

OTIMIZAÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO IN VITRO DO PORTA-ENXERTO DE PESSEGUEIRO ‘TSUKUBA II’ EM RESPOSTA A AÇÃO SINÉRGICA DE 6-BENZILAMINOPURINA E CINETINA

VANESSA ROCHA DA SILVA¹; **JÚLIA MELO ARIMA PERRI**²;
SIMONE RIBEIRO LUCHO³; **VALMOR JOÃO BIANCHI**⁴;

¹*Universidade Federal de Pelotas – vanessa_rocha88@hotmail.com*

²*Universidade Federal de Pelotas – julia.mello812@gmail.com*

³*Universidade Federal de Pelotas – simonibelmonte@gmail.com*

⁴*Universidade Federal de Pelotas – valmorjb@yahoo.com*

1. INTRODUÇÃO

O pessegueiro [*Prunus persica* L. (Bastch)] é de origem Chinesa, pertence à família Rosaceae e ao gênero *Prunus*, tendo importância econômica relevante no Brasil, principalmente no Rio Grande do Sul, que é responsável por aproximadamente 65% da produção Nacional (ATLAS SOCIOECONÔMICO, 2020). A produção desta frutífera é um desafio para os produtores devido às dificuldades de adaptação das cultivares-copa ao clima e emprego de porta-enxertos inadequados, sem identidade genética conhecida (MAYER et al., 2015).

A produção de mudas é feita por enxertia, quase em totalidade, usando porta-enxertos obtidos de caroços de cultivares-copa, que podem apresentar uma taxa de polinização cruzada que pode chegar a 33% (MILLER et al., 1989), portanto contendo alta variabilidade genética, que é indesejável para porta-enxertos. O ideal é utilizar porta-enxertos clonados que apresentem boa compatibilidade de enxertia com as cultivares-copa.

A micropropagação in vitro é uma ferramenta útil para propagar de forma rápida e em grande quantidade porta-enxertos do gênero *Prunus*, utilizando pouco espaço físico (RITTERBUSCH et al., 2020). No caso de porta-enxertos de pessegueiro, na medida em que se faz sucessivos subcultivos, podem ocorrer problemas morfogenéticos, como por exemplo, o definhamento dos explantes in vitro. JAIN et al. (2009) também relataram este problema em *Harpagophytum procumbens*.

Alguns fatores têm sido apontados como causadores deste definhamento, dentre eles estão a hiperhidridade, redução da formação e crescimento de brotos (RADMANN et al., 2009) e a necrose dos meristemas apicais, sendo este último um limitador importante para a manutenção de estoque de explantes para novas multiplicações, enraizamento e obtenção de plântulas para a comercialização (SHA et al., 1985). BARGHCHI; ALDERSON (1996) relacionaram a necrose do meristema apical dos explantes com a deficiência de cálcio e/ou boro, também mencionado por TEIXEIRA et al. (2020), que reforçaram a ideia de que as trocas de meio com diferentes concentrações de nutrientes e reguladores de crescimento ao longo dos subcultivos pode causar danos fisiológicos aos explantes.

De fato, existe a necessidade de desenvolver e aprimorar protocolos de multiplicação in vitro para os porta-enxertos de pessegueiro visando superar os problemas acima relatados e que atualmente estão prejudicando a manutenção in vitro deste material vegetal após alguns subcultivos dos explantes.

A partir dessa premissa, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos de diferentes concentrações combinadas de 6-Benzilaminopurina (BAP) e Cinetina (KIN) na multiplicação da cultivar de porta-enxerto de pessegueiro Tsukuba II.

2. METODOLOGIA

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pelotas. Foram utilizados explantes do porta-enxerto de Pessegueiro Tsukuba II [*Prunus persica* L. (Bastch)], em sétimo subcultivo, com aproximadamente 2 cm de comprimento, anteriormente multiplicados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), contendo 7 g L^{-1} de ágar, 30 g L^{-1} de sacarose, $0,4 \text{ g L}^{-1}$ de BAP, $0,3 \text{ g L}^{-1}$ de GA₃, $0,05 \text{ g L}^{-1}$ de AIB e pH 5,8. Para o experimento de multiplicação, os explantes foram inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), utilizando-se a metade da dose das soluções A, B e D, e as demais em dose completa, contendo 30 g L^{-1} de sacarose, 8 g L^{-1} de ágar, $0,25 \text{ g L}^{-1}$ de GA₃, $0,05 \text{ g L}^{-1}$ de AIB e as seguintes concentrações combinadas de BAP e Cinetina (g L^{-1}), respectivamente: $0,6 + 0,0$; $0,4 + 0,1$; $0,2 + 0,2$; $0,1 + 0,4$; $0,0 + 0,6$. Após a inoculação, os frascos foram mantidos em fotoperíodo de 16 horas (densidade de fluxo luminoso de $48 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), e temperatura de $25^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ em sala de crescimento.

Foram utilizados cinco tratamentos, com três repetições, cada uma representada por um frasco contendo quatro explantes (unidade experimental). Aos 22 dias de cultivo foram avaliadas a porcentagem de explantes com brotações laterais, o número médio de brotos laterais por explante brotado, o tamanho médio das brotações laterais (cm) e o tamanho médio dos explantes (cm). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Realizou-se a análise de variância (*F-test*) dos dados e, quando significativo, o teste de Tukey ($p<0,05$) foi aplicado utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2011).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise de variância, somente verificou-se diferenças ($P<0,05$) para as respostas morfogênicas relacionadas ao número médio de brotos laterais por explante brotado e tamanho médio dos explantes (TABELA 1).

O maior número médio de brotações laterais ($2,6 \pm 0,1$) foi observado no tratamento M3, presença de 2 mg L^{-1} de BAP e KIN (TABELA 1), diferindo somente em relação ao tratamento M2, sugerindo que os dois reguladores atuam de forma sinérgica e benéfica sobre este parâmetro. Esta notação também foi inferida por RITTERBUSCH et al. (2020), ao avaliarem o efeito destes reguladores sobre a taxa de multiplicação e alongamento *in vitro* de explantes do porta-enxerto de pessegueiro 'GxN-9'. Por outro lado, SRIVASTAVA; JOSHI (2009) demonstraram que a concentração de KIN deve ser maior do que a de BAP para a otimização da formação e alongamento dos explantes de *Portulaca grandiflora*. Estes resultados sugerem que cada genótipo tem um tipo e concentração ideal de citocinina. De acordo com PHILLIPS; GARDA (2019) essas diferenças devem-se a interação de fitormônios endógenos com os fornecidos exogenamente afetando cada genótipo distintamente.

Quanto ao tamanho médio dos explantes os maiores valores ($3,7 \pm 0,0 \text{ cm}$) foram também observados no tratamento M3 (TABELA 1). Esse resultado reforça a necessidade da presença de ambos os reguladores para a otimização da multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de pessegueiro 'Tsukuba II'.

TABELA 1 - Efeito de diferentes concentrações de citocininas (BAP e KIN) sobre a multiplicação in vitro de porta-enxerto de pessegueiro 'Tsukuba II'

Meio MS	mg L ⁻¹		*% explantes com brotações laterais	Nº médio de brotos laterais por explantes brotado	*Tamanho médio das brotas laterais (cm)	*Tamanho médio dos explantes (cm)
	BAP	KIN				
M ₁	0,6	0,0	58,3 ± 4,8**	2,2 ± 0,3 ab	0,9 ± 0,0**	2,8 ± 0,0 b
M ₂	0,4	0,1	50,0 ± 8,3	1,0 ± 0,1 b	0,9 ± 0,0	3,2 ± 0,0 ab
M ₃	0,2	0,2	50,0 ± 0,0	2,6 ± 0,1 a	0,7 ± 0,1	3,7 ± 0,0 a
M ₄	0,1	0,4	50,0 ± 0,0	1,5 ± 0,1 ab	0,7 ± 0,0	2,8 ± 0,1 b
M ₅	0,0	0,6	3,3 ± 4,8	1,3 ± 0,1 ab	0,8 ± 0,0	2,9 ± 0,0 b
Média			42,3 ± 3,6	1,7 ± 0,2	0,8 ± 0,1	3,1 ± 0,1
CV (%)			33,3	34,5	29,9	7,3

* Por explante inicial

Os valores representam média ± desvio padrão de 3 repetições.

Os valores médios na coluna que compartilham letras diferentes indicam diferenças estatísticas com base na ANOVA seguida pelo teste de Tukey P≤0,05.

**Médias na coluna não diferem com base na ANOVA.

6-Benzilaminopurina (BAP); Cinetina (KIN); coeficiente de variação (CV)

Não houve diferenças para a porcentagem de explantes com brotações laterais e para o tamanho médio das brotações laterais, cujos valores médios foram de 42,3% e 0,8 cm, respectivamente, resultados que podem ter interferência de outros fatores como condições gerais dos explantes após sete subcultivos sucessivos. De um modo geral, o uso combinado dos dois tipos de citocininas (BAP e KIN) propiciou bons resultados em termos de multiplicação e alongamento dos explantes, como pode ser visto na figura FIGURA 1. Nas condições testadas, não se registrou ocorrência de necrose nos ápices das brotações, que é um problema recorrente no cultivo in vitro de diferentes espécies de *Prunus*. Somado a isso, vale destacar que o tratamento M₃ mostrou-se eficiente para promover o alongamento dos explantes, característica necessária quando o material vegetal será destinado para a fase de enraizamento.



FIGURA 1 – Morfologia dos explantes de porta-enxerto de pessegueiro Tsukuba II cultivados em meio MS e suplementados com 0,2 mg L⁻¹ de BAP e KIN (M₃) após 22 dias de cultivo. (a) Aspecto geral dos explantes em frascos de subcultivos e (b) isolados em placas de petri.

4. CONCLUSÕES

O uso combinado de BAP e Cinetina favorece a indução de brotações axilares e o alongamento de explantes do porta-enxerto 'Tsukuba II' in vitro, não comprometendo o vigor dos explantes, para o sucessivo subcultivo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATLAS SOCIOECONÔMICO RIO GRANDE DO SUL. Disponível em <https://atlassocioeconomico.rs.gov.br/pesseg-e-banana>. Acesso em 13 de agosto de 2020.
- BARGHCHI, M., ALDERSON, P. G. The control of shoot tip necrosis in *Pistacia vera* L. In vitro. **Plant Growth Regulation**, v.20, p.31-35, 1996.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, p.1039-1042, 2011.
- JAIN, N.; BAIRU. M.W.; STIRK, W.A.; STADEN, J.V. The effect of medium, carbon source and explant on regeneration and control of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens*. **South African Journal of Botany**. p.75, 117–121. 2009.
- MAYER, N.A.; UENO, B.; FICHER, C.; MIGLIORINI, L.C. **Porta-enxertos clonais na produção de mudas de frutíferas de caroço**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Embrapa Clima Temperado. Pelotas, RS. 2015.
- MILLER, P.J.; PARFITT, D.E.; WEINBAUM, S.A. Outcrossing in peach. **HortScience**, v.24, p.359-360, 1989.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biomass with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-479, 1962.
- PHILLIPS, G.C.; GARDA, M. Plant tissue culture media and practices: An overview. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.55, p.242–257, 2019.
- RADMANN, E.B.; BIANCHI, V.J.; OLIVEIRA, R.P.; FACHINELLO, J.C. Multiplicação in vitro e alongamento das brotações micropagadas do porta-enxerto 'Tsukuba 1' (*Prunus persica* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.31, p.656–663, 2009.
- RITTERBUSCH, C.W.; LUCHO, S.R; RADMANN, E.B.; BIANCHI, V.J. Effect of cytokinins, carbohydrate source and auxins on in vitro propagation of the 'G x N-9' peach rootstock. **International Journal of Fruit Science**, v.21, p.1-13, 2020.
- SHA, L.; MCCOAWN, B.H.; PETERSON, L.A. Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot cultures. **Journal American Society Horticultural Science**, v.110, p.631–634, 1985.
- SILVA, J.A.T.; NEZAMI-ALANAGH, E.; BARREAL, M.E., KHER, M.M.; WICAKSONO, A.; GULYAS, A; GALLEG P.P.; DRIVER, J.A.; DOBRANSZKI, J. Shoot tip necrosis of in vitro plant cultures: a reappraisal of possible causes and solutions. **Planta**, v.252, p.1-35, 2020.
- SRIVASTAVA, A.; JOSHI. A.G. In vitro behavior of nodal explants of *Portulaca grandiflora* under the influence of cytokinins. **Acta Universitatis Latviensis**, v.753, p.43–48, 2009.