

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DA AMEIXEIRA ‘SANTA ROSA’: EFEITO DA CITOCININA BAP¹

MARCELO ROGALSKI², MIGUEL PEDRO GUERRA³, APARECIDO LIMA DA SILVA⁴

RESUMO – A ameixeira ‘Santa Rosa’ apresenta alta produtividade, ótimo sabor e aparência dos frutos para a comercialização. No entanto, por ser altamente suscetível à escaldadura das folhas (*Xylella fastidiosa* Wells), esta variedade apresenta problemas de cultivo no sul do Brasil. As técnicas de cultura *in vitro* permitem propagar e rapidamente espécies de interesse, além de permitir a limpeza de patógenos e a produção de matrizes com qualidade genética e sanitária comprovada. Porém, o uso prático da propagação *in vitro* requer a otimização das condições de cultura para cada espécie e/ou variedade. Dentre os fatores que mais influenciam a micropropagação, estão as citocininas, com destaque para o BAP. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o potencial de multiplicação *in vitro* da ameixeira ‘Santa Rosa’ sob diferentes concentrações de BAP. Após três subculturas em meio MA1, segmentos nodais com 0,5-1,0 cm foram submetidos a diferentes concentrações de BAP (0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 mg.L⁻¹). Os resultados mostraram que não ocorreram diferenças significativas no número de brotos para as diferentes concentrações de BAP testadas. No entanto, o maior número de brotos por explante (3,6) obteve-se na concentração de 2,0 mg.L⁻¹ e a maior altura média dos brotos foi obtido na concentração de 0,5 mg.L⁻¹ de BAP. Concentrações maiores que a 0,5 mg.L⁻¹ de BAP inibiram o crescimento dos brotos. A micropropagação da ameixeira ‘Santa Rosa’ a partir de ápices caulinares e gemas laterais em meio de cultura MA1 mostrou-se eficaz.

Termos para indexação: *Prunus salicina*, reguladores de crescimento, meio de cultura, micropropagação.

IN VITRO MULTIPLICATION OF ‘SANTA ROSA’ PLUM: EFFECT OF CYTOKYNIN BAP

ABSTRACT - The ‘Santa Rosa’ plum presents high productivity, great flavor and appearance of fruits. However, this cultivar is highly susceptible to the leaf scald (*Xylella fastidiosa* Wells). This problem is a serious limitation in the orchard management in the South of Brazil. Plant tissue culture techniques allow the mass clonal propagation of disease free and elite genotypes. The practical use of micropropagation techniques relies on the establishment of suitable protocols. Among the factors that affect this efficiency is the correct definition of the cytokinin type and level. Thus, the objective of this work was to evaluate the *in vitro* multiplication of ‘Santa Rosa’ plum under different concentrations of BAP. After three subcultures in the culture medium MA1, nodal segments of 0.5-1.0 cm long were inoculated in culture medium supplemented with different levels of BAP (0.5, 1.0, 2.0 and 3.0 mg.L⁻¹). The results showed that there were not significant differences in the multiplication rate affected by BAP. However, that the highest regeneration rate (3.6) was obtained in response to the level 2.0 mg.L⁻¹ of BAP. Also, the largest shoot height value was obtained in response to the level 0.5 mg.L⁻¹ of BAP. The results obtained showed that the micropropagation of ‘Santa Rosa’ plum is feasible.

Index terms: *Prunus salicina*, plant growth regulators, culture medium, micropropagation.

No Brasil, a cultura da ameixeira japonesa (*Prunus salicina* Lindl.) ocupa atualmente uma área de 3.920 hectares, com uma produção de 31.700 toneladas de frutos. No Sul do País, o cultivo desta frutífera destaca-se como uma atividade de alta densidade econômica e uso intensivo de mão-de-obra, constituindo-se numa importante opção para viabilizar uma agricultura familiar e sustentável (Epagri, 2001).

No entanto, a cultura da ameixeira está seriamente ameaçada pela escaldadura das folhas, uma doença endêmica, causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* Wells. A transmissão desta ocorre através de material de propagação, via enxertia, e/ou por insetos (cigarrinhas da família Cicadellidae) no pomar (Ducroquet et al., 2001).

No Estado de Santa Catarina, a variedade Santa Rosa apresenta alta produtividade, ótimo sabor e aparência dos frutos com excelentes perspectivas para a comercialização, sendo a cultivar de maior interesse para novos plantios, porém, é a mais suscetível à escaldadura das folhas (Epagri, 2001; Ducroquet et al., 2001).

Dentre as medidas para sanar o problema, as mais eficientes constam a eliminação da bactéria para um programa de certificação de matrizes e produção de mudas; o plantio de cultivares resistentes; o melhoramento genético de variedades suscetíveis e/ou a introgressão de genes de resistência através da transformação genética.

Neste contexto, as técnicas de cultura *in vitro* são de fundamental importância, pois através destas é possível propagar de forma rápida espécies e/ou variedades de interesse e ainda, podem servir como ferramenta auxiliar na eliminação de patógenos, obtendo assim matrizes com qualidade genética e sanitária comprovada.

No entanto, para o uso prático da micropropagação é necessário otimizar as condições de cultura para cada espécie e/ou variedade. Dentre os fatores que mais influenciam para a maximização do potencial

genotípico na multiplicação *in vitro*, estão os fitoreguladores, em especial as citocininas, como a 6-benzilaminopurina (Leontiev-Orlov et al., 2000a; Leontiev-Orlov et al., 2000b; Pérez-Tornero et al., 2000).

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o potencial de multiplicação *in vitro* da ameixeira (*Prunus salicina* Lindl.) ‘Santa Rosa’ sob diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP).

Para o estabelecimento *in vitro* foram utilizados como explantes ápices caulinares e gemas laterais de ameixeira (*Prunus salicina* Lindl.) ‘Santa Rosa’, obtidos a partir de plantas matrizes, mantidas em casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia, CCA/UFSC. O processo de desinfestação dos explantes foi realizado com as seguintes etapas: 5 minutos em solução água + Tween 20 (10 gotas.L⁻¹); lavagem em água corrente; 2 minutos em álcool 70%; 15 minutos em hipoclorito de sódio 1,5% e em câmara de fluxo laminar três lavagens em água destilada autoclavada.

Os explantes foram introduzidos em meio de cultura MA1 para a cultura *in vitro* de Prunáceas. A composição mineral e orgânica é a seguinte: NH₄NO₃ (50 mg.L⁻¹); KNO₃ (1000 mg.L⁻¹); Ca(NO₃)₂.6H₂O (1600 mg.L⁻¹); Mg(NO₃)₂.6H₂O (257 mg.L⁻¹); MgSO₄.7H₂O (360 mg.L⁻¹); KH₂PO₄ (170 mg.L⁻¹); micronutrientes e vitaminas de Lepoivre (Quoirin et al., 1977) suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP), sacarose (20,0 g.L⁻¹) e ágar (7,0 g.L⁻¹). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,5-5,6 antes da autoclavagem a 121°C por 15 minutos.

Após três subculturas em fase de multiplicação, segmentos nodais com 0,5-1,0 cm foram introduzidos em meios de cultura suplementados com diferentes concentrações de BAP (0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 mg.L⁻¹). As avaliações realizaram-se após 21 dias de cultura *in vitro*, levando em consideração número e altura dos brotos por explante. A variável altura de brotos foi mensurada, por meio de um paquímetro,

¹ (Trabalho 159/2002). Recebido: 26/09/2002. Aceito para publicação: 28/05/2003.

² Biólogo, Mestre, Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Fitotecnia, C.P. 476, 88049-900, Florianópolis, SC, (48) 331-5330.

³ Professor Titular, Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Fitotecnia, C.P. 476, 88049-900, Florianópolis, SC, (48) 331-5330.

⁴ Prof. Adjunto, Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Fitotecnia, C.P. 476, 88049-900, Florianópolis, SC, (48) 331-5330, alsilva@cca.ufsc.br

avaliando-se todas as brotações por explante para cada tratamento e repetições. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso com quatro tratamentos, cinco repetições e cada unidade experimental (frasco) composta de cinco explantes. Os dados não transformados foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e ao teste de separação de médias SNK (5%). Os valores do efeito do BAP para altura de brotos foram submetidos à análise de regressão polinomial, de acordo com Sokal e Rohlf (1995).

Todas as fases do presente estudo foram conduzidas em câmara de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $40\text{--}45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias.

O efeito das diferentes concentrações de BAP para o número de brotos por explante é mostrado na Tabela 1. Não ocorreram diferenças significativas no número de brotos para as diferentes concentrações de BAP testadas. No entanto, o maior número de brotos obteve-se na concentração de $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$, com uma taxa de multiplicação de 3,6 brotos por explante.

As taxas de multiplicação observadas podem ser consideradas adequadas para a micropropagação desta variedade. Os resultados verificados para o número de brotos por explantes estão dentro dos valores citados na literatura para as diferentes espécies do gênero *Prunus* (Parfitt e Almehdi, 1986; Harada e Murai, 1996; Pérez-Tornero et al., 2000). Na multiplicação *in vitro* de pessegueiro Parfitt e Almehdi (1986) observaram uma variação de 1,3 a 9,9 brotos por explante. Variedades de *Prunus domestica* e *Prunus cerasus* resultaram em taxas de multiplicação *in vitro* de 9,8 a 22,6 brotos por explante (Leontiev-Orlov et al., 2000b). Arena e Caso (1992), Leontiev-Orlov et al. (2000b), Pérez-Tornero e Burgos (2000) sugeriram que as diferenças observadas nas taxas de multiplicação *in vitro* para espécies e/ou variedades de *Prunus* são freqüentemente atribuídas ao genótipo.

Com relação ao efeito da citocinina (BAP) na proliferação de brotos, Pérez-Tornero et al. (2000) verificaram que as concentrações de $0,4$ e $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP possibilitaram os melhores resultados na multiplicação *in vitro* de *Prunus armenica* L. No entanto, Rogalski (2002) observou que a taxa de multiplicação *in vitro* foi superior para o porta-enxerto de *Prunus* 'Capdeboscq' nas concentrações de $1,0\text{--}2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP. Em ameixeira européia (*Prunus domestica*) os resultados superiores de multiplicação *in vitro* foram observados com o uso de $0,5$ e $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP (Leontiev-Orlov et al., 2000a).

A altura média dos brotos apresentou diferenças significativas em resposta às diferentes concentrações de BAP testadas (Tabela 1). A maior altura média dos brotos foi obtida em resposta à concentração de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, ocorrendo uma redução nos valores para esta variável proporcionalmente ao aumento na concentração de BAP (Figura 1). O ajuste da equação de regressão permitiu inferir que a concentração ótima testada foi de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, com uma altura média de $6,0 \text{ mm}$ por broto.

TABELA 1 - Efeito do BAP no número e altura de brotos (mm) da ameixeira 'Santa Rosa', após 21 dias em cultura *in vitro* em meio MA1.

BAP (mg.L^{-1})	Número brotos	Altura brotos (mm)
0,5	2,8 a	6,0 a
1,0	3,3 a	5,5 a
2,0	3,6 a	4,5 b
3,0	3,5 a	3,8 b
teste F	0,9	10,4
CV (%)	23,0	12,2

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem significativamente pelo teste SNK (5%).

Estes resultados são similares àqueles obtidos por Leontiev-Orlov et al. (2000b) e Pérez-Tornero et al. (2000), que observaram que doses crescentes de citocininas inibiram o alongamento das brotações em Prunáceas. Rogalski (2002), na multiplicação *in vitro* de pessegueiro,

obteve maior altura de brotos com uso de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP. Já Leontiev-Orlov et al. (2000a) verificaram que em ameixeira européia 'Kantimirovskaja' a utilização de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de '2iP-ribose' [N^6 -(2-isopentenil) adenosina] proporcionou maior altura das brotações.

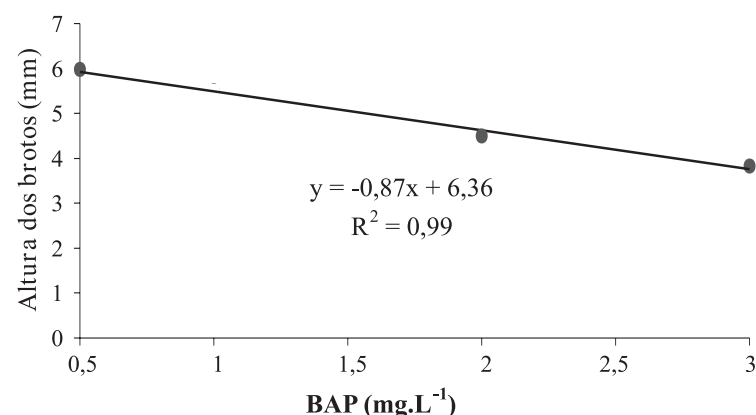


FIGURA 1 - Efeito de diferentes concentrações de BAP na altura média dos brotos (mm) da ameixeira 'Santa Rosa', após 21 dias em cultura *in vitro* em meio MA1.

Os resultados encontrados na literatura de inibição do alongamento dos brotos pelo BAP foram confirmados no presente trabalho quando se considera o ajuste da equação de regressão (Figura 1), que revelou que a ameixeira 'Santa Rosa' apresentou a maior altura dos brotos com a menor concentração de BAP testada.

Uma correlação negativa foi observada entre altura de brotos e concentração de BAP ($R^2=0,61$; $F=12,5$; $p<0,05$), revelando que o aumento nos níveis de BAP reduziu o crescimento dos brotos.

Em conclusão, os resultados obtidos no presente trabalho revelaram que para a micropropagação da ameixeira 'Santa Rosa' é possível a obtenção de uma taxa média de regeneração de 3,6 brotos/explante em resposta ao nível de $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP. Concentrações maiores que $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ deste fitorregulador reduziram a altura média dos brotos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARENA, M.E.; CASO, O.H. Factores que afectan la multiplicación *in vitro* de los brotes de portainjertos de *Prunus* ΦYTON, Buenos Aires, v.53, p.29-38, 1992.
- DUCROQUET, J.P.H.J.; ANDRADE, E.R. de; HICKEL, E.R. **A Escaladadura das folhas da ameixeira em Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri, 2001.55p.
- EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA S.A.(Epagri). **Frutas de Clima Temperado**: situação da safra 1999/2000 e previsão da safra 2000/2001. Videira: Epagri, 2001.21p.
- HARADA, H.; MURAI, Y. Micropropagation of *Prunus mume* **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.46, p.265-267, 1996.
- LEONTIEV-ORLOV, O.; MOSSI, A. J.; CANSIAN, R.L.; ROGALSKI, M.; VENDRUSCOLO, T. Diferentes reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de ameixeira (*Prunus domestica* L.) cultivar Kantimirovskaja, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n.2, p.268-271, 2000a.
- LEONTIEV-ORLOV, O.; ROGALSKI, M.; MOSSI, A.J.; CANSIAN, R.L. 6-Benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de prunáceas (*Prunus* sp.), **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.6, p.63-67, 2000b.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissues 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.
- PÉREZ-TORNERO, O.; LOPEZ, J.M.; EGEA, J.; BURGOS, L. Effect of

- basal media and growth regulators on the *in vitro* propagation of apricot (*Prunus armenica* L.) cv. Canino. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v.75, p.283-286, 2000.
- QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P.; BOXUS, P. Un premier bilan de 10 années de recherches sur les cultures de méristèmes et la multiplication *in vitro* de fruitiers ligneux. **Comptes Rendus des Recherches Agronomiques**, Gembloux, p.93-117, 1977.
- ROGALSKI, M. **Propagação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus*: cultura de embriões, estabelecimento, multiplicação, enraizamento e aclimatização**. 2002. 93 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.
- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**. 3. ed. New York: W.H. Freeman and Company San, 1995. 776 p.