987.
- KRIKORIAN, A. D. Hormones in tissue culture and micropropagation. In: Plant Hormones, 2ª Ed., Davies P. J. (Ed.), **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, p. 774 - 796. 1995.
- LANE, W. D.; Mc DOUGALD, J. M. Shoot tissue culture of apple: comparative response of five cultivars to cytokinin and auxin. **Canadian Journal Plant Science**, Ottawa, v. 62, p. 689-694. 1982.
- MARINO, G. Primi risultati sulla moltiplicazione *in vitro* di quattro portinnesti, ibridi di susino e pesco, selezionati in Francia. **Rivista della Ortoflorofruitticoltura Italiana**, Firenze, v. 66, p. 369-375. 1982.
- MATIAS, A. C. **Estabelecimento e multiplicação in vitro de pessegueiro (*Prunus persica* L. Batsch.) cultivares Flordaprince e Diamante**. Pelotas, 1995. 84p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n. 3, p. 473-479. 1962.
- PASQUAL, M.; ISHIDA, J. S. Influência de reguladores de crescimento sobre a proliferação *in vitro* de brotos do porta-enxerto de macieira 'MI - 793'. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 39, p. 584 - 590. 1992.
- PIERIK, R. L. M. **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. Ed. Mundi-Prensa. Madri. 295 p. 1990.
- PONCHIA, G.; GARDIMAN, M. The micropropagation and post-acclimation growth of *Prunus laurocerasus* L. cv. Otto Luyken: additional findings. **Advance Horticultural Science**, Alexandria, v. 7, p. 11-14. 1993.
- QUORIN, M.; LEPOIVRE, P. Etude de mileux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.78, p.437-442. 1977.
- RUZIC, D.; ROSATI, P.; MARINO, G. Effetto dei fitoregolatori nella micropropagazione dell' ibrido pesco x mandorlo 'GF

677'. **Rivista di Ortoflorofrutticoltura Italiana**, Firenze, v. 68, p. 413-421. 1984.
SCHWENGBER, J. E.; RODRIGUES, A. C.; RUFATO, L. et al. Efeito de diferentes concentrações de BAP e TDZ na multiplicação de microestacas do porta-enxerto de macieira cv. Mark. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 21, n. 2, p. 200-203. 1999.

SILVEIRA, C. A. P.; FACHINELLO, J. C.; FORTES, G. R. de L. et al. Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos do gênero *Prunus* sob diferentes concentrações de BAP em dois meios decultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 03, p. 488-492. 2001.