

6-BENZILAMINOPURINA (BAP) NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE PRUNÁCEAS (*Prunus* sp.)

LEONTIEV-ORLOV, Oleg; ROGALSKI, Marcelo; MOSSI, Altemir J. & CANSIAN, Rogério L.

URI – Campus de Erechim, Departamento de Ciências Biológicas e Agrárias, Laboratório de Biotecnologia Vegetal; Av. Sete de Setembro, 1621; Caixa Postal, 743; CEP 99700 – 000 – Erechim/RS, biotecnologia@uri.com.br
(Recebido para publicação em 19/01/2000)

RESUMO

Avaliou-se a influência de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de Prunáceas (*Prunus* sp.) vars. *Eliscevskaia*, *Jaichnaja simija*, *Kantimirovskaia* e *Mirobalan*. Utilizou-se o meio MS acrescido de sacarose 30g.L⁻¹ e das seguintes concentrações de BAP 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0mg.L⁻¹. Os explantes utilizados foram brotos com 0,5 a 1cm de comprimento e com três a quatro gemas. O cultivo realizou-se em câmara de crescimento com temperatura de 22 a 24°C, fotoperíodo de 16 horas e iluminação 25µmol.m⁻².s⁻¹. O delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições. Cada unidade experimental foi composta por cinco explantes. As avaliações foram realizadas após 30 dias de cultivo, levando em consideração: quantidade de brotos por explante, comprimento dos brotos por explante, comprimento médio dos brotos, quantidade de gemas por explante e quantidade de gemas por broto. As melhores concentrações de BAP foram: quantidade de brotos por explante 0,75mg.L⁻¹ para as quatro variedades em média; comprimento médio dos brotos e quantidade de gemas por broto 0,25mg.L⁻¹ para as quatro variedades; comprimento dos brotos por explante e quantidade de gemas por explante não houve diferença estatística entre as concentrações testadas para as quatro variedades.

Palavras-chave: 6-benzilaminopurina, multiplicação *in vitro*, *Prunus* sp.

ABSTRACT

6-BENZYLAMINOPURINE (BAP) "*IN VITRO*" MULTIPLICATION OF *PRUNUS* SP. The influence of different concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP) was evaluated on *in vitro* multiplication of *Prunus* sp., vars. *Eliscevskaia*, *Jaichnaja simija*, *Kantimirovskaia* and *Mirobalan*. A MS medium was used added sucrose 30g.L⁻¹ and concentrations of BAP as follows: 0.25; 0.5; 0.75 and 1.0 mg.L⁻¹. The explants consisting of microshoots 0.5-1 cm length with 3-4 buds. Were cultivated in growth house with temperature of 22-24 °C, photoperiod of 16 hours and illumination of 25µmol.m⁻².s⁻¹. Each experimental unit was consisting of five explants, with 4 repetitions. The evaluation was realized after 30 days of culture, carried in consideration: shoots by explant, length of shoots by explant, length medium of the shoots, buds by explant and buds by shoot. The results accused what the best concentrations of BAP were: shoots by explant 0.75mg.L⁻¹ for the four varieties in medium; length medium of the shoots and buds by shoot 0.25mg.L⁻¹ for the four varieties; length of the shoots by explant and buds by explant not has different statistic in the concentrations tested for the four varieties.

Key words: 6-benzylaminopurine, *in vitro* multiplication, *Prunus* sp.

INTRODUÇÃO

A ameixeira pertence a família das rosáceas e ao gênero *Prunus*, com diversas espécies, entre elas *Prunus salicina* (ameixa japonesa), *Prunus domestica* (ameixa européia),

Prunus persica (pêssego) e *Prunus avium* (cereja).

O Brasil não figura como grande produtor destas frutas, sendo inclusive importador das mesmas. As variedades aqui cultivadas ainda apresentam uma baixa qualidade de fruto, não conseguindo competir com as importadas, em tamanho, aparência, sabor e tempo de conservação dos frutos. Porém, as condições climáticas do Sul do Brasil são semelhantes às das regiões de cultivo de pêssego e ameixa na Europa e América do Norte, propiciando boas perspectivas para se aumentar consideravelmente a produção e a qualidade dos frutos aqui produzidos. No Estado do Rio Grande do Sul diversas cultivares vem sendo cultivadas, especialmente na região serrana do estado, entre elas pode-se citar as cultivares Amarelinha, Ozark Premier, Santa Rita, Santa Rosa (GRELLMANN & SIMONETTO, 1995).

Atualmente existe a possibilidade de micropropagação de muitas culturas. Entretanto, a elevada variabilidade de comportamento de espécies *in vitro* faz com que seja necessário escolher condições de cultivo para cada variedade, pois não são todas as variedades de ameixa que demonstram grande coeficiente de propagação *in vitro*, (DRUART & GRUSELL, 1985; MORINI & LORETTI, 1991). Os meios de cultura utilizados para a micropropagação de ameixeiras, como o meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) não garante grande coeficiente de propagação para explantes desta cultura, (PEVALEK-KOZLINA & JELASKA, 1987; ZILKAH, 1993; RAJASHEKAR *et al.*, 1995).

Para a realização mais completa do potencial biológico destes cultivos *in vitro*, é necessário investigar sob todos os aspectos a otimização das condições de microcultivo, como por exemplo: concentrações de fitorreguladores (ALDERSON *et al.*, 1987; AMBROZIC-TURK *et al.*, 1991; HAMMATT, 1994); uso de diferentes tempos de passagem (BORKOWSKA, 1985; MORINI & LORETTI, 1991); diferentes subculturas e tempos de passagem (NIELSEN *et al.*, 1995); melhora das condições de cultivo (SCIUTTI & MORINI, 1993); e estudo de problemas relacionados com vitrificação com o uso de citocininas (AMBROZIC-TURK *et al.*, 1991).

Segundo GRATTAPAGLIA & MACHADO (1998), as citocininas são indispensáveis para a quebra de dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares. O tipo de citocinina e a sua concentração são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*. O BAP tem sido muito eficaz para promover multiplicação em diversas espécies e parece ser a citocinina por excelência para a multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias, além de ser a mais barata de todas. Porém, seu excesso é tóxico e caracteriza-se, principalmente, pela falta de alongamento das culturas, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento exagerado dos caules e vitrificação generalizada, o que leva a sérios problemas na fase de enraizamento.

Frente ao exposto avaliar a influência de diferentes concentrações de Benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de prunáceas (*Prunus* sp.), variedades Eliscevskaia, Jaichnaja simija, Kantimirovskaia e Mirobalan.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Campus de Erechim, RS. Utilizou-se o meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescido de sacarose (30g.L⁻¹), ágar (0,5%) e 6-benzilaminopurina (BAP) nas seguintes concentrações: 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0mg.L⁻¹. O delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições, com unidades experimentais de cinco explantes (frasco). O pH foi ajustado para 5,6 antes da esterilização em autoclave.

Os explantes, constituídos de brotos de 0,5 a 1cm de comprimento e com três a quatro gemas das variedades Eliscevskaia, Jaichnaja simija, Kantimirovskaia e Mirobalan, introduzidos em frascos com capacidade de 200mL, contendo 30mL de meio. A operação de plantio *in vitro* foi realizada assepticamente. O cultivo foi conduzido em câmara de crescimento com temperatura variando entre 22 a 24 °C, fotoperíodo de 16 horas e iluminação de 25 µmol.m⁻².s⁻¹.

As avaliações foram realizadas após 30 dias de cultivo, levando em consideração a quantidade de brotos por explante, comprimento dos brotos por explante (mm), comprimento médio dos brotos (mm), quantidade de gemas por explante e quantidade de gemas por broto. Para a análise estatística utilizou-se o método de análise de significância (ANOVA) e o teste de Tukey para comparação de médias, calculados através do programa SPSS (SPSS Inc., Release 6.0.1, 1993).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a variável quantidade de brotos por explante não houve diferenças estatísticas para as variedades Eliscevskaia, Jaichnaja simija e Kantimirovskaia, em relação as concentrações testadas. A variedade Mirobalan apresentou melhor resultado na concentração de 0,75mg.L⁻¹ de BAP (Figura 1a). Em relação a média das concentrações de BAP testadas Mirobalan foi a variedade que mais apresentou brotações por explante com 22,6 brotos, seguida da variedade Kantimirovskaia com 18,5 brotos, da variedade Jaichnaja

simija com 16,8 brotos e da variedade Eliscevskaia com 9,8 brotos por explante (Tabela 1). Em relação a resposta das diferentes concentrações de BAP testadas em média para as quatro variedades, a concentração de 0,75mg.L⁻¹ foi a melhor, apresentando um maior número de brotos por explante (Tabela 2). Os resultados obtidos estão de acordo com outros autores. MORINI & LORETTI (1991) obtiveram bons resultados na multiplicação de porta-enxertos de ameixa utilizando 0,4mg.L⁻¹ de BAP, enquanto que ALDERSON *et al.* (1987) e ARENA & CASO (1992); obtiveram melhores resultados com 1mg.L⁻¹ de BAP. MARTINELLI (1985), em experimento avaliado após duas semanas, obteve uma média de três brotos por explante na multiplicação de híbridos de pêssago, usando concentrações de 0,6 a 1mg.L⁻¹ de BAP. HAMMERSCHLAG *et al.* (1987), descrevem uma maior proliferação de brotos na multiplicação *in vitro* de pêssago com 4mg.L⁻¹ de BAP, porém com ocorrência de necrose no ápice dos brotos. As diferenças encontradas por distintos autores podem estar relacionadas ao fator genético, uma vez que todos os trabalhos utilizaram cultivares diferentes. Confirmando os resultados dos estudos de outros autores o fator genético foi importante na determinação do número de brotações por explante em relação a concentração de BAP utilizada, em três variedades não houve diferenças estatísticas para as concentrações testadas e uma variedade apresentou diferença estatística para o número de brotações por explante e também, as variedades testadas apresentaram diferentes potenciais de multiplicação, variando o número de brotos por explante.

No comprimento dos brotos por explante não houve diferenças estatísticas em relação as concentrações de BAP para cada variedade (Figura 1b). Quanto a resposta das variedades para a média das quatro concentrações de BAP testadas, as variedades Jaichnaja simija, Kantimirovskaia e Mirobalan apresentaram resultados superiores estatisticamente em relação a variedade Eliscevskaia, esta apresentando um menor comprimento dos brotos por explante (Tabela 1). Na resposta das diferentes concentrações de BAP testadas em média para as quatro variedades não houve diferença estatística (Tabela 2). ROGALSKI *et al.* (1999a) e ROGALSKI & LEONTIEV-ORLOV (1999) obtiveram um maior comprimento dos brotos por explante na multiplicação *in vitro* de ameixeira com 0,5 a 1mg.L⁻¹ de BAP. ARENA & CASO (1992), obtiveram maior comprimento de brotos com 1mg.L⁻¹ de BAP, porém com aparecimento de brotos com vitrificação e necrose em folhas e ápices. Em nosso estudo, nenhum dos tratamentos provocou sintomas de vitrificação ou necrose.

TABELA 1. Resposta das variedades para a média das quatro concentrações de BAP testadas

Variedades	Brotos/ explante	Comprimento/ Brotos/explante (mm)	Comprimento médio dos brotos (mm)	Gemas/ explante	Gemas/ broto
Eliscevskaia	9,8 c	28,01 b	2,9 b	25,4 b	2,7 b
Jaichnaja simija	16,8 b	68,9 a	4,6 a	64,9 a	4,3 a
Kantimirovskaia	18,5 ab	65,5 a	3,5 ab	49,3 a	2,7 b
Mirobalan	22,6 a	62,9 a	2,8 b	62,3 a	2,8 b

* Médias de quatro repetições, letras diferentes indicam valores que diferem para o teste de Tukey e análise de significância (ANOVA).

TABELA 2. Resposta das diferentes concentrações de BAP testadas em média para as quatro variedades

BAP (mg.L ⁻¹)	Brotos/ explante	Comprimento/ Brotos/explante (mm)	Comprimento médio dos brotos (mm)	Gemas/ explante	Gemas/ broto
0,25	13,23 b	56,89 a	4,39 a	49,59 a	4,75 a
0,5	15,25 ab	58,22 a	3,93 ab	48,38 a	4,17 ab
0,75	20,33 a	59,74 a	2,94 bc	55,16 a	2,82 b
1,0	18,89 ab	50,49 a	2,7 c	48,70 a	2,52 b

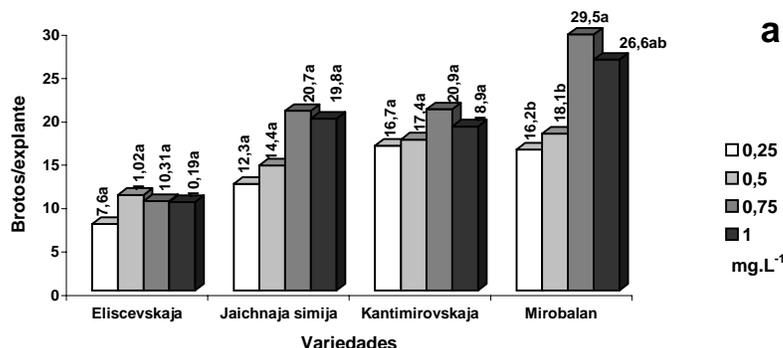
* Médias de quatro repetições, letras diferentes indicam valores que diferem para o teste de Tukey e análise de significância (ANOVA).

Quanto ao comprimento médio dos brotos as quatro variedades apresentaram melhor resultado na concentração de 0,25mg.L⁻¹ de BAP (Figura 1c). Em relação a resposta das variedades para a média das quatro concentrações de BAP testadas o fator genético ocasionou diferença nos resultados, a variedade Jaichnaja simija apresentou um maior comprimento médio dos brotos e um comprimento médio dos brotos de 4,6mm, seguida da variedade Kantimirovskaja com um comprimento médio dos brotos de 3,5mm e as variedades Eliscevsckaja e Mirobalan com um comprimento médio dos brotos, respectivamente de 2,9 e 2,8mm (Tabela 1). Na resposta das diferentes concentrações de BAP testadas em média para as quatro variedades o melhor resultado ocorreu na concentração de 0,25mg.L⁻¹, ocorrendo uma diminuição no comprimento médio dos brotos com o aumento da concentração de BAP (Tabela 2). ROGALSKI *et al.* (1999a,b) e ROGALSKI & LEONTIEV-ORLOV (1999) na multiplicação *in vitro* de ameixeiras observaram que a presença de BAP ao meio ocasiona uma alta taxa de multiplicação, formando um grande número de brotos por explante, porém com um pequeno comprimento médio dos brotos. Assim, como DUSTAN *et al.* (1992) que afirmam que a adição de BAP ao meio nem sempre proporciona adequado alongamento. AMBROZIC-TURK *et al.* (1991), na multiplicação de porta-enxertos de ameixeira, conseguiram melhores resultados com 0,125mg.L⁻¹ de BAP, com um comprimento médio de 17mm. Já GEBHARDT (1985) utilizou 1mg.L⁻¹ de BAP conseguindo um comprimento médio dos brotos entre 10 a 20mm. Estes resultados discordam deste estudo, onde foi observado um comprimento médio dos brotos variando entre 3,34 a 6,35mm para as quatro variedades. As diferenças encontradas novamente podem estar relacionadas ao fator genético.

Em relação a quantidade de gemas por explante não houve diferenças estatísticas quanto as concentrações testadas para as quatro variedades (Figura 1d). Quanto a resposta das variedades para a média das quatro concentrações de BAP testadas, as variedades Jaichnaja simija, Kantimirovskaja e Mirobalan apresentaram

estatisticamente um maior número de gemas por explante em relação a variedade Eliscevsckaja (Tabela 1). Na resposta das diferentes concentrações de BAP testadas em média para as quatro variedades não houve diferenças estatísticas em relação ao número de gemas por explante (Tabela 2). ZILKAH *et al.* (1993), para a multiplicação de porta-enxertos de ameixeira, concluíram que a concentração de 0,4mg.L⁻¹ de BAP era a mais apropriada. ROGALSKI & LEONTIEV-ORLOV (1999) na multiplicação *in vitro* de ameixeiras, observaram um crescimento na quantidade de gemas por explante até a concentração aproximada de 1mg.L⁻¹ de BAP, verificando que na ausência ou em concentrações inferiores a 0,1mg.L⁻¹ de BAP ocorreu apenas a formação de um broto por explante, observando ainda uma grande relação entre concentrações de BAP e a presença de diferentes concentrações de macroions, onde de acordo com a concentração de diferentes macroions os melhores resultados variaram entre 0,1 a 1,5mg.L⁻¹ de BAP. Isto demonstra a necessidade de uma fonte de citocinina exógena para promover a multiplicação celular de ameixeira.

Estudando-se a quantidade de gemas por broto, pôde-se observar que as variedades Eliscevsckaja, Jaichnaja simija e Kantimirovskaja apresentaram melhor resultado na concentração de 0,25mg.L⁻¹ de BAP, enquanto que a variedade Mirobalan não apresentou diferenças estatísticas entre as concentrações testadas (Figura 1e). Em relação a resposta das variedades para a média das quatro concentrações de BAP testadas a variedade Jaichnaja simija apresentou um maior número de gemas por broto em comparação com as demais variedades (Tabela 1). Quanto a resposta das diferentes concentrações de BAP testadas em média para as quatro variedades observou-se que ocorreu um maior número de gemas por broto na concentração de 0,25mg.L⁻¹ de BAP (Tabela 2). ROGALSKI *et al.* (1999a) e ROGALSKI & LEONTIEV-ORLOV (1999) na multiplicação *in vitro* de ameixeira observaram uma diminuição do número de gemas por broto com o aumento da concentração de BAP, onde obtiveram melhor resultado na concentração de 0,1mg.L⁻¹ de BAP.



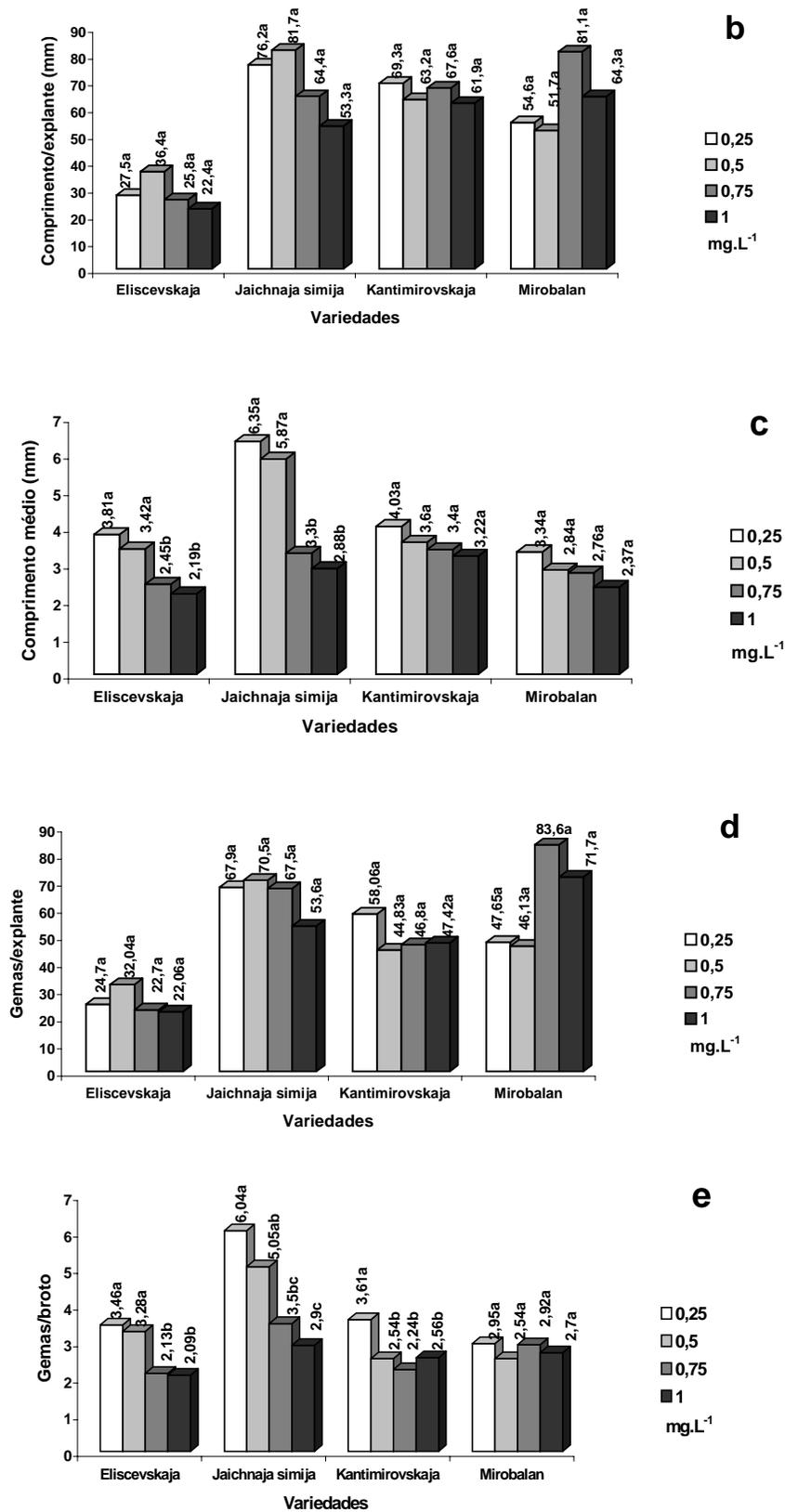


Figura 1. (a) Quantidade de brotos por explante; (b) comprimento dos brotos por explante (mm); (c) comprimento médio dos brotos (mm); (d) quantidade de gemas por explante; (e) quantidade de gemas por broto, em resposta a diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de prunáceas (*Prunus* sp.), 30 dias após a inoculação. Médias de quatro repetições, letras diferentes indicam valores que diferem para o teste de Tukey (5%) e análise de significância (ANOVA).

CONCLUSÕES

De acordo com os parâmetros analisados os melhores resultados variam entre 0,25 a 0,75mg.L⁻¹ de BAP.

O fator genótipo influencia nos resultados.

O uso de 6-benzilaminopurina (BAP) é eficiente na multiplicação *in vitro* de ameixeiras, vars. Eliscevskaia, Jaichnaja simija, Kantimirovskaia e Mirobalan.

As variedades de ameixeira apresentam diferentes potenciais de multiplicação.

A multiplicação de brotos é maior para as quatro variedades quando se utiliza a concentração de 0,75mg.L⁻¹ de BAP.

A presença de BAP ao meio ocasiona um pequeno comprimento médio dos brotos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDERSON, P.G., HARBOUR, M.A., PATIENCE, P.A. Micropropagation of *Prunus tenella* cv. Firehill. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 212, p.463-470, 1987.
- AMBROZIC-TURK, B., SMOLE, J., SIFTUR, A. Micropropagation of a plum ecotype (*Prunus domestica* L.). **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 300, p. 111-114, 1991.
- ARENA, M.E., CASO, O.H. Factores que afectan la multiplicación *in vitro* de los brotes de portainjertos de *Prunus*. **FYTON**, Buenos Aires, v.53, p.29-38, 1992.
- BORKOWSKA, B. Micropropagation of cherry, cultivar Schattenmorell. **Acta Horticulturae**, Leuven, v.169, p. 329-340, 1985.
- DRUART, P.H., GRUSELL, R. Plum (*Prunus domestica*). In BAJAJ Y.P.S. (ed) **Biotechnology in Agriculture and Forestry 1**, Springer-Verlag, v.1, p.130-154, 1985.
- DUSTAN, D.I., LASHTA, D.P., KIKCIO, S.I., *et al.* Factors affecting recurrent shoot multiplication *in vitro* cultures of 17 to 20 years-old douglas fir trees. **In vitro Cell Development Biology**, Columbia, v.28, p.33-38, 1992.
- GEBHARDT, K. Self-rooted sour cherries *in vitro*: auxin effects on rooting and isoperoxidases. **Acta Horticulturae**, Leuven, v.169, p.341-351, 1985.
- 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: CBAB/EMBRAPA. CNPH, 1998.p.183-260.
- GRELLMANN, E., SIMONETTO, P.R. Dados de fenologia e produção de cultivares de Ameixa (*Prunus salicina* Linnl.). **Circular técnico da Fepagro**, Porto Alegre, nº 3, 1995.
- HAMMATT, N. Promotion by phloroglucinol of adventitious root formation in micropropagated shoots of adult wild cherry (*Prunus avium* L.). **Plant Grou Regulation**, Dordrecht, v.14, p.127-132, 1994.
- 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.
- MARTINELLI, A. Factors affecting *in vitro* propagation of the peach-almond hybrids "Hansen 21688" and "Hansen 536". **Acta Horticulturae**, Leuven, v.173, p.237-244, 1985.
- MORINI, S., LORETTI, R. Response of some Mr.S. Plum clones to *in vitro* propagation. **Acta Horticulturae**, Leuven, v.283, p.207-212, 1991.
- MURASHIGE, T., SKOOG, E.I. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NIELSEN, J.M., HANSEN, J., BRANDT, K. Synergism of thidiazuron and benzyladenine in axillary shoot formation depends on sequence of application in *Miscanthus X ogiformis* "Giganteus". **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.41, p.165-170, 1995.
- PEVALEK-KOZLINA, B., JELASKA, S. Microclonal propagation of *Prunus avium* L. **Acta Horticulturae**, Leuven, v.212, p.599-602, 1987.
- RAJASHEKAR, G., PALMQUIST, D., LDBETTER, C. *In vitro* screening procedure for osmotic tolerance in *Prunus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.41, p.159-164, 1995.
- ROGALSKI, M.; LEONTIEV-ORLOV, O. Estudo de Micropropagação e morfogênese em ameixeira e pessegueiro. **Relatório Técnico-Científico PIBIC/CNPq**. Erechim. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), 1999, 151p.
- ROGALSKI, M.; LEONTIEV-ORLOV, O.; MOSSI, J.A.; CANSIAN, R.L. Efeito de diferentes concentrações de benziladenina (BA) e macroíons na multiplicação *in vitro* de ameixeira (*Prunus domestica* L. – var. Kantimirovskaia). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 45., 1999, Gramado, RS, **SUPPLEMENT Genetics and Molecular Biology – Programa e Resumos**, Gramado: SBG, 1999. p. 714a.
- ROGALSKI, M.; LEONTIEV-ORLOV, O.; MOSSI, J.A.; CANSIAN, R.L.; VENDRUSCULO, T. Influência de diferentes reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de ameixeira (*Prunus domestica* L. – var. Kantimirovskaia). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 45., 1999, Gramado, RS, **SUPPLEMENT Genetics and Molecular Biology – Programa e Resumos**, Gramado: SBG, 1999. p.713b.
- SCIUTTI, R., MORINI, S. Effect of relative humidity *in vitro* culture on some growth characteristics of a plum rootstock during shoot proliferation and rooting and on plantlet survival. **Advances in Horticultural Science**, Pisa, v.7, p.153-156, 1993.
- ZILKAH, S. *In vitro* micropropagation of indicator plants for indexing *Prunus* necrotizing ring sport virus. **Acta Horticulturae**, Leuven, v.336, p.121-125, 1993.