

# ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE PORTA-ENXERTO DE PESSEGUIERO EM DILUIÇÕES DO MEIO MS ACRESCIDO DE CONCENTRAÇÕES DE BAP

## ESTABLISHMENT *IN VITRO* OF PEACH ROOSTOCK IN DILUTIONS OF MS MEDIA SUPPLEMENTED WITH BAP CONCENTRATIONS

Paulo Sérgio Gomes da ROCHA<sup>1</sup>; Márcia Wulff SCHUCH<sup>2</sup>; Valmor João BIANCHI<sup>3</sup>; José Carlos FACHINELLO<sup>2</sup>; Claudete Clarice MISTURA<sup>4</sup>

1. Doutorando, Fruticultura de Clima Temperado, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel – FAEM, Universidade Federal de Pelotas – UFPel. [rocha@ufpel.tche.br](mailto:rocha@ufpel.tche.br). 2. Professor, Doutor, Departamento de Fitotecnia – FAEM – UFPel. 3. Professor, Doutor, Departamento de Botânica, Instituto de Biologia - IB– UFPel. 4. Estagiária do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Departamento de Botânica – IB – UFPel.

**RESUMO:** Este trabalho foi realizado na UFPEL/RS em 2005 e objetivou verificar o efeito da concentração do meio de cultura e BAP no estabelecimento *in vitro* do porta-enxerto de pessegueiro cv. Tsukuba. Os explantes tipo segmento nodal retirados da planta matriz, mantida em casa-de-vegetação, foram desinfestados com álcool 70%, por um minuto, e hipoclorito de sódio 1,5%, durante 15 minutos. Após, foram enxaguados três vezes com água destilada autoclavada, seccionados em segmentos nodais medindo 10 mm e contendo uma gema. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio com 8 mL de meio de cultura MS, MS ¾ e MS ½, acrescidos por 0,0; 0,4; 0,8 e 1,2 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 7,0 g L<sup>-1</sup> de ágar e o pH ajustado para 5,8. Os explantes foram cultivados em sala com 16 horas de fotoperíodo, luminosidade de 25 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e temperatura de 25 ± 1 °C. Após 30 dias, avaliaram-se a percentagem de contaminação bacteriana, percentagem de contaminação fúngica, percentagem de estabelecimento e comprimento médio da brotação. A maior percentagem de contaminação dos explantes observada (2,97%) foi causada por fungo. O tipo de meio de cultura e concentração de BAP não influenciou na percentagem de estabelecimento. As percentagens de estabelecimento obtidas foram altas (96,67% a 99,33%). O maior comprimento médio das brotações (5,0 mm e 4,5 mm) foi obtido nos meios de cultura acrescidos por 0,4 mg L<sup>-1</sup> e 0,8 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

**PALAVRAS-CHAVE:** Tsukuba, *Prunus*, Micropropagação. Produção de mudas. Porta-enxerto.

## INTRODUÇÃO

A falta de sementes de pessegueiro de boa qualidade genética e sanitária para a produção de porta-enxertos de *Prunus*, no Sul do Brasil, torna a técnica da cultura de tecidos uma alternativa promissora por esta possibilitar a produção de mudas sadias e uniformes em curto espaço de tempo se comparado com os métodos tradicionais de propagação (RODRIGUES et al., 1999; SCHWARTZ et al., 2000).

No entanto, na fase de estabelecimento *in vitro* dos porta-enxertos de *Prunus*, o alto percentual de contaminação (bacteriana e fúngica) e oxidação dos explantes são os principais problemas observados. Esta contaminação pode ser reduzida por meio da manutenção das plantas-matrizes em casa de vegetação e a realização periódica do controle fitossanitário das mesmas (COUTO et al., 2004).

Para a descontaminação dos explantes, normalmente são realizadas desinfestações com álcool (70% v/v) durante 10-60 segundos, seguido de hipoclorito de sódio (1,0-2,5%) durante 5-30 minutos com gotas de tensoativo (Tween-20) para favorecer a absorção. A concentração da solução

desinfestante e o tempo de desinfestação dependem do tipo e tamanho de explante utilizado (OLMOS et al., 2002; MROGINSKI et al., 2002).

Os explantes dos porta-enxertos de pessegueiro podem ser estabelecidos em diferentes tipos de meio de cultura (SILVA et al., 2003; RODRIGUES et al., 2003). Contudo, o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e suas diluições são os mais utilizados (SILVA, 2004).

Quanto ao explante para o estabelecimento *in vitro*, estes devem ser preferencialmente coletados a partir de brotações jovens, durante a fase de crescimento ativa da planta, ou seja, após o final do período de dormência, durante os meses mais quentes do ano (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Considerando-se o exposto, este trabalho teve por objetivo verificar o efeito do tipo de meio de cultura e concentração de BAP no estabelecimento *in vitro* do porta-enxerto de pessegueiro cv. Tsukuba.

## 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.

Plantas do porta-enxerto cv. Tsukuba mantidas em casa-de-vegetação foram pulverizadas duas vezes por semana com Terramicina ( $2,4 \text{ g L}^{-1}$ ) e Tiofanato metil ( $0,6 \text{ g L}^{-1}$ ) antes da coleta das brotações jovens. Após a desfolha das brotações, isolou-se segmento nodal com aproximadamente 10 mm. Os explantes isolados foram desinfestados com álcool 70%, por um minuto, e hipoclorito de sódio 1,5%, durante 15 minutos, em câmara de fluxo laminar. Após, foram enxaguados três vezes com água destilada autoclavada, seccionados em segmentos nodais com uma gema e medindo aproximadamente 10 mm.

Após desinfestação os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 8 mL de meio de cultura MS, MS  $\frac{3}{4}$  e MS  $\frac{1}{2}$  acrescidos por 0,0; 0,4; 0,8 e 1,2  $\text{mg L}^{-1}$  de BAP, 30  $\text{g L}^{-1}$  de sacarose, 100  $\text{mg L}^{-1}$  de mio-inositol e 7,0  $\text{g L}^{-1}$  de ágar. Antes da adição do ágar os meios de cultura tiveram o pH ajustado para 5,8. Após 30 dias de cultivo, avaliaram-se a percentagem de contaminação bacteriana, percentagem de contaminação fúngica, percentagem de estabelecimento e comprimento médio da brotação.

Utilizou-se um fatorial 4x3, sendo os fatores concentração de BAP e a concentração do meio de cultura, com quatro repetições por tratamento. Cada parcela constituiu de cinco tubos de ensaio com um explante cada. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Duncan, ou analisados por

regressão polinomial, através do programa estatístico Sanest (ZONTA; MACHADO, 1987).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maior percentagem de contaminação dos explantes observada foi causada por fungo (2,97%) e por bactéria (0,35%) (Tabela 1). Estes percentuais de contaminações foram inferiores aqueles obtidos SILVA et al. (2003) que estabeleceram *in vitro* os porta-enxertos Capdeboscq, GF677 e VP411, e obtiveram percentuais de contaminação que variaram de 14,8% a 29,8%, respectivamente. Os resultados deste experimento reforçam a importância de se manter a planta-matriz sob condições controladas (casa-de-vegetação) e de realizar periodicamente o controle fitossanitário das mesmas.

Os tratamentos tipo de meio de cultura e concentrações de BAP não influenciaram o percentual de estabelecimento dos explantes (Tabela 1 e Figura 1). Possivelmente, as fontes reservas existentes no tecido vegetal dos explantes, segmentos nodais retirados da planta matriz, foram drenadas para a brotação nova formada *in vitro* (Figura 2), contribuindo desta forma para igualar o percentual de estabelecimento dos explantes cultivados nos diferentes tratamentos.

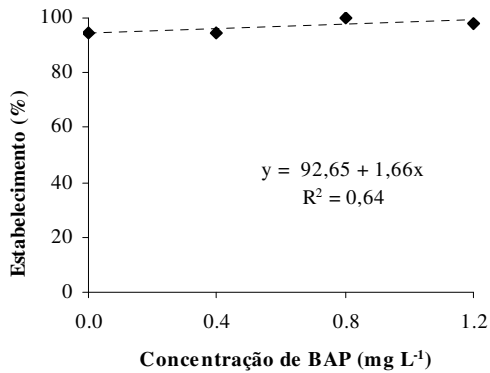
Tipo de meio	Contaminação fúngica (%)	Contaminação bacteriana (%)	Estabelecimento (%)	Comprimento médio da brotação (mm)
MS	2,13 a	0,35 a	96,67 a	4,32 a
MS $\frac{3}{4}$	0,67 a	0,00 a	99,33 a	4,33 a
MS $\frac{1}{2}$	2,94 a	0,00 a	97,09 a	3,67 a

**Tabela 1.** Percentagens de contaminação, estabelecimento e comprimento médio da brotação observadas aos 30 dias de cultivo na fase de estabelecimento *in vitro* do porta-enxerto cv. Tsukuba. UFPel, Pelotas-RS, 2005

\* Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

As percentagens de estabelecimento (Tabela 1) podem ser consideradas elevadas se comparadas com 62,9% obtido por SILVA et al. (2003) que trabalharam com os porta-enxertos Capdeboscq, GF677 e VP411 e 16,67% de estabelecimento por obtido por RODRIGUES et al. (1999) que trabalharam com os porta-enxertos GF 677, Marianna Comum e Mirabolano. Possivelmente, o maior percentual de

estabelecimento obtido no presente trabalho esteja associado ao período de coleta dos explantes na planta matriz, pois, na época em que os explantes foram coletados (verão), as plantas estavam em pleno desenvolvimento. Segundo Rodrigues et al. (2003) a época de coleta dos explantes exercem influência direta na capacidade de estabelecimento dos mesmos.



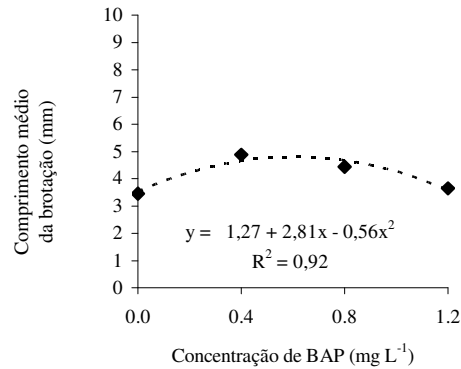
**Figura 1.** Percentagem de estabelecimento do porta-enxerto cv. Tsukuba, aos 30 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de BAP. UFPel, Pelotas-RS, 2005.



**Figura 2.** Brotação do porta-enxerto cv. Tsukuba estabelecida *in vitro* e ligada ao segmento nodal da planta matriz, aos 35 dias de cultivo. UFPel, Pelotas-RS, 2005.

Com relação ao comprimento médio da brotação, houve diferença significativa para o fator concentração de BAP. Observa-se um comportamento quadrático e os maiores comprimentos médios das brotações (5,0 mm e 4,5 mm) foram provenientes do cultivo em meios de

cultura acrescidos de 0,4 mg L<sup>-1</sup> e 0,8 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Figura 3). Esses comprimentos médios obtidos podem ser considerados pequenos, contudo é possível alongar as brotações estabelecidas realizando a transferência das mesmas para um meio de cultura sem BAP.



**Figura 3.** Comprimento médio da brotação do porta-enxerto cv. Tsukuba, aos 30 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de BAP. UFPel, Pelotas-RS, 2005.

### CONCLUSÕES

A manutenção das plantas em casa-de-vegetação e o tratamento com fungicida e bactericida, associada ao processo de desinfestação utilizado em laboratório é um método eficiente para reduzir a contaminação de explantes do porta-

enxerto cv. Tsukuba, durante a fase de estabelecimento *in vitro*;

As diluições do meio de cultura MS e as diferentes concentrações de BAP testadas não influenciaram significativamente o estabelecimento *in vitro* do porta-enxerto cv. Tsukuba.

**ABSTRACT:** This work was done at UFPel/RS in 2005, and had the aim of verifying the effect of the culture media and BAP concentrations in the establishment *in vitro* of peach rootstock cv. Tsukuba. The explants were nodal segments isolated from matrix plants maintained in greenhouse and were desinfested with alcohol 70% for one minute, and sodium hypochloride 1,5%, during 15 minutes. After, they were washed with autoclaved destilated water, cut in nodal segments with 10 mm of length and a bud. The explants were inoculated in 8 mL MS, MS  $\frac{3}{4}$  e MS  $\frac{1}{2}$ . Culture media added by 0,0; 0,4; 0,8 e 1,2 mg L<sup>-1</sup> of BAP, 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose, 100 mg L<sup>-1</sup> of mio-inositol, 7,0 g L<sup>-1</sup> of agar and pH adjusted to 5,8. The explants were cultivated in a room with 16 hours of photoperiod, lightness of 25  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and temperature of 25  $\pm$  1 °C. After 30 days, it was evaluated the percentage of bacterial and fungal contamination, percentage of establishment and shooting length. The highest percentage of explants contamination observed (2,97%) was caused by fungi. The type of culture media and BAP concentration had no influence in the establishment percentage. The highest establishment percentage obtained were high (96,67% to 99,33%). The highest shooting length (5,0 mm and 4,5 mm) was obtained in culture media added by 0,4 mg L<sup>-1</sup> and 0,8 mg L<sup>-1</sup> of BAP.

**UNITERMS:** Tsukuba. *Prunus*. Micropropagation. Plant stock production. Rootstock.

### REFERÊNCIAS

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, abr., 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 – CNPH, 1998. v. 1, p. 183–260.

MROGINSKI, L.; SANSBERRO, L.; FLASCHLAND, E. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. In: ECHENIQUE, V.; RUBINSTEIN, C.; MROGINSKI, L. **Biocología y Mejoramiento Vegetal**. Buenos Aires, Argentina: INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária). 2002. v. 1, p. 35-42.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-479, apr., 1962.

OLMOS, S.; LUCIANI, G.; GALDEANO, E. Micropropagación. In: ECHENIQUE, V.; RUBINSTEIN, C.; MROGINSKI, L. **Biología y Mejoramiento Vegetal**. Buenos Aires, Argentina: INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária). 2002. v. 1, p. 163-172.

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**, Cruz das Almas, v. 25, n. 1, p. 131-133, abr., 2003.

RODRIGUES, A. C.; FACHINELLO, J. C.; STRELOW, E.; FORTES, G. R. L. Estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* sp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 21, n. 2, p. 229-231, ago., 1999.

SCHWARTZ, E.; RONCATTO, G.; FORTES, G. R. L. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido utilizando 6-Benzilaminopurina e Ácido Naftalenoacético. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n. 1, p. 77-79, ago., 2000.

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

SILVA, A. L.; RAGALSK, M.; MORAES, L. K. A.; FESBILINO, C; CRESTANI, L.; GUERRA, M. P. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* sp, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 297-300, ago., 2003.

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