

## Protocolo para micropropagação de marmeleiro BA29 em meio semissólido

*Protocol for micropropagation of quince BA29 in semisolid media*

Fernanda Grimaldi\*, Aline Meneguzzi, Gabriela Candido Weber, Daiane Correa, Mayra Juline Gonçalves, Leo Rufato e Aike Anneliese Kretzschmar

Recebido em 02/02/2015 / Aceito em 20/07/2016

### RESUMO

A micropropagação é uma técnica amplamente conhecida pela sua capacidade de produzir um grande número de plantas em um espaço curto de tempo. É essencial para programas de melhoramento, sendo fundamental o estabelecimento de protocolos de micropropagação para espécies economicamente importantes. O objetivo do presente estudo foi estabelecer um protocolo de micropropagação para o marmeleiro BA29, visando à produção massal de mudas. Explantes de marmeleiro BA29 foram cultivados nos meios de cultura MS e WPM (original e 1/2) combinados com BAP (0; 0,5; 1; 2 e 4 mg L<sup>-1</sup>) para a multiplicação *in vitro*, e cultivados em meio MS com sacarose (15 e 30 mg L<sup>-1</sup>) combinados com AIB (0; 0,12; 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>) para o enraizamento *in vitro*. Após 45 dias, o meio de cultura que proporcionou os melhores resultados para crescimento e multiplicação de explantes de BA29 foi o MS original com 2,68 mg L<sup>-1</sup> de BAP e o meio de cultura que proporcionou os melhores resultados para o enraizamento de explantes de BA29 foi MS com 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 1,25 mg L<sup>-1</sup> de AIB.

**PALAVRAS-CHAVE:** propagação *in vitro*, *Cydonia oblonga*, reguladores de crescimento.

### ABSTRACT

Micropropagation is a technique widely known for its ability to produce large numbers of plants in a short period of time. It is essential for breeding programs and to establish micropropagation protocols for economically important species. The aim of this study was to establish a micropropagation protocol for quince BA29, aiming at mass production of plantlets.

The explants of quince BA29 were cultured on MS and WPM media (original and 1/2) in combination with BAP (0, 0.5, 1, 2 and 4 mg L<sup>-1</sup>) for the *in vitro* multiplication and cultured in MS medium with sucrose (15 and 30 mg.L<sup>-1</sup>) combined with IBA (0, 0.12, 0.25, 0.50, 1.0 and 2.0 mg L<sup>-1</sup>) for *in vitro* rooting. After 45 days, the culture media which provided the best results for growth and multiplication of BA29 explants was the MS original with 2.68 mg L<sup>-1</sup> of BAP and the culture media which provided the best results for rooting of BA29 explants was MS with 15 g L<sup>-1</sup> of sucrose and 1.25 mg L<sup>-1</sup> of IBA.

**KEYWORDS:** *in vitro* propagation, *Cydonia oblonga*, growth regulators.

A técnica da micropropagação vem sendo empregada à diversas espécies vegetais, pois possibilita a produção de um grande número de plantas com alta qualidade, homogeneidade e em um curto espaço de tempo. Os principais fatores que influenciam o sucesso da micropropagação são origem do explante, meio nutritivo, luz e temperatura. Existem diversas formulações de meios nutritivos, sua escolha é em geral de acordo com a literatura, onde os compostos orgânicos e os reguladores de crescimento são dependentes da espécie ou explante utilizados (CID & TEIXEIRA 2010). Apesar das vantagens que a técnica proporciona, seu uso comercial no setor de produção de mudas frutíferas ainda é limitado devido ao alto custo e baixa eficiência que algumas espécies podem apresentar. Considerando que a tendência da fruticultura moderna está voltada aos plantios adensados e ao uso de mudas certificadas se faz necessário o estudo de protocolos de micropropagação para espécies de importância econômica, como o marmeleiro.

Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC, Brasil.

\* Autor para correspondência <fernandagrimaldi@outlook.com>

O uso do marmeleiro como porta-enxerto vem sendo estudado em diversas culturas, principalmente na cultura da pereira. Os marmeleiros vêm sendo utilizados de forma crescente por sua versatilidade em desenvolver plantas de pereira anãs e com desenvolvimento precoce (SANSVINI et al. 2008). Atualmente os marmeleiros estudados como porta-enxertos para a pereira são as cultivares EMA, EMC, Adams, BA29, Portugal, Inta 269 e D'Vranja (PASA et al. 2011, PASA et al. 2012, MACHADO et al. 2013). O BA29 se destaca em relação aos demais porta-enxertos de marmeleiro por apresentar compatibilidade com as principais variedades de pereira, alta produtividade e grande calibre de frutos, com controle de vigor da planta (ALONSO et al. 2011).

O marmeleiro BA29, por não ter um protocolo de micropropagação definido, é uma cultivar lenhosa que tem apresentado baixa eficiência durante a multiplicação e enraizamento *in vitro*, comprometendo a propagação e posterior formação da muda. A formação de brotações e de raízes adventícias em plantas lenhosas é dificultada pelo fato destas plantas possuírem mais camadas de floema e xilema secundários (HARTMANN et al. 2011). Desta maneira o presente estudo teve como objetivo estabelecer um protocolo de micropropagação para o marmeleiro BA29, avaliando a melhor concentração de sais dos meios de culturas MS e WPM combinada com diferentes concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) durante a multiplicação *in vitro*, bem como, avaliando a melhor concentração de sacarose combinada com diferentes concentrações de AIB (ácido indol butírico) durante o enraizamento *in vitro* de explantes de marmeleiro BA29.

O estudo foi conduzido no Laboratório de Micropropagação Vegetal do Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV/UEDESC, em Lages, SC. O estabelecimento *in vitro* do marmeleiro BA29 foi realizado a partir de segmentos nodais provenientes de planta matriz acomodada em casa de vegetação, que recebeu regularmente tratamentos fitossanitários. O estabelecimento foi feito em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG 1962) com 100 mg L<sup>-1</sup> de inositol; 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose; 6 g L<sup>-1</sup> de ágar; pH 5,8±0,1 antes da adição do ágar e autoclavagem, sem adição de reguladores de crescimento. Os explantes foram mantidos sob temperatura de 25±2 °C, primeiramente no escuro por sete dias e após, transferidos para fotoperíodo de 16 horas.

Para a multiplicação *in vitro* foram utilizados como explantes segmentos caulinares de marmeleiro BA29, de plantas previamente estabelecidas *in vitro*. Os meios de culturas MS e WPM (LLOYD & McCOWN 1980) foram testados na concentração original de sais e na concentração de sais reduzidos a metade (MS original, MS<sup>1/2</sup>, WPM original, WPM<sup>1/2</sup>). Foram testadas também as seguintes concentrações de BAP: 0; 0,5; 1; 2 e 4 mg L<sup>-1</sup>. Todos os meios continham 100 mg L<sup>-1</sup> de inositol; 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose; 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH 5,8±0,1 antes da adição do ágar e autoclavagem. Utilizaram-se quatro explantes por frasco, mantidos sob temperatura de 25±2 °C e fotoperíodo de 16 horas. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado arranjado em fatorial 4 x 5 (meio x BAP), com cinco repetições por tratamento. Após 45 dias as variáveis analisadas foram: número e comprimento de brotos, número de gemas e número de folhas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, empregando o programa SAS 9.1.3. O fator qualitativo (meio de cultura) teve suas médias comparadas através do teste de Duncan, com 5% de probabilidade de erro, e para o fator quantitativo (concentração de BAP) foi ajustada uma equação de regressão.

Para o enraizamento *in vitro* foram utilizadas como explantes partes aéreas de marmeleiro BA29 previamente multiplicadas *in vitro*. Utilizou-se o meio de cultura MS com duas concentrações de sacarose: 15 e 30 g L<sup>-1</sup>. Foram testadas também as seguintes concentrações de AIB: 0; 0,12; 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>. Todos os meios continham 100 mg L<sup>-1</sup> de inositol; 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH 5,8±0,1 antes da adição do ágar e autoclavagem. Utilizaram-se cinco explantes por frasco, mantidos sob temperatura de 25±2 °C e fotoperíodo de 16 horas. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado arranjado em fatorial 2 x 6 (sacarose x AIB), com sete repetições por tratamento. Após 45 dias as variáveis analisadas foram: comprimento e número de raiz, comprimento da parte aérea, número de folhas, número de gemas e calo. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, empregando o programa SAS 9.1.3. O fator qualitativo (sacarose) teve suas médias comparadas através do teste de Duncan, com 5% de probabilidade de erro, e para o fator quantitativo (concentração de AIB) foi ajustada uma equação de regressão.

No estádio de multiplicação *in vitro* a análise de variância para as variáveis número e comprimento de brotos foi significativa para ambos os fatores,

porém sem interação. A variável número de gemas foi significativa apenas para o fator meio de cultura e para a variável número de folhas a análise não foi significativa. O meio MS em sua concentração original de sais obteve as melhores médias para números de brotos e comprimento de brotos, porém, para número de gemas o MS original não diferiu estatisticamente dos meios MS $\frac{1}{2}$  e WPM original (Tabela 1). THAKUR & KANWAR (2008) na multiplicação *in vitro* de *Pyrus pyrifolia* não observaram diferença estatística para a comprimento da parte área em relação aos meios de cultura MS e WPM. Porém é importante testar formas reduzidas do meio de cultura, pois a redução de macronutrientes pode ser utilizada como medida para evitar a vitrificação dos explantes. O maior número de brotos por explante (7,56 brotos) foi alcançado com a concentração de 2,68 mg L $^{-1}$  de BAP (Figura 1). Na multiplicação *in vitro* de marmeleiro

cultivar EMC as concentrações 0; 0,7; 1,4 e 2,1 mg L $^{-1}$  de BAP não influenciaram no número e na altura de brotos, corroborando a necessidade de utilizar maiores concentrações de BAP (SILVA et al. 2009). O BAP é comumente utilizado na faixa de 0,5 a 5,0 mg L $^{-1}$ , sendo o fator genético importante na determinação da concentração necessária da citocinina, portanto a concentração de BAP varia de acordo com a espécie e cultivar estudada (CID & TEIXEIRA 2010).

Para comprimento de brotos se observou que este diminuiu conforme o aumento da concentração de BAP (Figura 2). Resultados similares foram observados na multiplicação *in vitro* de porta-enxerto 'Tsukuba 1' (*Prunus persica* L.) demonstrando que altas concentrações de BAP podem levar à formação de desordens fisiológicas como a redução no crescimento das brotações (RADMANN et al. 2009).

Tabela 1 - Valores médios para números de brotos, comprimento de brotos e números de gemas por explante em meios de cultura com diferentes concentrações de sais para marmeleiro BA29.

Table 1 - Average values for shoot number, shoot length and bud number per explant of quince BA29 in culture media with different salts concentration.

Tratamento (Meio)	Nº Brotos	Comp. de Brotos	Nº Gemas
MS original	6,48 a	19,19 a	5,13 a
MS $\frac{1}{2}$	4,81 b	16,28 b	4,45 ab
WPM original	4,25 b	15,63 b	4,39 ab
WPM $\frac{1}{2}$	3,30 b	12,73 c	4,16 b
CV (%)	23,05	18,07	28,27

Dados seguidos de mesma letra na coluna não diferem entre si estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste Duncan.

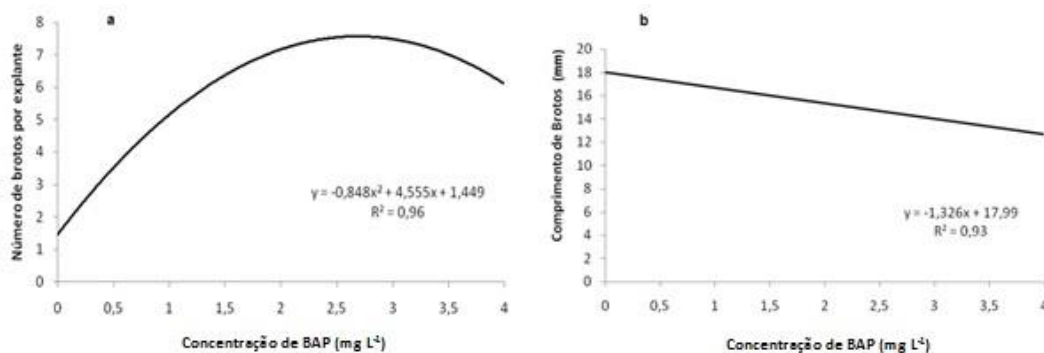


Figura 1 - Número de brotos (a) e comprimento de brotos (b) de explantes de marmeleiro BA29 em função da concentração de BAP.

Figure 1 - Shoot number (a) and shoot length (b) for quince BA29 explants, considering BAP concentration.

No enraizamento *in vitro* a análise de variância para as variáveis comprimento de raiz e número de gemas não se mostrou significativa para nenhum dos fatores. Para a variável número de folhas apenas o fator concentração de sacarose foi significativo, onde o maior número médio de folhas foi obtido com 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Tabela 2). Este resultado poderia ser explicado como um mecanismo de compensação da planta, onde a redução do carboidrato induziu a formação de mais folhas para aumentar a realização da fotossíntese. Porém, de acordo com DEBERGH (1991) nas condições de cultivo *in vitro* plantas micropropagadas não são fotoautotróficas e sim mixotróficas ou heterotróficas. Para explantes de marmeleiro ‘Adams’ e ‘EMC’ o enraizamento *in vitro* obteve melhores resultados com 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose, e concentrações acima de 30 g L<sup>-1</sup> apresentaram efeito negativo sobre o enraizamento (ERIG et al. 2004).

Para a variável número de raiz apenas o fator concentração de AIB foi significativo, apresentando um comportamento quadrático ao ajustar uma equação de regressão. O maior número médio de

raiz (5,42 raízes) foi obtido com 1,25 mg L<sup>-1</sup> de AIB (Figura 2). Concentrações acima deste valor proporcionaram uma diminuição no número de raízes. FISICHELLA & CINELLI (2000) obtiveram para marmeleiro o maior número médio de raiz com 1 mg L<sup>-1</sup> de ANA e ERIG et al. (2004) obtiveram maior enraizamento com 2 mg L<sup>-1</sup> de AIB, ANA e AIA. Estes resultados mostram que para cultivares de marmeleiro quantidades de auxina entre 1 e 2 mg L<sup>-1</sup> são favoráveis ao enraizamento *in vitro*. A variável comprimento de parte aérea também se mostrou significativa apenas para o fator concentração de AIB, apresentando um comportamento linear ao ajustar uma equação de regressão (Figura 2). Foi observado que quanto maior a concentração de AIB adicionada ao meio de cultura, maior foi o comprimento da parte aérea, indicando que o AIB contribui para o crescimento da plântula, principalmente porque a auxina está envolvida em diversos processos fisiológicos, sendo responsável não só pela formação de raízes adventícias, mas também pelo alongamento celular (TAIZ & ZEIGER 2013).

Tabela 2 - Número médio de folhas formadas em explantes de marmeleiro BA29 em função da quantidade de sacarose adicionada ao meio de cultura.

Table 2 - Average number of leaves developed in quince BA29 explants, considering amount of sucrose added to culture media.

Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	Número médio de Folhas
15	6,39 a
30	4,65 b
CV (%)	35,68

Dados seguidos de mesma letra na coluna não diferem entre si estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste Duncan.

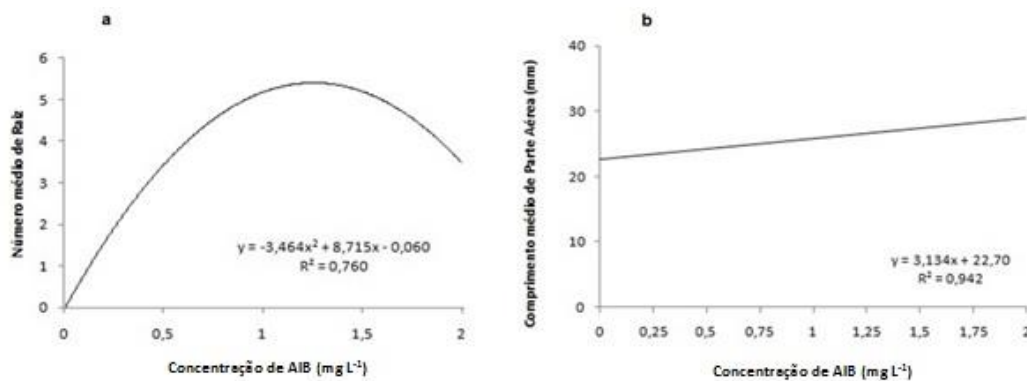


Figura 2 - Número médio de raiz (a) e comprimento de parte aérea (b) de explantes de marmeleiro BA29 em função da concentração de AIB.

Figure 2 - Average root number (a) and shoot length (b) of quince BA29 explants, considering IBA concentration.

A propagação *in vitro* do marmeleiro BA29 é bem sucedida quando realizada em meio MS com a concentração de sais originais, alcançando ótimo desenvolvimento de brotos com 2,68 mg L<sup>-1</sup> de BAP durante o estágio de multiplicação e desenvolvimento radicular com 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 1,25 mg L<sup>-1</sup> de AIB durante o estágio de enraizamento.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem os órgãos CAPES, CNPq e FAPESC pela concessão de bolsas e pelo aporte de recursos financeiros ao Laboratório de Micropropagação Vegetal do CAV/UEDESC.

## REFERÊNCIAS

- ALONSO JM et al. 2011. Evaluation of the OH x F selections as an alternative to quince rootstocks for pear: agronomical performance of 'Conference' and 'Doyenné du Comice'. *Acta Horticulturae* 903:451-455.
- CID LPB & TEIXEIRA JB. 2010. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: CID LPB. *Cultivo in vitro de plantas*. Brasília, DF. 303p.
- DEBERGH PC. 1991. Acclimatization techniques of plants from *in vitro*. *Acta Horticulturae* 289:291-300.
- ERIG AC et al. 2004. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de marmeleiro cvs. Mc e Adams, utilizadas como porta-enxerto para a pereira. *Scientia Agraria* 5:61-68.
- FISICHELLA M & CINELLI F. 2000. Effetto del rapporto auxine-citochinine e di inibitori delle auxine e delle gibberelline sulla radicazione e sullo sviluppo *in vitro* di germogli di cotogno BA29 [*Cydonia oblonga* Mill.]. *Atti V Giornate Scientifiche S.O.I.* 2:593-594.
- HARTMANN HT et al. 2011. *Plant propagation: principles and practices*. 8.ed. New Jersey, Prentice Hall. 915p.
- LLOYD G & McCOWN B. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *International Plant Propagators' Society* 30:420-427.
- MACHADO BD et al. 2013. Cultivares e portaenxertos sobre o vigor de plantas de pereira europeias. *Ciência Rural* 43:1542-1545.
- MURASHIGE T & SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15:473-497.
- PASA MS et al. 2011. Hábito de frutificação e produção de pereiras sobre diferentes porta enxertos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 46:998-1005.
- PASA MS et al. 2012. Desenvolvimento, produtividade e qualidade de peras sobre porta-enxertos de marmeleiro e *Pyrus calleryana*. *Revista Brasileira de Fruticultura* 34:873-880.
- RADMANN B et al. 2009. Multiplicação *in vitro* e alongamento das brotações micropropagadas do porta-enxerto 'Tsukuba 1' (*Prunus persica* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura* 31:656-663.
- SANSAVINI S et al. 2008. Overview of intensive pear culture: planting density, rootstocks, orchard management, soil-water relations and fruit quality. *Acta Horticulturae* 800:35-50.
- SILVA IMC et al. 2009. Interação BAP x GA3 na multiplicação *in vitro* do marmeleiro cultivar "MC". XII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal. Fortaleza – CE.
- TAIZ L & ZEIGER E. 2013. *Fisiologia vegetal*. 5.ed. Porto Alegre: Artmed. 918p.
- THAKUR A & KANWAR JS. 2008. Micropropagation of 'Wild Pear' *Pyrus pyrifolia* (Burm F.) Nakai. I. Explant Establishment and Shoot Multiplication. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 36:103-108.