

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE PORTA-ENXERTOS DO GÊNERO *PRUNUS* SOB BAIXAS CONCENTRAÇÕES E DIFERENTES TIPOS DE AUXINAS¹

CARLOS AUGUSTO POSSER SILVEIRA², GÉRSO RENAN DE LUCES FORTES³, JOSÉ CARLOS FACHINELLO⁴,
ALEXANDRE COUTO RODRIGUES², IDEMIR CITADIN², ALBERTO CENTELLAS QUEZADA²,
JOÃO BAPTISTA DA SILVA⁵

RESUMO - Experimentos testando o tipo de auxina (AIB, AIA e ANA) e concentração (0; 0,01; 0,1 e 1,0 mM) foram realizados para cada um dos quatro porta-enxertos utilizados (G x N₂₂, Mr.S 2/5, Marianna e Mirabolano). Cada porta-enxerto constituiu-se num experimento, uma vez que, apesar de ser o mesmo meio básico, MS ¾, com exceção de Marianna, onde o meio foi o MS, as concentrações da citocinina BAP foram diferentes. A cada meio, foram adicionados os tipos e as concentrações das auxinas a serem testadas. Os porta-enxertos apresentaram comportamentos distintos quanto ao tipo e concentração das auxinas. O AIB e o AIA foram superiores ao ANA nas variáveis analisadas. Na fase de multiplicação, o 'Mirabolano' não respondeu a concentrações de auxinas de até 1,0 mM. O 'G x N₂₂' apresentou as melhores respostas na concentração de 0,01 µM de AIB ou AIA. O porta-enxerto Marianna respondeu positivamente a concentrações de auxinas entre 0,01 e 1,0 µM. O ANA não proporciona bons resultados na multiplicação *in vitro* de porta-enxertos do gênero *Prunus*, sendo muitas vezes superado pela testemunha.

Termos para indexação: auxinas; pessegueiro; cultura de tecidos; cultivo *in vitro*

IN VITRO MULTIPLICATION OF *PRUNUS* ROOTSTOCKS UNDER LOW CONCENTRATIONS AND DIFFERENT AUXINS

ABSTRACT - The experiments were carried out by testing the type of auxin (IBA, IAA and NAA) at four concentrations (0; 0.01; 0.1 and 1.0 µM) for each one of the four used rootstocks (G x N₂₂, Mr.S 2/5, Marianna and Mirabolano). Each rootstock performed a trial with the same basic medium (MS ¾) except for Marianna, which was carried out with MS; the BAP concentrations were different. To each medium, the different types and auxin concentrations were added to be tested. The rootstocks performed differently in relation to the type and auxin concentrations. The auxins IBA and IAA provided higher values than NAA for all the analyzed parameters. IBA or IAA provided the best responses at 0.01 mM for all the analyzed parameters of the rootstock G x N₂₂. Marianna showed the best responses at 0.01 – 1.0 µM. Mirabolano rootstock, had no significantly response to the type and auxin concentration. NAA, did not provide good results for *in vitro* multiplication of *Prunus* rootstocks, and it was overcome as a whole by the control.

Index terms: IBA; IAA; NAA; peach, tissue culture, *in vitro* culture

INTRODUÇÃO

Na multiplicação *in vitro*, além de determinar qual o melhor meio, tipo e concentração de citocinina, é necessário também estudar a interação desses últimos com as auxinas, a fim de melhorar os protocolos e otimizar os resultados. Quoirin & Lepoivre (1977) constataram que, embora nem sempre as auxinas sejam necessárias no meio de multiplicação, estes reguladores de crescimento são usados com o intuito de estimular o crescimento das partes aéreas. De acordo com Lundergan & Janick (1979), a presença de uma auxina no meio de multiplicação anula o efeito inibitório das citocininas sobre o alongamento dos explantes. Dentre as auxinas mais usadas nos meios de multiplicação, destacam-se ANA, AIB e AIA (Hu & Wang, 1983). Nos últimos anos, vários trabalhos vêm sendo feitos com diversas espécies do gênero *Prunus*, principalmente porta-enxertos, na tentativa de otimização dos protocolos de propagação *in vitro*. Dentre estes trabalhos destacam-se aqueles realizados por Dimassi-Theriou (1998), com o porta-enxerto Mr.S 2/5, e aqueles realizados por Rodrigues et al. (1999), com diversas espécies de *Prunus*, principalmente híbridos interespecíficos.

Este trabalho teve como objetivo determinar qual o tipo e concentração de auxina que, combinada com a citocinina BAP, proporciona melhores resultados na multiplicação *in vitro* de porta-enxertos do gênero *Prunus*.

MATERIALE MÉTODOS

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

foram utilizados: G x N₂₂, Mr.S 2/5, Mirabolano e Marianna. Os explantes usados foram segmentos nodais, originados 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. Para cada um dos porta-enxertos, foi usado um meio específico. Assim, para os porta-enxertos G x N₂₂ e Mr.S 2/5, foi usado o meio MS (Murashige & Skoog, 1962) com sais reduzidos a ¾ da concentração normal e adicionado 0,7 mg.L⁻¹ de BAP. Para o "Marianna", usou-se o meio MS completo com 0,7 mg.L⁻¹ de BAP, e para "Mirabolano", o meio usado foi o MS ¾ da concentração normal com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP. Em todos os meios, foram acrescidos 30 g.L⁻¹ de sacarose, 6,5 g.L⁻¹ de ágar e 100 mg.L⁻¹ de mioinositol. 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, nos quais colocou-se 30 ml de meio/frasco. Após, os mesmos foram autoclavados à temperatura de 121 °C durante 15 minutos. Posteriormente, foram colocados 5 (cinco) explantes em cada frasco. Após a colocação destes, os frascos foram levados para sala de crescimento sob condições de luz fluorescente com intensidade de 20 µE.m⁻².s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25±2°C, permanecendo nestas condições por período de 35 dias. Cada um dos porta-enxertos constituiu-se em um experimento, onde foram testados os tipos de auxinas e as concentrações. O delineamento experimental, em blocos casualizados com 4 (quatro) repetições, foi o mesmo para todos os experimentos, sendo cada unidade experimental constituída de um frasco contendo 5 (cinco) segmentos nodais. O delineamento de tratamento foi um fatorial 3x4, sendo os fatores Tipo de auxina (AIB, AIA e ANA) e Concentração de auxina (0,0; 0,01; 0,1 e 1,0 µM). A análise estatística dos dados foi feita através da análise da variação e discriminação da variação de trata-

1 (Trabalho 059/2002). Recebido: 23/03/2002. Aceito para publicação: 24/10/2002.

2 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: posser@ufpel.tche.br

3 Pós-graduando em Fruticultura de Clima Temperado, FAEM-UFPEL/Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.

4 Prof. Dr., Pesquisador Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.

5 Prof. Dr. FAEM/UFPEL, Pelotas, RS.

6 Prof. Livre Docente, IFM/UFPEL, Pelotas, RS.

mento pela comparação de médias através do teste de Duncan ($\alpha = 0,05$), para os fatores tipo de auxina e Concentração. Optou-se por realizar o teste de médias para o fator concentração, mesmo este sendo um fator quantitativo, e que normalmente é analisado pela regressão polinomial, visto que o objetivo do experimento não foi descobrir qual a concentração ótima de auxina, mas, sim, dentre aquelas concentrações testadas, qual a que possibilitaria os melhores resultados. O nível mínimo de significância adotado em todos os testes foi de 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). As análises estatísticas foram executadas pelo programa SANEST - Sistema de Análise Estatísticas para Microcomputadores (Zonta & Machado, 1984).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1 - Porta-enxerto G x N₂₂

Na Tabela 1, encontram-se os resultados da comparação de médias da variável número de gemas do porta-enxerto G x N₂₂. De modo geral, a concentração de 0,01 μM foi a melhor para as auxinas AIB e AIA, sendo aquela que possibilitou o maior número de gemas. Tais resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Ruzic et al. (1984). A auxina AIA apresenta instabilidade no meio de cultura, aliada à sua inativação ou destruição nas células, tornando-a uma auxina relativamente fraca, o que explica os melhores resultados serem obtidos em doses maiores do que aquelas das auxinas AIB e ANA, as quais, geralmente, são adicionadas nos meios de cultura em concentrações abaixo de 0,5 mg.L^{-1} (Grattapaglia & Machado, 1998). Tais hipóteses possibilitam compreender por que o AIA foi melhor que as outras auxinas também na maior concentração testada (1,0 μM) (Tabela 1).

TABELA 1 - Número médio de gemas do porta-enxerto G x N₂₂ em diferentes tipos e concentrações de auxina. FAEM/UFPEL - Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 1999.

Tipo de auxina	Concentração (M)			
	0,00	0,01	0,1	1,0
AIB	12,38 a B	15,23 a A	11,20 a B	7,39 b C
AIA	13,38 a AB	15,49 a A	10,03 a C	11,38 a BC
ANA	12,83 a A	11,17 b A	12,64 a A	6,45 b B

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

Na Tabela 2, pode-se observar que o tipo de auxina teve comportamento diferente nas diversas concentrações usadas, para o tamanho das brotações. Para o ANA, a maior concentração mostrou-se inferior às demais; estas, no entanto, não diferiram entre si. A partir destes resultados, pode-se notar que, para o AIB e o ANA, concentrações maiores que 0,01 μM interferiram negativamente nas variáveis número de gemas e tamanho das brotações, uma vez que apenas esta concentração (0,01 μM) otimizou os resultados. Segundo Ruzic et al. (1984), concentrações de auxinas maiores que 0,01 mM influenciam negativamente na taxa de multiplicação de híbridos de *Prunus*. Segundo Quoirin & Lepoivre (1977), as auxinas podem ser necessárias para a obtenção de melhores resultados na fase de multiplicação. Sendo elas necessárias nessa fase, suas concentrações devem ser muito baixas. Os resultados obtidos nesse experimento permitem afirmar que, dentre as concentrações testadas, independentemente do tipo de auxina, a concentração de 0,01 μM foi superior às demais. No entanto, em alguns casos, a concentração de 0,01 μM não diferiu da testemunha, o que permite supor que o porta-enxerto G x N₂₂ possui uma concentração endógena de auxina capaz de suprir suas necessidades durante a fase de multiplicação, necessitando de concentrações extremamente baixas para otimizar os resultados. Lundergan & Janick (1979) afirmam que as auxinas ajudam a aumentar o tamanho das brotações, diminuindo os efeitos de 'rosetamento' ou 'entufamento' causados pelas citocininas. No presente experimento, os dados de tamanho das brotações (Tabela 2) indicam

que a menor concentração possibilitou melhores respostas para essa variável. No entanto, de modo geral, não foram observadas diferenças significativas em relação à testemunha, reforçando a hipótese de que o 'G x N₂₂' apresenta um conteúdo endógeno de auxina satisfatório para a fase de multiplicação.

TABELA 2 - Tamanho médio das brotações (mm) do porta-enxerto G x N₂₂ em diferentes tipos e concentrações de auxina. FAEM/UFPEL - Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 1999.

Tipo de auxina	Concentração (M)			
	0,00	0,01	0,1	1,0
AIB	10,00 a AB	12,22 b A	7,11 b B	6,32 b B
AIA	10,32 a B	16,25 a A	9,79 ab B	11,13 a B
ANA	11,97 a A	9,35 b AB	13,02 a A	6,50 b B

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

Experimento 2 - Porta-enxerto Mr.S 2/5

Para este porta-enxerto, as auxinas AIB e AIA não diferiram entre si, sendo ambas superiores ao ANA (Tabela 3). Rodrigues et al. (1999), trabalhando com o 'Mr.S 2/5', conseguiram em torno de 30 gemas/explante. No presente experimento, o número médio de gemas obtidas foi muito baixo no melhor tratamento (10,35 gemas/explante). Tal comportamento parece estar relacionado com a fase anterior, de onde foram retirados os explantes. Estes explantes foram obtidos a partir de material que vinha sendo intensivamente subcultivado na presença de concentrações moderadas (0,7 mg.L^{-1}) e sucessivas de BAP. Essa condição pode ter provocado um efeito tóxico sobre os explantes, impedindo, dessa forma, o seu desenvolvimento em cultivos subsequentes. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), o efeito das citocininas não se restringe a um único subcultivo, já que por vezes, se observa um efeito residual de um subcultivo para outro. Não foi encontrada nenhuma referência sobre o número máximo de subcultivos para o Mr.S 2/5. Entretanto, para outras espécies essa informação existe; é o caso do morangueiro, o qual, segundo Boxus (1986) não deve ser multiplicado por mais de cinco subcultivos consecutivos na presença de citocininas, sob o risco de as plantas apresentarem distúrbios fisiológicos. É possível que os resultados obtidos possam estar relacionados com o elevado número de subcultivos (mais de 10) a que vinha sendo submetido o porta-enxerto Mr.S 2/5, já que, segundo Dimassi-Theriou (1998), este porta-enxerto é bastante usado na Europa, apresentando bons resultados no processo de multiplicação *in vitro*.

TABELA 3 - Número médio de gemas do porta-enxerto Mr.S 2/5 em três tipos de auxinas FAEM/UFPEL - Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 1999.

Tipo de auxina	Número médio de gemas
AIB	10,35 a
AIA	9,50 a
ANA	8,06 b

Média seguida de mesma letra, na coluna, não difere entre si, pelo teste de Duncan ($\alpha = 0,05$).

Experimento 3 - Porta-enxerto Marianna

Nas Tabelas 4 e 5, encontram-se os dados do número de gemas e de brotações, respectivamente, para o porta-enxerto Marianna. Analisando a Tabela 4, constata-se que as auxinas AIB e AIA não diferiram entre si, sendo ambas superiores ao ANA, o mesmo ocorrendo para a variável número de brotações (Tabela 5). Apenas a testemunha foi significativamente inferior às demais concentrações. No atual experimento, os explantes foram retirados de material propagativo que fora subcultivado por mais de 10 vezes. Rodrigues et al. (1999), trabalhando com este porta-enxerto, obtiveram melhores resultados; no entanto, o número de subcultivos não passou de 5 (cinco). Boxus (1986) observou que, além da redução na concentração de BAP no meio de multiplicação,

é interessante limitar o número de subcultivos entre o isolamento do meristema e a produção da muda.

Experimento 4 - Porta-enxerto Mirabolano

Em observações preliminares, testando tipos de meios e concentrações de BAP, observou-se que 'Mirabolano' não demonstrou diferenças nas diversas combinações desses dois fatores. No entanto, esperava-se que, no caso do atual experimento, isto não ocorresse, já que as doses de auxina usadas foram desde zero (ausência de auxina) até concentrações altas (1,0 μ M) para a fase de multiplicação. Com isso, pretendia-se encontrar o melhor balanço auxina/citocinina. Quoirin & Lepoivre (1977) afirmam que, embora nem sempre as auxinas sejam necessárias no meio de multiplicação, elas são usadas para estimular o crescimento das partes aéreas. Os resultados obtidos com esse porta-enxerto indicam que mais estudos na fase de multiplicação devem ser feitos, baseados principalmente no balanço auxina/citocinina, visto que, para os tipos e concentrações usados, não houve resposta no desenvolvimento dos explantes. Ao que parece, as concentrações de auxina a serem testadas, mesmo na fase de multiplicação, deverão ser maiores do que as usadas neste experimento para o sucesso na multiplicação do 'Mirabolano'.

TABELA 4 - Número médio de gemas do porta-enxerto Marianna em três tipos de auxinas. FAEM/UFPel - Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 1999.

Tipo de auxina	Número médio de gemas
AIB	12,64 a
AIA	12,04 a
ANA	10,15 b

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Duncan ($\alpha = 0,05$).

TABELA 5 - Número médio de brotações do porta-enxerto Marianna em diferentes tipos e concentrações de auxinas. FAEM/UFPel - Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 1999.

Tipo de auxina	Concentração (M)				Média
	0,00	0,01	0,1	1,0	
AIB	1,08	1,58	1,77	1,64	1,52 a
AIA	1,20	1,18	1,59	1,30	1,32 a
ANA	1,00	1,09	1,30	1,25	1,16 b
Média	1,09 B	1,28 AB	1,55 A	1,40 A	1,33

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

CONCLUSÕES

- As auxinas AIB e AIA são superiores à ANA nas variáveis analisadas (número de gemas e de brotações, tamanho das brotações).
- Na fase de multiplicação, 'Mirabolano' não responde às concentrações de auxinas de até 1,0 mM.
- O 'G x N₂₂' apresenta melhores respostas na concentração de 0,01 mM de AIB ou AIA.

d) O 'Marianna' responde positivamente à concentração de auxina entre 0,01 e 1,0 mM.

e) A auxina ANA não proporciona bons resultados na multiplicação de porta-enxertos de *Prunus*.

f) Número de subcultivos elevados (mais de 10) afetam negativamente a multiplicação *in vitro* de porta-enxertos do gênero *Prunus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOXUS, P. Comportement du fraisier issu de micropropagation *in vitro*. **Agricontact**, v.176, p.6, 1986.
- DIMASSI-THERIOU, K. Response of increasing rates of NaCl or CaCl₂ and proline on "Mr.S 2/5" (*Prunus cerasifera*) peach rootstock cultured *in vitro*. **Advances in Horticultural Science**, Firenze, v.12, p.169-174, 1998.
- GRATTAPAGLIA, D., MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A., eds. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas, V.1**, Brasília, Serviço de Produção de Informação, 1998. p.183-260.
- GRATTAPAGLIA, D., ASSIS, T.F., CALDAS, L.S. Efeito residual de BAP (6-benzilaminopurina) e NAA (ácido naftaleno acético) na multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 2, 1987, Brasília, DF. **Resumos...** Brasília, 1987, p.8.
- HU, C.Y., WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y., ed. **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. New York: Macmillan, 1983. p.117-227.
- 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.
- LUNDERGAN, C., JANICK, J. Low temperature storage of *in vitro* apple shoots. **HortScience**, Alexandria, v.14, p.514, 1979.
- NIEUWKERK, J.P., ZIMMERMAN, R.H., FORDHAM, I. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v.21, p.516-518, 1986.
- QUOIRIN, M., LEPOIVRE, P. Étude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.78, p.437-442, 1977.
- RODRIGUES, A.C., SILVEIRA, C.A.P., FORTES, G.R. de L., FACHINELLO, J.C., da SILVA, J.B. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Prunus* sp. em diferentes meios de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal (No prelo, protocolo 002/2001).
- RUZIC, D., ROSATI, P., MARINO, G. Effetto dei fitoregolatori nella micropropagazione dell'ibrido pesco x mandorlo GF 677. **Rivista della Ortoflorofruticoltura Italiana**, Firenze, v.68, p.413-422, 1984.
- SMITH, R.H., MURASHIGE, T. *In vitro* development of the isolated shoot apical meristem of angiosperms. **American Journal of Botany**, Bronx, v.57, p.562-568, 1970.
- TABACHNICK, L., KESTER, D.E. Shoot culture of almond peach hybrid clones *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v.12, n.6, p.545-547, 1977.
- ZONTA, E.P. & MACHADO, A.A. SANEST - Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores. Pelotas-UFPel, 1984. 75p.