# **UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

# Programa de Pós- Graduação em Fisiologia Vegetal



## **TESE**

MULTIPLICAÇÃO E REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE MARMELEIRO

Mirian de Farias Ribeiro

## MIRIAN DE FARIAS RIBEIRO

# MULTIPLICAÇÃO E REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE MARMELEIRO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Fisiologia Vegetal

Orientador: Valmor João Bianchi

#### Dados Internacionais de Publicação (CIP)

R484m Ribeiro, Mirian de Farias

Multiplicação e regeneração in vitro de marmeleiro / Mirian de Farias Ribeiro; Valmor João Bianchi, orientador. - Pelotas, 2013.

78 f.; il.

Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal), Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.

1.Cydonia oblonga. 2.Organogênese. 3.Microambiente. 4.Reguladores de crescimento. I. Bianchi, Valmor João, orient. II. Título.

CDD: 581.1

Catalogação na Fonte: Leda Cristina Peres Lopes CRB:10/2064 Universidade Federal de Pelotas

Banca Examinadora:

Dr. Valmor João Bianchi

Dr. Leonardo Ferreira Dutra

Dra. Elizete Beatriz Radmann

Dra. Lorena Pastorini Donini

Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite nele. Dedico a meus pais, Jurema e Mairi, que sempre acreditaram.

#### AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por terem me proporcionado tudo que tenho até hoje, por sempre apoiarem e respeitarem minhas decisões e, por muitas vezes, abrirem mãos de seus sonhos para que os meus fossem realizados;

Ao meu irmão Marcos, pelo apoio e amizade, por estar sempre presente a meu lado, sempre me incentivando e vibrando a cada conquista. Apesar de todas as nossas brigas sempre seremos irmãos e bons amigos;

De maneira especial ao meu namorado Marcus, pela compreensão, carinho e amor a mim dedicados sempre. Obrigada por não deixar a peteca cair, sempre me incentivando e me amando de maneira incondicional:

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas e colegas de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal;

Ninguém consegue algo sem ajuda, sempre que houver uma obra ela é o resultado da somatória de todo um conjunto. Obrigada, Cris, Cibele, Elizete, Aline, Letícia, Elisia, Anderson, Jose, Gabriela, Isabel, por fazerem parte dessa soma;

Em especial ao grupo *Prunus*, pela troca de conhecimentos, convivência e por tornarem os dias de trabalho muito agradáveis, mesmo quando era uma simples limpeza na casa de vegetação;

A minha grande amiga Dani, pelos grandes momentos profissionais e pessoais que passamos juntas. Amiga, saibas que sempre serei sua abelha. A você meu agradecimento mais que especial;

Ao professor Dr. Valmor, pela confiança, respeito e pelos conhecimentos transmitidos durante esta etapa importante da minha vida, os quais foram de grande valia para a minha formação;

Ao Prof. José Antônio Peters pela atenção, confiança e ensinamentos durante a realização deste trabalho;

Ao Programa de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal pela oportunidade de realizar o curso de doutorado;

Aos docentes do Programa de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal pelos ensinamentos transmitidos;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão de bolsa de estudos;

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho e cujos nomes não foram citados aqui.

Agradeço

#### RESUMO

RIBEIRO, Mirian de Farias. **Multiplicação e regeneração in vitro de marmeleiro,** 2013. 78f. Tese (Doutorado) — Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Pomares de pereira com plantio em alta densidade foram possíveis devido a utilização de portaenxerto de marmeleiro (Cydonia oblonga Mill.), obtendo-se assim plantas de pequeno porte e rápida frutificação, além de proporcionar uniformidade a esses pomares. Técnicas que venham melhorar a capacidade de propagação deste portaenxerto são de grande interesse. O objetivo desse trabalho foi ajustar protocolos de multiplicação e regeneração in vitro de marmeleiro cultivares MC e Adams. Os resultados do trabalho estão apresentados na forma de capítulos. O material vegetal utilizado nos experimentos foi obtido a partir da multiplicação in vitro em meio de cultura básico composto dos sais e vitaminas MS, suplementados com mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), 6- benzilaminopurina (BAP) (0,3 mg L<sup>-1</sup>), sacarose (30 g L<sup>-1</sup> 1) e ágar (8 g L-1). No capítulo 1, utilizou-se meio básico acrescentado de ágar (8 g L-1) no meio solidificado e vermiculita (3 g frasco 1) no meio líquido e os frascos foram vedados com papel alumínio, filme PVC e tampa de polipropileno. No capítulo 2, como fonte de carbono no meio de cultura foi utilizado sacarose, frutose ou sorbitol nas concentrações de 0, 15, 30, 45 e 60 g L<sup>-1</sup>. Para regeneração *in vitro* o capítulo 3 foi dividido em dois experimentos. No experimento 1 os meios de cultura constituíram-se dos sais e vitaminas MS e SH, suplementados com mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), sacarose (30 g L<sup>-1</sup>), ágar (8 g L<sup>-1</sup>), ANA (2 μM) e TDZ nas concentrações de 0, 1,5, 3, 4,5 e 6 µM. No experimento 2 o meio de cultura constituiu-se dos sais e vitaminas SH, suplementado com mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), sacarose (30 g L<sup>-1</sup>), ágar (8 g L<sup>-1</sup>), TDZ (0, 1,5, 3, 4,5 e 6 µM) combinado com ANA ou AIB nas concentrações de 0; 1,0; 1,5 e 2 µM. Todos os experimentos foram avaliados após 60 dias. Diante dos resultados apresentados no capítulo 1 é possível concluir que a utilização de meio de cultura solidificado com ágar e os frascos vedados com papel alumínio ou tampa de polipropileno favorecem a multiplicação in vitro de marmeleiro 'MC' e 'Adams'. No capítulo 2 constatou-se que a sacarose na concentração de 45 g L<sup>-1</sup> para cultivar MC e 30 g L<sup>-1</sup> para cultivar Adams são as melhores concentrações e fonte de carbono para multiplicação in vitro dos portaenxertos de marmeleiro testados. No capítulo 3, primeiro verificou-se no experimento 1 que a regeneração *in* vitro de brotos adventícios de marmeleiro das cultivares MC e Adams foi favorecida pelo uso do meio de cultura SH e pela adição de 4,5 µM de TDZ para cultivar MC e 6 µM de TDZ para a cultivar Adams. No experimento 2 concluiu-se que houve maior taxa de regeneração a partir da combinação de 4.5 µM de TDZ e 2 µM de ANA para cultivar MC e 6 µM de TDZ e 2 µM de ANA para cultivar Adams.

Palavras Chave: Cydonia oblonga, microambiente, reguladores de crescimento, organogênese.

#### **ABSTRACT**

RIBEIRO, Mirian de Farias. *In vitro* multiplication and regeneration of quince, 2013. 78f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Pear orchards with high density planting were possible due to the use of rootstock quince (Cydonia oblonga Mill.), thus obtaining small plants and rapid fruiting, and provide uniformity to these orchards. Techniques that may improve the ability to propagation this rootstock are of great interest. The aim of this study was to adjust protocols for in vitro multiplication and regeneration of quince cultivars MC and Adams. The results of this word are presented in chapter. Material used in the experiments was obtained from in vitro propagation in culture medium consisting of MS salts and vitamins supplemented with myo-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), 6 benzylaminopurine (BA) (0.3 mg L<sup>-1</sup>), sucrose (30 g L<sup>-1</sup>) and agar (8 g L<sup>-1</sup>). Chapter 1 we used MS medium added agar (8 g L<sup>-1</sup>) on solidified medium and vermiculite (3 g flask<sup>-1</sup>) in the liquid medium and the flasks were sealed with aluminum foil, PVC film and polypropylene cap. In Chapter 2 how carbon source in culture medium was added sucrose, fructose or sorbitol at concentrations 0, 15, 30, 45 and 60 g L<sup>-1</sup>. For in vitro regeneration the Chapter 3 was divided in two experiments. In experiment 1 the culture medium consisted of salts and vitamins MS and SH supplemented with myoinositol (100 mg L<sup>-1</sup>), sucrose (30 g L<sup>-1</sup>), agar (8 g L<sup>-1</sup>), NAA (2 mM) and TDZ at concentrations 0, 1.5, 3, 4.5 and 6 µM. In experiment 2 the culture medium consisted of SH salts and vitamins supplemented with myo-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), sucrose (30 g  $L^{-1}$ ), agar (8 g  $L^{-1}$ ), TDZ (0 , 1.5, 3, 4.5 and 6  $\mu$ M) combined with NAA or IBA at concentrations of 0, 1.0, 1.5 and 2 µM. All experiments were evaluated after 60 days. Considering the results presented in Chapter 1 is possible to conclude that the use of culture medium solidified with agar and the flasks sealed with aluminum foil or polypropylene cap favored the in vitro multiplication of quince 'MC' and 'Adams'. In the second chapter it was found that the sucrose concentration of 45 g L<sup>-1</sup> to cultivar MC and 30 g L<sup>-1</sup> to cultivar Adams are the best concentrations and carbon source for in vitro multiplication guince. In the Chapter 3 first verified in experiment 1 that the in vitro regeneration of adventitious shoots guince cultivars MC and Adams was favored by the use of SH culture medium and addition of 4.5  $\mu$ M TDZ to cultivar MC and 6  $\mu$ M TDZ for cultivar Adams. And in experiment 2 it was concluded that multiple shoots were formed from the combination of 4.5 µM TDZ and 2 µM NAA for cultivar MC and 6 μM TDZ and 2 μM NAA to cultivar Adams.

Key-words: Cydonia oblonga, microenvironment, growth regulators, organogenesis.

# SUMÁRIO

INTRO	ODUÇÃO GERAL	12
RFFF	RÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
	TULO I - Multiplicação <i>in vitro</i> de portaenxerto de p ção e do estado físico do meio de cultura	
	1 INTRODUÇÃO	21
	2 MATERIAL E MÉTODOS	22
	3 RESULTADOS	23
	4 DISCUSSÃO	27
	5 CONCLUSÕES	30
	6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
O A DÍT		da waa waa la ba 1840) a
	TULO II - Fontes de carbono na multiplicação <i>in vitro</i> ons'	
	1 INTRODUÇÃO	35
	2 MATERIAL E MÉTODOS	
	3 RESULTADOS	37
	4 DISCUSSÃO	44
	5 CONCLUSÕES	47
	6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
	TULO III - Regeneração de folhas de portaenxe	
cultiv	vadas in vitro	
	1 INTRODUÇÃO	
	2 MATERIAL E MÉTODOS	
	3 RESULTADOS	
	4 DISCUSSÃO	69

	5 CONCLUSÕES	72
	6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
CONSID	PERAÇÕES FINAIS	76
ANEXO.		77

## INTRODUÇÃO GERAL

A cultura da pereira (*Pyrus communis* L.) é uma importante alternativa econômica no Brasil, visto que a produção nacional desta fruta, em 2011, foi de 20 mil toneladas e a importação atingiu 210 mil toneladas, ou seja, 10 vezes maior que a produção nacional, representando um gasto com importação de mais de US\$ 204 milhões (IBGE, 2013; ALICEWEB, 2013; FAO, 2013).

Um dos fatores associado a dificuldade de produção e de expansão dessa frutífera, no Brasil, é a utilização das espécies *P. calleryana* e *P. betulaefolia* como portaenxertos, pois apesar destes genótipos proporcionarem maior produtividade às pereiras enxertadas, retardam a entrada em produção, determinam grande vigor à planta, dificultando a colheita e a realização de tratos culturais importantes, como poda, raleio de frutos, tratamentos fitossanitários e proporcionam pomares desuniformes (BARBOSA et al., 1997).

O marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) pertence a família Rosaceae e subfamília Pomae e além da exploração comercial das frutas, tem sido intensamente utilizado como portaenxerto para a cultura da pereira na Europa, e mais recentemente no Brasil (FIORAVANÇO et al., 2006).

Segundo Loreti e Massai (1998), o uso do marmeleiro como portaenxerto ganhou importância na cultura da pereira devido ao grande interesse em se obter plantas com dimensões reduzidas e rápida entrada em frutificação. Essa diminuição do vigor facilitou a realização de tratos culturais importantes, como poda, raleio de frutos, tratamentos fitossanitários e colheita. Dentre os marmeleiros mais utilizados como portaenxerto destacam-se as cultivares 'MC', 'Adams' e 'BA-29'.

O marmeleiro 'MC' é considerado ananizante, induzindo elevada e precoce produção. Foi selecionado e produzido livre de vírus na Estação Experimental "East-Malling" (Inglaterra) (JACKSON, 2003). É o clone de marmeleiro mais ananizante dentre os atualmente difundidos para a cultura da pereira em pomares de alta

densidade. Possui um sistema radicular superficial e pouco expandido, conferindo um fraco ancoramento da planta. Exige terreno fértil e bom fornecimento de água. Pomares de pereira implantados sobre esse portaenxerto são pouco vigorosos e, não é recomendado para terrenos mal drenados, sendo resistente a afídeos e nematoides do solo, porém, muito sensível ao frio e à seca intensos (LORETI, 1994).

O marmeleiro 'Adams' é um clone do marmeleiro Angers selecionado na Bélgica em 1970 (JACKSON, 2003). Apresenta grande facilidade de ser multiplicado, sistema radicular fasciculado e superficial, exigindo terrenos férteis e bem drenados. Apresenta-se medianamente sensível a *Erwinia amylovora*. Quando utilizado como portaenxerto, induz vigor reduzido, precocidade de frutificação, elevada produtividade e eficiência produtiva. Apresenta discreta afinidade com as cultivares de pereira mais difundidas (FIDEGHELLI; LORETI, 2009).

O marmeleiro 'BA-29' é uma seleção francesa do marmeleiro 'Provenza' obtida nos anos 60. É de fácil propagação e apresenta um aparato radicular bem desenvolvido, proporcionando um bom suporte às plantas, por isso é adaptável a solos pesados e argilosos. Dentre os portaenxertos de marmeleiros utilizados comercialmente é o que induz maior vigor e, consequentemente, o pomar apresenta uma entrada em produção mais lenta, porém apresenta boa e constante capacidade produtiva e frutos de bom calibre. É medianamente sensível a *Erwinia amylovora* e suscetível a *Agrobacterium tumefaciens* (COLOMBO, 2003; FIDEGHELLI & LORETI, 2009).

Na propagação do marmeleiro, a produção de mudas pode ser realizada utilizando-se sementes ou por meio da enxertia, estaquia, mergulhia de cepa e micropropagação. Apesar de os frutos de marmeleiros possuírem sementes viáveis, estas são em pequena quantidade por fruto (menos de 10), produzindo pela reprodução sexual plântulas desuniformes, o que não é desejado no estabelecimento de plantios comerciais (PASQUAL et al., 2001, PIO et al., 2004). A estaquia ou enxertia são alternativas de propagação viáveis para os marmeleiros, mantendo as características genéticas das plantas-matrizes, uniformidade, porte reduzido e precocidade de produção (PIO et al., 2004). No caso da propagação de portaenxertos ainda pode-se lançar mão da chamada mergulhia de cepa, porém, assim como a estaquia e a enxertia, estes métodos de propagação aumentam os riscos de difusão de material contaminado por agentes fitopatogênicos. Sendo assim, técnicas que venham melhorar a capacidade de propagação, bem como, a

produção de mudas com maior qualidade genético-sanitária são de grande interesse em fruticultura.

Dentro deste contexto, a utilização de técnicas de cultura de tecidos com o objetivo de conservar germoplasma e micropropagar em larga escala e com alta taxa de multiplicação, tem-se apresentado como um instrumento importante que pode ser explorado pelos pesquisadores e produtores de mudas (BALARAJU et al., 2011), já sendo empregado para multiplicação de portaenxertos de espécies lenhosas, como por exemplo, portaenxerto de macieira MM106 (SOTIROPOULOS et al., 2005).

A micropropagação se divide em estágios, começando pela seleção, desinfestação e introdução de explantes em meio nutritivo, sob condições assépticas, passando pela multiplicação de propágulos mediante sucessivas subculturas em meio próprio para a multiplicação, transferência das partes aéreas produzidas para meio de alongamento e enraizamento, chegando, por fim, ao transplantio das plantas obtidas para substrato ou solo (CARVALHO et al., 2009).

Na multiplicação *in vitro*, vários são os fatores que influenciam, entre eles citam-se a composição do meio de cultura utilizado e as condições ambientais de crescimento no interior do frasco. Os meios nutritivos utilizados para a cultura de tecidos têm a função de fornecer as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. Simultaneamente, a adição de reguladores de crescimento estimulam o alongamento e a multiplicação da parte aérea (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Quanto ao fator microambiente, deve-se levar em consideração que as tampas e aberturas, e o ar do ambiente em torno dos frascos irão afetar as trocas e a concentração de gases dos frascos ventilados naturalmente (KOZAI et al., 2005).

Além da multiplicação para a produção de mudas, a cultura de tecidos pode ser aplicada no auxílio ao melhoramento, via transformação genética para características de interesse, ou, ainda, utilizando-se a estratégia de cultivo em meios que induzam a variabilidade naquelas espécies que apresentam baixa variabilidade genética natural (CABONI et al., 2000). Para isso é necessário ajustar os protocolos para obter maior eficiência na regeneração de novas brotações para cada cultivar em especifico. Vários fatores influenciam a eficiência de regeneração de brotos adventícios, como meio de cultura, genótipo, reguladores de crescimento (auxina e citocinina), tamanho, idade, e posição dos explantes, fotoperíodo, ou intensidade da

luz (LIU; PIJUT, 2008). Atenção especial tem sido dada ao tipo, concentração e período de tempo em que os reguladores de crescimento são mantidos no meio de cultura, objetivando racionalizar a sua concentração e tempo de exposição para obter os melhores resultados (GUERRA et al., 1999).

Para Nogueira et al. (2001), o estabelecimento de um eficiente sistema de regeneração de plantas *in vitro* é o pré-requisito fundamental para a engenharia genética. Para utilização dessa técnica é necessário induzir gemas adventícias e, em seguida, regenerar ramos alongados e plantas completas a partir de células e/ou porções de tecidos. Estudando o potencial de regeneração *in vitro* do marmeleiro cultivares MC e Adams, Silva et al. (2011) observaram que o explante folha inteira foi mais responsivo a essa técnica e que a adição de TDZ ao meio de cultura potencializou a regeneração dos explantes.

A técnica de transformação genética é interessante para as cultivares de marmeleiro utilizados como portaenxertos, pois algumas doenças e pragas incidem de tal forma que podem causar danos econômicos importantes durante a fase de produção da muda no viveiro. Entre as doenças pode-se citar a entomosporiose, também conhecida como "Requeima", ou "Ferrugem", causada pelos fungos *Fabraea maculata* (forma perfeita) e *Entomosporium maculatum* (forma imperfeita). No Brasil é a doença mais importante da cultura do marmeleiro, mas também é prejudicial para outras Rosáceas, visto que também incide sobre nespereira, macieira e pereira (PIO et al., 2005). Outra doença de importância econômica é a sarna, causada pelos fungos *Venturia inaequalis* e *Fusicladium dendriticum*, que causa perdas em regiões de clima frio e úmido, como o caso do Rio Grande do Sul (CARVALHO, 1980).

Nesse sentido, o estudo da multiplicação e da regeneração *in vitro* de marmeleiro visa ajustar os protocolos para obter maior eficiência e reprodutibilidade em trabalhos futuros de transformação genética dessa espécie, além do uso para a propagação comercial em larga escala de portaenxertos de marmeleiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALICEWEB/MDIC. Importação brasileira. Disponível em: <a href="http://www.aliceweb.desenvolvimento.gov.br">http://www.aliceweb.desenvolvimento.gov.br</a>. Acesso em: 30 jan. 2013.

BALARAJU, K.; SARAVANAN, S.; AGASTIAN, P.; IGNACIMUTHU S. A rapid system for micropropagation of *Swertia chirata* Buch-Ham. ex Wall.: an endangered medicinal herb via direct somatic embryogenesis. **Acta Physiologiae Plantarum**, Poland, v.33, n.4, p.1123-1233, 2011.

BARBOSA, W.; CAMPO-DALL'ORTO, F. A.; OJIMA, M.; NOVO, M. C. S. S.; BETTI, J. A.; MARTINS, F. P. Conservação e germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de pereira portaenxerto Taiwan Nashi-C. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.54, n.3, p.147-151, 1997.

CABONI, E.; LAURI, P.; D'ANGELI, S. *In vitro* plant regeneration from callus of shoot apices in apple shoot culture. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.19, n.8, p.755-760, 2000.

CARVALHO, A. C. P. P., TOMBOLATO, A. F. C., RODRIGUES, A. A. J., SANTOS, E. O., SILVA, F. Panorama da Micropropagação no Brasil com Énfase em Flores e Plantas Ornamentais. In: Aspectos Práticos na Micropropagação de Plantas. Cruz das Almas: Tatiana Góes Junghans & Antonio da Silva Souza, 2009. p. 13-42.

CARVALHO, P. C. T. Doenças de rosáceas. *In*: *Manual de fitopatologia:* doenças de plantas cultivadas. 2. ed. São Paulo: Ceres, 1980. p. 443-458.

COLOMBO, R. Portinnesti del PERO, un modello vincente, 2003. Disponível em: <a href="http://www.ermesagricoltura.it/rivista/2003/settembre/RA030972s.pdf">http://www.ermesagricoltura.it/rivista/2003/settembre/RA030972s.pdf</a>. Acesso em: 6 de março de 2012.

FAO. FAOSTAT data. Disponível em: <a href="http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor">http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor</a>>. Acesso em: 30 jan. 2013.

FIDEGHELLI, C.; LORETI, F. **Monografia dei portinnesti dei fruttiferi**. Roma: Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, 2009. 239p.

FIORAVANÇO, J. C.; SIMONETTO, P. R.; GRELLMANN, E. O. Comportamento fenológico e produtivo de marmeleiros em Veranópolis, RS. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.1, p.15-20, 2006.

- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: CBAB-EMBRAPA, 1998. p. 183-260.
- GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese Somática e sementes sintéticas. In: Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA/SPI, 1999. p. 533-568.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola Municipal. Disponível em: <a href="http://www.sidra.ibge.gov.br">http://www.sidra.ibge.gov.br</a>. Acesso em: 30 jan. 2013.
- JACKSON, J. E. The growing of apples and pears. In: Biology of apples and pears. Cambridge: Cambridge University Press, 2003. p.4-21.
- KOZAI, T.; ALFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A. **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system.** Dordrecht: Springer, 2005. 316p.
- LIU, X.; PIJUT, P. M. Plant regeneration from *in vitro* leaves of mature black cherry (*Prunus serotina*). **Plant Cell**, **Tissue and Organ Culture**, Hague, v.94, p.113–123, 2008.
- LORETI, F.; GIL, G. Portainjertos para el peral: situacion actual y perspectivas. **Fruticola**, Italia, v.15, n.2, p.45-50, 1994.
- LORETI, F.; MASSAI, R. Il contributo dell'Università di Pisa al miglioramento genético dei portinnesti. **Frutticoltura**, Bologna, n.4, p.9-13, 1998.
- NOGUEIRA, F. T. S.; COSTA, M. G.; FIGUEIRA, M. L.; OTONI, W. C.; FINGER, F. L. Regeneração *in vitro* de plantas de tomateiros 'Santa Clara' e seu mutante natural 'Firme'. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.1, p.63-71, 2001.
- PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; RAMOS, J. D.; VALE, M. R. do; SILVA, C. R. de. R. **Fruticultura comercial:** propagação de plantas frutíferas. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 137p.
- PIO, R; ARAÚJO, J. P. C.; SCARPARE FILHO, J. A.; MOURÃO FILHO, F.de A. A.; ABRAHÃO, E. Potencial de propagação de cultivares de marmeleiro por estaquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.26, n.2, p.287-289; 2004.
- PIO, R.; CAMPO DALL'ORTO, F. A.; ALVARENGA, A. A.; ABRAHÃO, E.; BUENO, S. C. S.; MAIA, M. L. . **A Cultura do Marmeleiro**. 29. ed. Piracicaba: DIBD/ESALQ, 2005. 53 p.
- SILVA, I. M. de C da; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B.; BIANCHI, V. J. Resposta diferencial ao uso do thidiazuron na regeneração *in vitro* de marmeleiros, cvs. Adams e MC. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.17, n.3-4, p.375-382, 2011.
- SOTIROPOULOS, T. E.; MOUHTARIDOU, G. N.; THOMIDIS, T.; TSIRAKOGLOU, V.; DIMASSI, K. N.; THERIOS, I. N. Effects of different N-sources on growth,

nutritional status, chlorophyll content, and photosynthetic parameters of shoots of the apple rootstock MM 106 cultured *in vitro*. **Biologia Plantarum**, Praga, n.49, v.2, p.297-299, 2005.

# CAPÍTULO I

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE PORTAENXERTO DE PEREIRA EM FUNÇÃO DA VEDAÇÃO DOS FRASCOS E DO ESTADO FÍSICO DO MEIO DE CULTURA

# Multiplicação *in vitro* de portaenxerto de pereira em função da vedação dos frascos e do estado físico do meio de cultura

In vitro multiplication of pear rootstocks depending on the sealing and physical state of the medium

RESUMO - O objetivo foi estudar os efeitos da vedação dos frascos (papel alumínio, filme PVC e tampa de polipropileno) e do estado físico do meio de cultura (semisólido e líquido) na multiplicação in vitro de marmeleiro cultivar MC e Adams. Utilizou-se meio de cultura MS suplementado com mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), 6benzilaminopurina (0,3 mg L<sup>-1</sup>), sacarose (30 g L<sup>-1</sup>), ágar Merck® (8 g L<sup>-1</sup>) no meio solidificado e vermiculita (3 g frasco<sup>-1</sup>) no meio líquido. Aos 60 dias verificou-se que para 'MC' papel alumínio com meio semi-sólido proporcionou maior percentagem de explantes brotados (100%) e comprimento médio dos brotos (1,52 cm). Maior massa fresca média (0,15 g) obteve-se com tampa de polipropileno e meio semi-sólido. Maior massa seca média por brotação (0,03 g) obteve-se pela tampa de polipropileno ou filme PVC em meio semi-sólido. Meio semi-sólido propiciou maior número médio de brotos (1,58). Para 'Adams' tampa de polipropileno com meio líquido proporcionou maior comprimento médio dos brotos (2,86 cm). Maior massa fresca média por brotação (0,16 g) obteve-se com tampa de polipropileno e meio líquido. Maior massa seca média por brotação (0,04 g) obteve-se com uso de tampa de polipropileno em meio líquido e filme plástico em meio semi-sólido. Meio semisólido proporcionou maior percentagem de explantes brotados (78,67%) e maior número médio de brotos (1,55). Concluímos que o meio semi-sólido e o papel alumínio ou tampa de polipropileno favoreceram a multiplicação in vitro de marmeleiro.

Palavras-chave: marmeleiro, Cydonia oblonga, micropropagação, microambiente.

ABSTRACT - The objective was to study the effects of sealing the flask (aluminum foil, PVC film and polypropylene cap) and the physical state of the culture medium (half-solid and liquid) on the in vitro multiplication of guince cultivar MC and Adams. Was used MS medium supplemented with myo-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), 6 benzylaminopurine (0.3 mg L<sup>-1</sup>), sucrose (30 g L<sup>-1</sup>), agar Merck® (8 g L<sup>-1</sup>) on halfsolid medium and vermiculite (3 g flask-1) in the liquid medium. At 60 days it was found that to 'MC' aluminum foil with half-solid medium provided a highest percentage of shooted explants (100%) and highest shoot length (1.52 cm). Highest fresh weight (0.15 g) was obtained with a polypropylene cap and half-solid medium. Highest dry matter (0.03 g) was obtained by the polypropylene cap or PVC film on half-solid medium. Half-solid medium promoted the highest number of shoots (1.58). For 'Adams' polypropylene cap with liquid medium provided highest shoot length (2.86 cm). Highest fresh weight (0.16 g) was obtained with a polypropylene cap and liquid medium. Highest dry matter (0.04 g) was obtained by polypropylene cap on liquid medium and plastic film on half-solid medium. Half-solid medium vielded the highest percentage of shooted explants (78.67%) and highest number of shoots

(1.55). We conclude that the half-solid medium and the aluminum foil or polypropylene cap favored the multiplication *in vitro* of quince.

**Keywords:** quince, *Cydonia oblonga*, micropropagation, microenvironment.

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de sistemas de plantio de pereira em pomares de alta densidade aumenta a produção e a eficiência produtiva do pomar, e esse sistema é possível devido a utilização de portaenxertos de marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) (POLICARPO et al., 2006). Sendo assim, o uso de técnicas que venham melhorar a capacidade de propagação, bem como, a produção de mudas com maior qualidade genético-sanitária são de grande interesse econômico.

Dentro deste contexto, a micropropagação é uma técnica de cultura de tecidos que apresenta vantagens em relação aos métodos tradicionais de propagação vegetativa, como a estaquia e a mergulhia de cepa, destacando-se o alto índice de multiplicação, possibilidade de propagação de espécies com dificuldade de multiplicação vegetativa *in vivo* e produção de material durante todo o ano (MALYSZ et al., 2011).

A indução da brotação de gemas e o seu desenvolvimento *in vitro* são afetados por muitos fatores como, por exemplo, o microambiente no frasco de cultura. O frasco para cultivo de plantas *in vitro*, pode ser considerado como uma mini casa de vegetação. Contudo, o ambiente físico *in vitro* é particularmente diferente daquele encontrado na casa de vegetação, em função da escala e do manejo de condições de luminosidade, temperatura e umidade. Logo, as taxas de crescimento e de desenvolvimento e muitas das características fisiológicas e morfológicas das plantas formadas *in vitro* são influenciadas pelo ambiente físico dos recipientes (KOZAI et al., 2005).

Para manter a esterilidade do interior dos frascos de cultivo *in vitro* de plantas, normalmente se utiliza tampas ou materiais que limitam a passagem de ar e de contaminantes entre o interior e o exterior dos frascos, contribuindo para o aumento da umidade no interior dos mesmos. O movimento do ar em frascos de cultivo fechado é muito menor do que em condições de casa de vegetação, pois as tampas destes frascos possuem fechamento quase que hermético (KOZAI et al., 2005).

O ambiente fechado, no qual os explantes são submetidos, proporciona, de modo geral, o acúmulo de etileno, fitohormonio gasoso, que afeta a diferenciação, desenvolvimento, morfologia e crescimento das plantas, diminuindo a expansão foliar e o comprimento dos brotos, inibindo a regeneração de novos brotos e causando necrose apical, além de promover abscisão foliar nos cultivos *in vitro*. A utilização de tampas que favorecem as trocas gasosas pode levar a diminuição da concentração de etileno no interior dos frascos (NEPOMUCENO et al., 2007).

Outro fator a ser considerado é o estado físico dos meios de cultura. A maioria dos trabalhos sobre multiplicação *in vitro* de marmeleiro baseia-se no uso de meios de cultura semi-sólido. Entretanto, a utilização de meios de cultura líquidos tem proporcionado igual ou até maior eficiência para diversas espécies vegetais, como abacaxi (FEUSER et al., 2001), banana (LEVIN et al., 1997) e cana-de-açúcar (LORENZO et al., 1998). A facilidade na preparação e manipulação dos meios e a redução dos custos pela eliminação do ágar ou outro tipo de geleificante, aumentou o interesse dos pesquisadores em trabalhar com este sistema (PEREIRA; FORTES, 2003).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos do tipo de vedação dos frascos e do estado físico do meio de cultura sobre a multiplicação *in vitro* de marmeleiro cultivar MC e Adams.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, do Departamento de Botânica, do Instituto de Biologia/UFPel em Pelotas – RS.

O material vegetal utilizado foram explantes que, após estabelecidos *in vitro* a partir de segmentos nodais de brotações novas de plantas matrizes de marmeleiro - cultivares MC e Adams - mantidas em casa de vegetação, foram cultivados *in vitro* em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 0,3 mg L<sup>-1</sup> de 6- benzilaminopurina (BAP), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol e 8 g L<sup>-1</sup> de ágar.

O meio de cultura utilizado no experimento foi o meio MS acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 0,3 mg L<sup>-1</sup> de 6- benzilaminopurina (BAP). O pH do meio foi ajustado para 5,65 antes da adição de 8 g L<sup>-1</sup> de ágar Merck® no meio semi-sólido ou de 3 g frasco<sup>-1</sup> de vermiculita no meio líquido, constituindo dois

tratamentos (meio semi-sólido e meio líquido). Posteriormente, os meios foram autoclavados a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Foram utilizados frascos de 300 mL com 30 mL de meio de cultura mantidos em sala de crescimento com 16 horas de fotoperíodo, temperatura de 25 ± 2°C e densidade de fluxo de fótons de 48 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas-frias. Após a inoculação dos explantes, constituídos de segmentos nodais (1,5 cm), os frascos foram fechados com três tipos de vedações (tampa rígida de polipropileno com um orifício coberto por algodão, papel alumínio e filme de PVC).

Após 60 dias, foram avaliadas as seguintes variáveis para cada cultivar: percentagem de explantes brotados, número médio de brotos por explante, comprimento médio das brotações (cm), massa fresca e massa seca média das brotações (g), obtida a partir da secagem das brotações de cada explante, em estufa de circulação forçada a 50°C durante três dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com fatorial 2 x 3 (estado físico do meio x vedação dos frascos) para cada cultivar, analisadas separadamente, e constou de quatro repetições com cinco explantes por repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro, utilizando o software WINSTAT 1.0 (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2003). Os dados da variável percentagem de brotações foram transformados para arcsen $\sqrt{x/100}$  e os dados da variável número médio de brotos foram transformados para  $\sqrt{x} + 0.5$ . Os experimentos para ambas as cultivares foram feitos em duplicatas, utilizando-se os dados do experimento que apresentou as melhores médias para a grande maioria das variáveis respostas analisadas.

#### **3 RESULTADOS**

Para a cultivar MC, observou-se que para as variáveis percentagem de explantes brotados, comprimento médio dos brotos, massa fresca e massa seca média das brotações houve interação entre os fatores (Fig. 1). A vedação com papel alumínio juntamente com o meio de cultura geleificado com ágar proporcionou 100% de explantes brotados (Fig. 1A) e maior comprimento médio dos brotos (1,52 cm), que não diferiu da vedação com filme PVC em meio líquido (1,0 cm) (Fig. 1B). A

maior massa fresca média das brotações (0,15 g) foi obtida com uso da vedação com tampa de polipropileno e meio semi-sólido (Fig. 1C). A maior massa seca média (0,03 g) foi obtida pela vedação com tampa de polipropileno ou filme plástico em meio semi-sólido, não diferindo também do papel alumínio (0,02 g) e filme PVC em meio líquido (0,02 g) (Fig. 1D).

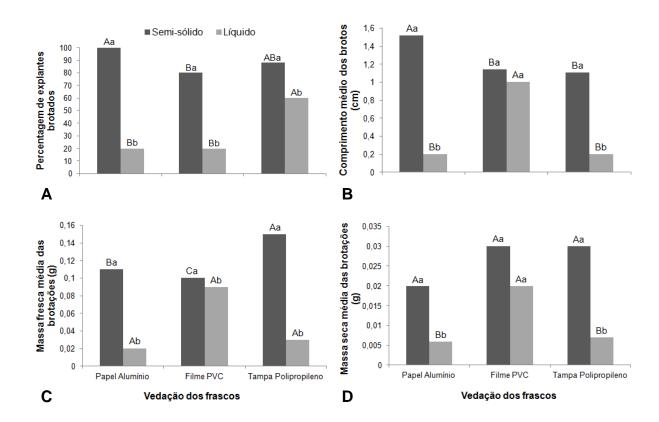
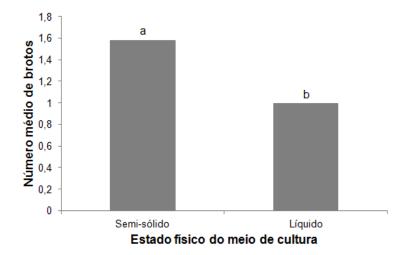


Figura 1: Percentagem de explantes brotados (A), comprimento médio dos brotos (cm) (B), massa fresca (C) e massa seca média das brotações (D) de marmeleiro 'MC' cultivado por 60 dias em meio de cultura semi-sólido ou líquido e com diferentes vedações dos frascos. UFPel, Pelotas, 2011. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas para vedação dos frascos e minúsculas para estado físico do meio, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade do erro.

Para número médio de brotos por explante não ocorreu interação entre fatores, verificando-se efeito apenas para o fator estado físico do meio de cultura (Fig. 2), onde o meio geleificado com ágar induziu maior número médio de brotos por explante (1,58), o que representa uma diferença próxima a 36% superior no número de brotações em relação ao meio líquido.



**Figura 2:** Número médio de brotos de marmeleiro 'MC' cultivado por 60 dias em meio de cultura semi-sólido ou líquido e diferentes vedações dos frascos. UFPel, Pelotas, 2011. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade do erro.

Para a cultivar Adams, observou-se que para as variáveis comprimento médio dos brotos, massa fresca e massa seca média das brotações houve interação entre os fatores (Fig. 3). A vedação com tampa de polipropileno juntamente com o meio de cultura líquido proporcionou maior comprimento médio dos brotos (2,86 cm), não diferindo da vedação com papel alumínio, filme PVC e tampa de polipropileno em meio semi-sólido (2,62; 2,24 e 1,85 cm, respectivamente) (Fig. 3A). A maior massa fresca média das brotações (0,16 g) foi obtida com uso da vedação com tampa de polipropileno e meio líquido, embora não haja diferença em relação à vedação com papel alumínio e filme PVC em meio semi-sólido (0,11 e 0,10 g, respectivamente) (Fig. 3B). A maior massa seca média (0,04 g) foi obtida pela vedação com tampa de polipropileno em meio líquido e filme plástico em meio semi-sólido (Fig. 3C).

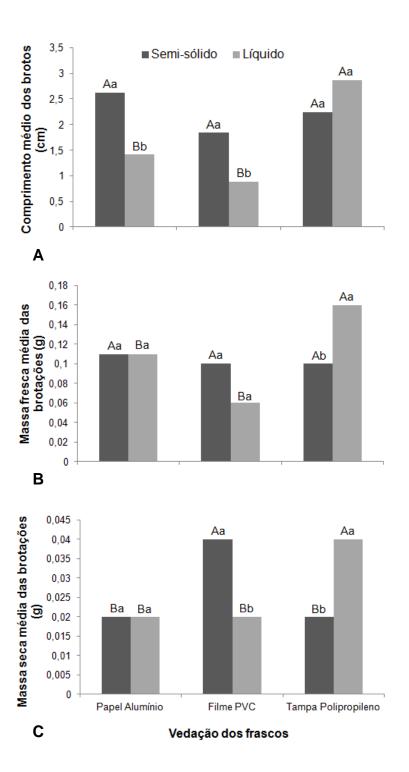


Figura 3: Comprimento médio dos brotos (A), massa fresca (B) e massa seca média das brotações (C) de marmeleiro 'Adams' cultivado por 60 dias em meio de cultura semi-sólido ou líquido e com diferentes vedações dos frascos. UFPel, Pelotas, 2011. Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas para vedação dos frascos e minúsculas para estado físico do meio, diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade do erro.

Para percentagem de explantes brotados e número médio de brotos por explante não ocorreu interação entre fatores, verificando-se efeito apenas do fator

estado físico do meio de cultura (Fig.4). Com o uso de meio de cultura geleificado com ágar obteve-se maior percentagem de brotação (78,67%) e maior número médio de brotos por explante (1,55), enquanto que o meio líquido propiciou 46,67% de explantes brotados e apenas 1,0 broto por explante.

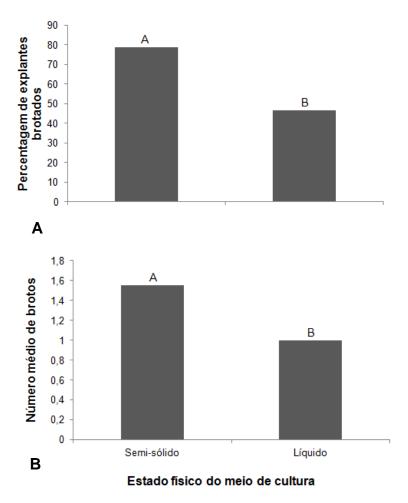


Figura 4: Percentagem de explantes brotados (A) e número médio de brotos (B) de marmeleiro 'Adams' cultivado por 60 dias em meio de cultura semi-sólido ou líquido e com diferentes vedações dos frascos. UFPel, Pelotas, 2011. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade do erro.

### 4 DISCUSSÃO

O microambiente no interior dos frascos é um fator importante a ser observado no cultivo *in vitro*. A forma do frasco, o tipo de tampa e a ventilação que essa permite, bem como o ar ambiente ao redor do frasco, afetam as trocas gasosas de frascos ventilados naturalmente (KOZAI et al., 2005). Segundo ZOBAYED et al. (2000), recentes avanços na melhoria da distribuição de ar no interior do frasco

resultaram em um crescimento mais uniforme e melhor qualidade de plantas de Eucalyptus camaludulensis, comprovando os efeitos que o controle de trocas gasosas do ambiente de cultivo exerce na propagação in vitro de plantas.

Os dados obtidos no presente trabalho permitiram inferir que para cultivar MC a vedação com papel alumínio em meio semi-sólido, além de proporcionar 100% de explantes brotados, também apresentou explantes 25% mais alongados do que nos demais tipos de vedação, exibindo estiolamento. Segundo Ribeiro et al. (2007), a redução da incidência de luz no interior do frasco causada pela vedação com alumínio, leva a um estiolamento dos caules das plantas, consequentemente, aumento em altura. Para cultivar Adams, a tampa de polipropileno apresentou melhores resultados para comprimento médio dos brotos e massa fresca (no mínimo, 9% e 31% superior as demais vedações, respectivamente).

As plantas, de maneira geral, produzem etileno, porém no cultivo *in vitro* este gás pode se acumular no interior dos frascos fechados, influenciando negativamente o crescimento e a diferenciação das mesmas (MATTHYS et al., 1995). Conforme relatado por Kozai e Nguyen (2003) o aumento da troca gasosa entre a atmosfera do interior e exterior do frasco, e a redução da umidade, permitem diminuir a concentração de etileno ao redor da planta, a partir da utilização de tampas mais permeáveis.

Em plantas de nim (*Azadirachta indica*) cultivadas em frascos com tampas totalmente vedadas e com membranas que permitiam trocas gasosa, Rodrigues et al. (2012) observaram que o número de brotos foi maior nas plantas dos frascos com membranas, e ainda relatam menos clorose e senescência quando as plantas foram cultivadas em frascos que permitiram maior troca gasosa.

Santos (2007) observou que vedações permeáveis as trocas gasosas, como por exemplo tampas de polipropileno com um ou dois orifícios, proporcionaram as melhores respostas nos parâmetros fisiológicos de crescimento em videira propagada *in vitro*. Donini et al. (2011) também concluíram que vedações mais permeáveis a trocas gasosas são desejáveis, pois utilizando papel alumínio como vedação dos frascos obtiveram os melhores resultados na multiplicação *in vitro* de oliveira cultivar 'Arbequina' quando comparado a vedação com tampa plástica e filme PVC.

Com relação ao estado físico do meio de cultura, Correia et al. (1995) relataram que os processos de absorção e translocação de íons podem sofrer

interferência do agente geleificante ágar, comumente utilizado em meio de cultura semi-sólido. Além do mais, este produto, dependendo da qualidade e/ou origem, pode apresentar na sua composição substâncias inibidoras do crescimento e do desenvolvimento de gemas conforme foi observado em *Cyanara scolumes* (DEBERGH,1983) e em *Eucalyptus grandis* (MACRAE; VAN STADEN,1990) nas fases de multiplicação e de alongamento. Já segundo Kozai e Kubota (2001) o uso de material de suporte poroso ou fibroso, como exemplo, a vermiculita, pode promover um melhor desenvolvimento fotoautotrófico de espécies de plantas clorofiladas através do aumento da concentração de CO<sub>2</sub>. De acordo com os dados obtidos neste trabalho, foi possível obter taxas de multiplicação de marmeleiro 'MC' e 'Adams' cerca de 36% superior quando se utilizou o ágar como geleificante no meio semi-sólido, em relação ao cultivo em meio líquido.

A alteração do estado físico do meio de cultura modifica a resistência física e de contato dos explantes com o meio, podendo influenciar no desenvolvimento de plantas *in vitro* (CHEN; ZIV, 2001). Assim, o maior contato dos explantes com meio, que acontece nos cultivos em meio líquido, pode aumentar a absorção de água e nutrientes, em mudas micropropagadas de batata, quando comparado ao meio semi-sólido, favorecendo a taxa de assimilação de nutrientes, resultando em maior altura, multiplicação de brotos e acúmulo de massa seca (PEREIRA; FORTES, 2003). O estado físico do meio de cultura, portanto, pode estar relacionado ao desempenho assimilatório das plantas durante o período de cultivo do material vegetal (ZIV, 1995). A utilização de meios de cultura líquidos tem proporcionado igual ou até maior eficiência para diversas espécies vegetais, porém para marmeleiro MC e Adams o meio semi-sólido ainda foi a melhor opção para multiplicação *in vitro* em relação ao líquido, conforme pode ser observado nas Figs. 2 e 4B.

Embora no presente trabalho não se tenha observado vitrificação dos explantes de marmeleiro 'MC' e 'Adams', a utilização de meios líquidos ou com baixas concentrações do geleificante ágar pode levar à vitrificação, influenciando negativamente a morfogênese *in vitro*. Na cultivar BA-29 é comum observar-se essa característica nos explantes multiplicados *in vitro* (dados não mostrados). Singha et al. (1990) em estudo com marmeleiro 'A' constataram que com o aumento da concentração de ágar (0,6; 0,9; 1,2%) na multiplicação *in vitro* ocorreu diminuição de explantes vitrificados. Por isso, mesmo apresentando vantagens em relação ao meio

semi-sólido, o uso de meios líquidos pode não ser adequado para determinadas espécies, principalmente as lenhosas, nas quais é comum o surgimento de brotações com essa característica (CHEN; ZIV, 2001).

### **5 CONCLUSÕES**

A taxa de multiplicação *in vitro* de marmeleiro 'MC' e 'Adams' é favorecida pela utilização de meio de cultura semi-sólido e vedação com tampa de polipropileno.

A vedação com papel alumínio proporciona plantas in vitro estioladas.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHEN, J.; ZIV, M. The effect of ancymidol on hyperhydricity, regeneration, starch and antioxidant enzymatic activities in liquid-culture Narcissus. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.20, n.1, p.22-27, 2001.
- CORREIA, D.; GONÇALVES, A. N.; COUTO, H. T. Z.; RIBEIRO, M. C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, Piracicaba, n.48/49, p.107-116, 1995.
- DEBERGH, P.C. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. **Physiologia plantarum**, Copenhagen, v.59, p.270-86, 1983.
- DONINI, L. P.; FIGUEIREDO, G. S.; SCHUCH, M. W. Nitrato de prata e diferentes tipos de vedação na multiplicação in vitro de oliveira 'Arbequina'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.9, p. 1532-1535, 2011.
- FEUSER, S.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Eficiência comparativa dos sistemas de cultura estacionária e imersão temporária para a micropropagação do abacaxi. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.1, p.6-10, 2001.
- KOZAI, T.; ALFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A. Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system. Dordrecht: Springer, 2005. 316p.
- KOZAI, T; KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v.114, p.525-537, 2001.
- KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T. Photoautotrophic micro-propagation of woody and tropical plants. In: Micropropagation of woody trees and fruits. Dordrecht: Kluwer Academic, 2003. p.757-781.

- LEVIN, R.; ALPER, Y.; STAV, R.; WATAD, A. Methods and apparatus for liquid media and semi-automated micropropagation. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.447, p.659-663, 1997.
- LORENZO, J. C.; GONZALES, B.; ESCALONA, M.; TEISSON, C.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C. G. Sugar cane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v.54, n.3, p.197-200, 1998.
- MACHADO, A. A.; CONCEIÇÃO, A. R. Sistema de análise estatística para Windows. **Winstat**. Versão 2.0. 2003.
- MACRAE, S.; VAN STADEN, J. *In vitro* culture of *Eucalyptus grandis*: effect of gelling agents on propagation. **Journal Plant Physiology**, Congella, v.137, p.249-51, 1990.
- MALYSZ, M.; CADORE, D.; TIBOLA, E.; LEONTIEV-ORLOV, O.; CANSIAN, R. L.; MOSSI, A. J. M. Desinfestação e micropropagação de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Perspectiva**, Erechim, v.35, n.131, p.69-77, 2011.
- MATTHYS D.; GIELIS, J.; DEBERGH, P. Ethylene. In: Automation and environmental control in plant tissue culture. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. p.473-491.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossay with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NEPOMUCENO, C. F.; RIOS, A. P. S.; QUEIROZ, S. R. O. D.; PELACANI, C. R.; SANTANA, J. R. F. Controle da abscisão foliar e morfogênese *in vitro* em culturas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul. **Revista Árvore**, Viçosa, v.31, n.5, p.967-975, 2007.
- PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.9, p.1035-1043, 2003.
- POLICARPO, M.; TALLUTO, G.; LO BIANCO, R. Vegetative and productive responses of 'Conference' and 'Williams' pear trees planted at different in row spacings. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.109, p.322-331, 2006.
- RIBEIRO, M. V.; LIMA, C. S. M.; BANDEIRA, J. M.; RUBIN, S.; BENITEZ, L. C.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Concentrações de sacarose e tipos de vedação no cultivo in vitro de Melissa officinalis L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, p.843-845, 2007.
- RODRIGUES, M.; COSTA, T. H. F.; FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; SILVA, L. C.; OTONI, W. C. Effects of flask sealing and growth regulators on *in vitro* propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant,** USA, v.48, p.67-72, 2012.

- SANTOS, R. P. Repostas morfofisiológicas de videiras cultivadas sob diferentes condições *in vitro*. 2007. 128p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- SINGHA, S.; TOWNSEND, E. C.; OBERLY, G. H. Relationship between calcium and agar on vitrification and shoot-tip necrosis of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) shoots in *vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v.23, p.135-142, 1990.
- ZIV, M. The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.393, p.25-38, 1995.
- ZOBAYED, S. M. A.; AFREEN-ZOBAYED, F.; KUBOTA, C.; KOZAI, T Mass propagation of *Eucalyptus camaludulensis* in a scaled-up vessel under *in vitro* photoautotrophic condition. **Annals of Botany**, London, v.85, p.587-592, 2000.

# CAPÍTULO II

FONTES DE CARBONO NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE PORTA-ENXERTOS DE MARMELEIRO 'MC' E 'ADAMS'

# Fontes de carbono na multiplicação *in vitro* de portaenxertos de marmeleiro 'MC' e ' Adams'

Carbon source in in vitro multiplication of quince rootstocks 'MC' and 'Adams'

RESUMO - A influência de três fontes de carbono, sacarose, frutose e sorbitol, na multiplicação in vitro de marmeleiro cultivares MC e Adams foi comparada nas concentrações de 0, 15, 30, 45 e 60 g L<sup>-1</sup>. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com fatorial 3 x 5 (fonte de carbono x concentração), com quatro repetições por tratamento. O meio de cultura constituíu-se dos sais e vitaminas MS, suplementados com mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), 6- benzilaminopurina (BAP) (0,3 mg L<sup>-1</sup>), ágar (8 g L<sup>-1</sup>) e sacarose, frutose ou sorbitol. Aos 60 dias após o início dos tratamentos verificou-se que para cultivar MC a concentração de 60 g L-1 de sacarose e 30 g L<sup>-1</sup> de frutose proporcionaram 100% de explantes brotados. As brotações mais compridas (1.49 cm) foram obtidas com a utilização de 30 g L 1 de sacarose e 60 g L 1 de sorbitol. A concentração de 45 g L 1 proporcionou maior número de brotos (1,76), maior massa fresca (0,058 g) e maior massa seca das brotações (0,02 g). Além disso, o maior número de brotos (1,47) foi obtido na presença de sacarose e a maior massa seca das brotações (0,01 g) foi obtida com sacarose e sorbitol. Para a cultivar Adams com sacarose na concentração de 30 g L 1 obteve-se maior comprimento médio dos brotos (2,14 cm), maior massa fresca (0,1 g) e maior massa seca das brotações (0,03 g). A maior percentagem de explantes brotados foi obtida na concentração de 30 g L-1 (79,58%) e com a sacarose como fonte de carbono (71,25%). O maior número médio de brotos (1,45) foi obtido também na concentração de 30 g L<sup>-1</sup>.

**Palavras-chave:** *Cydonia oblonga*, micropropagação, concentração, sacarose, frutose, sorbitol.

ABSTRACT - The influence of three carbon sources, sucrose, fructose and sorbitol on in vitro shoot proliferation of quince cultivars MC and Adams was compared at 0, 15, 30, 45 and 60 g L<sup>-1</sup> concentrations. The experimental design was completely randomized with factorial 3 x 5 (carbon source x concentration), with four replicates per treatment. The culture medium consisted of MS salts and vitamins supplemented with myo-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), 6 - benzylaminopurine (BA) (0.3 mg L<sup>-1</sup>), agar (8 g L<sup>-1</sup>) and sucrose, fructose or sorbitol. At 60 days after the start of treatment was found that for cultivar MC the concentration 60 g L<sup>-1</sup> sucrose and 30 g L<sup>-1</sup> fructose yielded 100% of explants shooted. Shoots longer (1.49 cm) were obtained using 30 g L<sup>-1</sup> sucrose and 60 g L<sup>-1</sup> sorbitol. The concentration 45 g L<sup>-1</sup> provided greatest number of shoots (1.76), greatest fresh weight (0.058 g) and greatest dry mass (0.02 g). Moreover, the greatest number of shoots (1.47) was obtained in the presence of sucrose and increased dry weight (0.01 g) was obtained with sucrose and sorbitol. To cultivar Adams with sucrose at concentration 30 g L<sup>-1</sup> gave a highest average length of the shoots (2.14 cm), greatest fresh weight (0.1 g) and greatest dry weight (0.03 g). The highest percentage of shooted was obtained at a concentration of 30 g L<sup>-1</sup> (79.58%) and sucrose as the carbon source (71.25%). The highest number of shoots (1.45) was also obtained at a concentration of 30 g L<sup>-1</sup>.

**Keywords:** *Cydonia oblonga*, micropropagation, concentration, sucrose, fructose, sorbitol.

## 1 INTRODUÇÃO

O marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.), pertencente à família Rosaceae e subfamília Pomae, vem sendo utilizado com bastante sucesso como portaenxerto para pereira em países da Europa, e mais recentemente no Brasil (FIORAVANÇO et al., 2006).

A produção de mudas de marmeleiro pode ser realizada utilizando-se sementes ou via estaquia, mergulhia de cepa e a micropropagação, ainda não muito desenvolvida no Brasil. Mesmo possuindo sementes viáveis, estas são em pequena quantidade nos frutos (menos de 10) e a formação de pomares por esta técnica não é recomendada, visto que a desuniformidade entre as plantas é elevada e o porte e o vigor são maiores quando comparadas com plantas produzidas por métodos de propagação vegetativa (PIO et al., 2007). Já a obtenção de mudas de marmeleiro por meio de estaquia aumentam os riscos de difusão de material contaminado por agentes fitopatogênicos.

Assim, técnicas que venham melhorar a capacidade de propagação são de grande interesse. Dentro deste contexto, a micropropagação é uma técnica de cultura de tecidos que apresenta vantagens em relação aos métodos tradicionais, destacando-se o alto índice de multiplicação, possibilidade de propagação de espécies com dificuldade de multiplicação vegetativa *in vivo* e produção de material durante todo o ano (MALYSZ et al., 2011).

O crescimento e a multiplicação *in vitro* de brotos são afetados por muitos fatores, dentre os quais podem ser mencionados a concentração e tipo de fonte de carbono exógena adicionada ao meio de cultura para servir como fonte de energia e também para manter o potencial osmótico do meio (HAQUE et al., 2003; DE NETO; OTONI, 2003). Em geral, a sacarose é a fonte de carbono preferencialmente utilizada na cultura *in vitro*, porque é o carboidrato predominante na seiva do floema da grande maioria das plantas. Porém, o sorbitol tem sido relatado como o principal açúcar transportado via floema nas espécies de plantas da família Rosaceae (AHMAD et al., 2007). Afora estas duas fontes de carbono usadas na cultura de tecidos de plantas, a frutose também tem sido utilizada, porém os seus efeitos tem

sido controversos, muito embora verificou-se ser uma boa fonte de carbono para culturas de portaenxerto de macieira M9 (BORKOWSKA; SZCZERBA, 1991).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da concentração e fonte de carbono sobre a multiplicação *in vitro* de marmeleiro cultivares MC e Adams.

### **2 MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia/UFPel em Pelotas – RS, no ano de 2012.

Segmentos nodais com aproximadamente 1,0 cm, estabelecidos e mantidos da mesma forma que no experimento descrito no Capítulo I, foram inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 0,3 mg L<sup>-1</sup> de 6- benzilaminopurina (BAP) e sacarose, frutose ou sorbitol nas concentrações 15, 30, 45, 60 g L<sup>-1</sup> e tratamento controle (sem adição de fonte de carbono).

O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,65 e em seguida autoclavado a 121°C e 1,5 atm durante 20 minutos. Posteriormente em câmara de fluxo laminar, os explantes foram inoculados em frascos de 300 mL, contendo 30 mL do meio de cultura MS. Após a inoculação dos explantes, os frascos foram fechados com tampa rígida de polipropileno com um orifício coberto por algodão e mantidos em sala de crescimento convencional, com fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de 25±2°C, com intensidade de 48 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecida por lâmpadas brancas fluorescentes.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com fatorial 3 x 5 (fonte de carbono x concentração) para cada cultivar, analisadas separadamente, e constou de quatro repetições, cada uma representada por um frasco contendo cinco explantes. Após 60 dias, foram avaliadas as seguintes variáveis para cada cultivar: percentagem de explantes brotados, número médio de brotos por explante, comprimento médio das brotações (cm), massa seca e massa fresca média das brotações (g), sendo esta obtida a partir da secagem das brotações de cada explantes em estufa de circulação forçada a 50°C durante 3 dias.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de

probabilidade de erro e analisados por regressão polinomial, através do programa estatístico WinStat 2.0 (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2003). Os dados da variável percentagem de brotações foram transformados para arcsen $\sqrt{x/100}$  e os dados da variável número médio de brotos foram transformados para  $\sqrt{x}+0.5$ . Os experimentos para ambas as cultivares foram feitos em duplicatas, utilizando-se os dados do experimento que apresentou as melhores médias para a grande maioria das variáveis respostas analisadas.

#### **3 RESULTADOS**

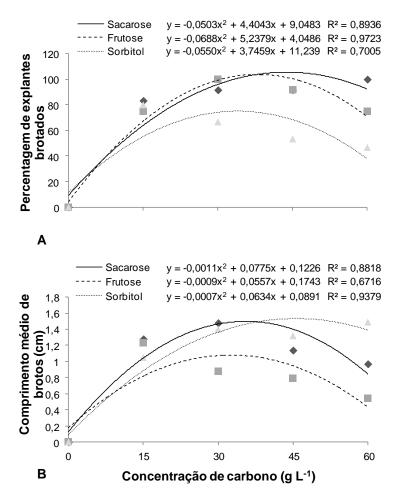
A taxa de multiplicação dos explantes foi influenciada significativamente pelas concentrações e tipos de açúcares utilizados nos meios de cultura, em todas as variáveis analisadas para as cultivares, MC e Adams.

De acordo com a análise de variância realizada para cultivar MC, observou-se que para as variáveis percentagem de brotação e comprimento médio dos brotos houve interação entre os fatores (Fig. 1). Pela estimativa da equação de regressão observou-se que a concentração de 43,78 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 38,06 g L<sup>-1</sup> de frutose proporcionaram 100% de explantes brotados (Fig. 1A). Embora a resposta quadrática para a percentagem de brotação inferiu ponto de máxima de 38,06 g L<sup>-1</sup> de frutose, verificou-se que a concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de frutose apresentou valor igual ao verificado no ponto de máxima, 100%.

Para comprimento médio das brotações, foi possível estimar pela equação de regressão que a utilização de 35,22 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 45,28 g L<sup>-1</sup> de sorbitol proporcionaram maiores comprimento dos explantes (1,48 e 1,52 cm, respectivamente). Embora a resposta quadrática para comprimento médio dos brotos inferiu ponto de máxima de 35,22 g L<sup>-1</sup> de sacarose, verificou-se que a concentração de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose apresentou valor similar ao verificado no ponto de máxima, 1,47 cm (Fig. 1B).

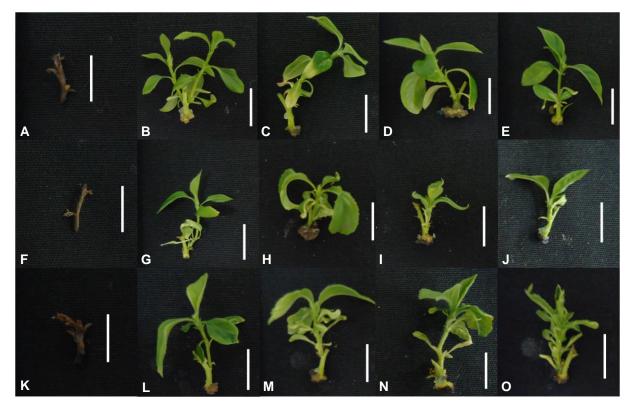
Na Fig. 1A é possível observar que aumentos na concentração de sorbitol diminuíram a capacidade de brotação dos explantes, apresentando também uma redução em valores percentuais em relação as demais fontes de carbono. Mesmo assim, aqueles brotos formados no meio contendo esta fonte de carbono

apresentaram um bom comprimento médio das suas brotações, variando de 1,05 a 1,49 cm.



**Figura 1:** Percentagem de explantes brotados (A) e comprimento médio dos brotos (cm) (B) de marmeleiro 'MC' cultivado por 60 dias em meio de cultura com diferentes fontes e concentrações de carbono. UFPel, Pelotas, 2012.

Na Fig. 2 visualiza-se a diferença entre os comprimentos das brotações dos explantes de cada tratamento da cultivar MC, sendo possível também observar que em meios sem uma das fontes de carbono os explantes não sobreviveram.



**Figura 2:** Explantes de marmeleiro 'MC' cultivado por 60 dias em meio de cultura com diferentes fontes e concentrações de carbono. (A) Controle; (B) 15 g L<sup>-1</sup> sacarose; (C) 30 g L<sup>-1</sup> sacarose; (D) 45 g L<sup>-1</sup> sacarose; (E) 60 g L<sup>-1</sup> sacarose; (F) Controle; (G) 15 g L<sup>-1</sup> frutose; (H) 30 g L<sup>-1</sup> frutose; (I) 45 g L<sup>-1</sup> frutose; (J) 60 g L<sup>-1</sup> frutose; (K) Controle; (L) 15 g L<sup>-1</sup> sorbitol; (M) 30 g L<sup>-1</sup> sorbitol; (N) 45 g L<sup>-1</sup> sorbitol; (O) 60 g L<sup>-1</sup> sorbitol. UFPel, Pelotas, 2012. Barra = 1 cm.

Para as variáveis número médio de brotos por explante, massa fresca e massa seca das brotações não ocorreu interação entre fatores, verificando-se efeito apenas da concentração e da fonte de carbono para número médio de brotos e massa seca média das brotações e efeito da concentração da fonte de carbono para massa fresca média das brotações (Fig. 3).

Para a variável número médio de brotos foi possível estimar pela equação regressão que a concentração de 38,30 g L<sup>-1</sup> das fontes de carbono foi mais efetiva quando comparada com as demais concentrações (1,76 brotos explante<sup>-1</sup>) (Fig 3A).

A concentração de 45 g L<sup>-1</sup> das fontes de carbono proporcionou maior massa fresca (0,058 g) (Fig. 3E) e maior massa seca das brotações (0,02 g) (Fig. 3C). Para esta última variável citada, observou-se que a concentração de 45 g L<sup>-1</sup> foi 50% superior a concentração de 30 e 60 g L<sup>-1</sup>. Quando comparada com a concentração de 15 g L<sup>-1</sup>, esta diferença aumentou para 65%. Com relação ao tipo de fonte de carbono, o maior número de brotos (1,47) (Fig. 3B) foi obtido na presença de

sacarose. Essa fonte mostrou-se 27% superior ao sorbitol e 35% superior à frutose. A maior massa seca (0,01 g) (Fig. 3D) foi obtida com sacarose e sorbitol, sendo estas 50% superiores à frutose.

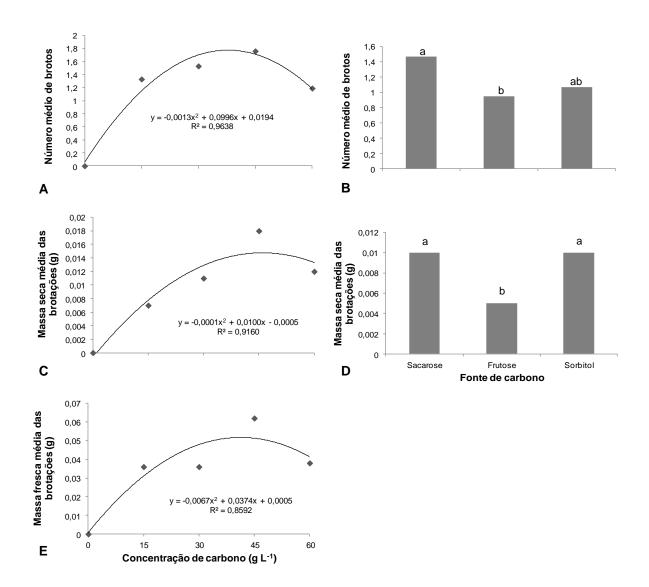
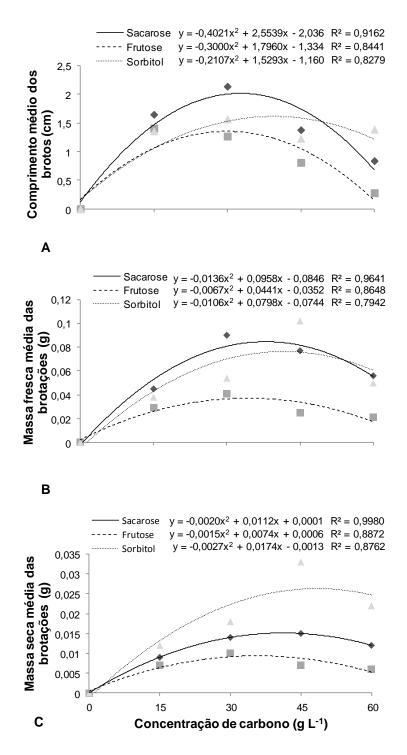


Figura 3: Número médio de brotos (A e B), massa seca (g) (C e D) e massa fresca média das brotações (g) (E) de marmeleiro 'MC' cultivado por 60 dias em meio de cultura com diferentes fontes e concentrações de carbono. UFPel, Pelotas, 2012. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade do erro.

Para a cultivar Adams, observou-se que para o comprimento médio dos brotos (Fig. 4A), massa fresca (Fig. 4B) e massa seca média das brotações (Fig. 4C) houve interação entre os fatores. A sacarose na concentração de 30 g L<sup>-1</sup> foi mais efetiva para essas variáveis quando comparada com os demais tratamentos, proporcionando maior comprimento médio dos brotos (2,14 cm), maior massa fresca

média (0,1 g) e maior massa seca média das brotações (0,03 g). Com uso de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, a massa seca das brotações foi cerca de 73% superior, em relação a mesma concentração de sorbitol e frutose.



**Figura 4:** Comprimento médio dos brotos (cm) (A), massa fresca (g) (B) e massa seca média das brotações (g) (C) de marmeleiro 'Adams' cultivado por 60 dias em meio de cultura com diferentes fontes e concentrações de carbono. UFPel, Pelotas, 2012.

Na Fig. 5 visualiza-se a diferença entre os comprimentos das brotações dos explantes de cada tratamento da cultivar Adams, sendo possível também observar que em meios sem uma das fontes de carbono os explantes não sobreviveram.



**Figura 5:** Explantes de marmeleiro 'Adams' cultivado por 60 dias em meio de cultura com diferentes fontes e concentrações de carbono. (A) Controle; (B) 15 g L<sup>-1</sup> sacarose; (C) 30 g L<sup>-1</sup> sacarose; (D) 45 g L<sup>-1</sup> sacarose; (E) 60 g L<sup>-1</sup> sacarose; (F) Controle; (G) 15 g L<sup>-1</sup> frutose; (H) 30 g L<sup>-1</sup> frutose; (I) 45 g L<sup>-1</sup> frutose; (J) 60 g L<sup>-1</sup> frutose; (K) Controle; (L) 15 g L<sup>-1</sup> sorbitol; (M) 30 g L<sup>-1</sup> sorbitol; (N) 45 g L<sup>-1</sup> sorbitol; (O) 60 g L<sup>-1</sup> sorbitol. UFPel, Pelotas, 2012. Barra = 1 cm.

Para a variável percentagem de explantes brotados verificou-se efeito da fonte e da concentração de carbono (Fig. 6A e B). Pela estimativa da equação de regressão a maior percentagem de explantes brotados foi obtida na concentração de 35,27 g L<sup>-1</sup> (86,33%) (Fig. 6A) e com a sacarose como fonte de carbono (71,25%) (Fig. 6B). Para esta variável é possível observar que a sacarose foi 26% superior à frutose e 38% superior ao sorbitol.

Para a variável número médio de brotos verificou-se efeito apenas da concentração de carbono (Fig. 6C). O maior número médio de brotos (1,53 brotos explante<sup>-1</sup>), pela estimativa da equação de regressão, foi obtido na concentração de 36,75 g L<sup>-1</sup> (Fig. 6C).

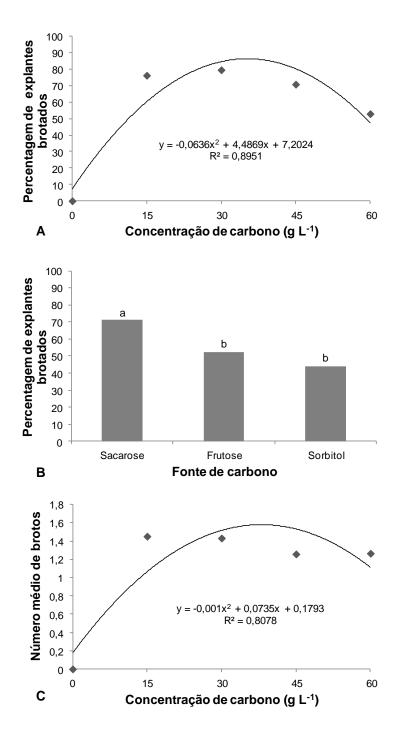


Figura 6: Percentagem de explantes brotados (A e B) e número médio de brotos (C) de marmeleiro 'Adams' cultivado por 60 dias em meio de cultura com diferentes fontes e concentrações de carbono. UFPel, Pelotas, 2012. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade do erro.

### 4 DISCUSSÃO

O pool de carboidratos é sugerido ter um papel importante na morfogênese de várias espécies lenhosas (KROMER; GAMIAN, 2000; LI; LEUNG, 2000) e isto pode ser influenciado pelo fornecimento exógeno de fontes de carbono (DE NETO; OTONI, 2003). Portanto, foi feita uma tentativa de elucidar a influência relativa da sacarose, frutose e sorbitol na multiplicação *in vitro* de marmleiro 'MC' e 'Adams'. É evidente, a partir dos resultados obtidos, que o marmeleiro possui requisitos específicos para cada cultivar quanto a concentração de carboidratos.

A sacarose é o carboidrato mais comumente utilizado na cultura de tecidos. No entanto, outros açúcares também têm sido relatados como sendo fontes de carbono adequadas para a cultura de tecidos, como exemplo o sorbitol e a frutose (BORKOWSKA; SZCZERBA, 1991).

O sorbitol, um poliol ou açúcar álcool, é uma forma reduzida de cetose e é importante em espécies de *Prunus*, *Malus* e *Pyrus*, bem como em membros da família Apiaceae, Oleaceae e Celestraceae. Estima-se que até 30% do carbono fixado pelas plantas está na forma de polióis (MARINO et al., 2003). Em espécies que preferencialmente translocam este tipo de açúcar, tecidos vegetativos tais como pecíolos, caules e raízes podem acumular polióis, mas não há nenhuma evidência de que isto ocorre por síntese direta, ao invés de simples importação do floema (MADORE, 1994).

A via de biossíntese do sorbitol está intimamente relacionada com a de outros açúcares tais como glicose, frutose e sacarose, e depende de algumas enzimas importantes. O primeiro produto estável do processo de fotossíntese é a triose fosfato, que é o precursor imediato de todos os carboidratos e é sintetizado nas folhas de origem. Outros açúcares, incluindo polióis, tais como manitol e sorbitol, são subsequentemente derivado de triose fosfato (MARINO et al., 2003). Por ação das enzimas sorbitol desidrogenase e sorbitol oxidase, o sorbitol pode ser metabolizado, disponibilizando esqueletos de carbono para a produção de energia ou para a formação de novos tecidos (LEMOS; BAKER, 1998).

Nas espécies lenhosas da família Rosaceae, embora o sorbitol seja o principal açúcar transportado via floema (AHMAD et al., 2007), os representantes desta família de plantas apresentam capacidade de armazenamento desse açúcar muito variável. Walaart (1980) quantificou o conteúdo de sorbitol a partir de extratos

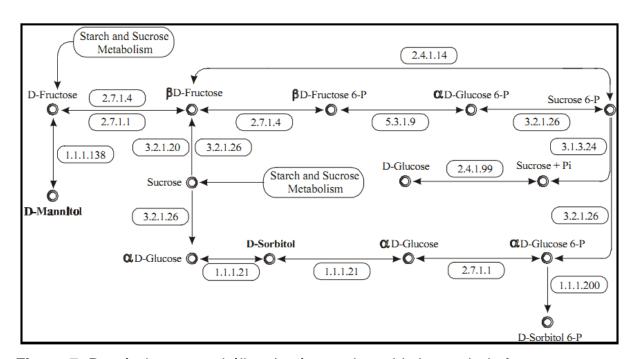
de folhas de plantas da família Rosaceae e detectou que duas amostras de marmeleiro *Cydonia oblonga* continham baixa concentração de sorbitol nas folhas (0,7 e 0,1%), enquanto que a macieira (*Malus silvestris*) apresentava 2,0% e a pereira (*Pyrus communis*) 8,7%, concluindo que o marmeleiro tem baixa capacidade de acumular sorbitol nas folhas quando comparado com outros membros da mesma família.

Sendo assim, o sucesso na multiplicação *in vitro* em meio contendo sorbitol pode estar associado a espécie que está sendo utilizada, bem como a suficiente disponibilidade de enzimas que hidrolisam este poliol. Stoop e Pharr (1993) confirmaram, em plantas que translocam sorbitol, a atividade dessas enzimas. Os resultados do presente estudo levam a supor que o marmeleiro apresenta baixa atividade das enzimas responsáveis pela conversão do sorbitol, enquanto que as enzimas responsáveis pela hidrólise da sacarose teriam maior atividade, justificando o melhor resultado obtido quando do uso da sacarose. Como visto nos resultados, para número de brotos da cultivar MC a sacarose foi 27% superior ao sorbitol. E, por exemplo, na cultivar Adams para percentagem de explantes brotados esta fonte se mostrou 38% superior ao sorbitol. Gurel e Gulsen (1998) relataram que maior massa fresca de brotos de amendoeira (*Amygdalus communis* L.) cultivados em meio contendo sorbitol pode ser devido ao fato de que os níveis elevados de açúcares redutores disponíveis no meio de cultura podem acelerar a divisão celular conduzindo assim a um aumento do volume e massa dos tecidos.

Com relação a frutose, a preferência desta fonte de carbono em relação às demais, por algumas espécies e tecidos, como o que foi observado por Borkowska e Szczerba (1991) na multiplicação de cerejeira, pode estar relacionada à inabilidade das células excretarem a enzima invertase ao meio de cultivo, não ocorrendo à hidrólise da sacarose antes da absorção da fonte de carbono (HEW; MAH, 1989). A sacarose não é a fonte imediata de carbono para os tecidos cultivados. Ela deve primeiro ser hidrolisada em glicose e frutose, ou seja, a invertase desempenha um papel importante na absorção e na utilização de sacarose. No presente experimento com marmeleiro, verificou-se que a sacarose foi a melhor fonte de carbono para o crescimento; portanto, essa espécie possivelmente não apresenta dificuldades em excretar invertase. A disponibilidade necessária desta enzima para a hidrólise eficiente de sacarose é menor em plantas que translocam sorbitol (PUA; CHONG, 1984), mas como visto anteriormente, o acúmulo de sorbitol em folhas de

marmeleiro é muito baixo em relação as outras espécies da família Rosacea, chegando a armazenar 92% a menos do que armazena a pereira, utilizando assim a sacarose como melhor fonte de carbono, possivelmente devido a menor atividade das enzimas que metabolizam sorbitol.

Marino et al. (2003) descreveram uma possível rota metabólica do sorbitol como pode ser observado na Fig. 7. A partir da frutose é formado o sorbitol, e, como visto anteriormente, as plantas de marmeleiro não acumulam grandes quantidades desse açúcar álcool, não tendo então a frutose um papel importante nessa espécie, mostrando resultados desfavoráveis nos experimentos do presente estudo, chegando a ser 50% inferior a sacarose na variável massa seca das brotações na cultivar Adams.



**Figura 7:** Possível rota metabólica da síntese de sorbitol a partir da frutose em cana de açúcar. Fonte: Marino et al., 2003.

Faria et al. (2006) verificaram maior desenvolvimento de microplantas de maracujazeiro (*Passiflora giberti* N. E. Brown) nos tratamentos com sacarose, em comparação ao sorbitol. Lemos e Baker (1998) verificaram que a frutose e o sorbitol, adicionados ao meio de cultura, não favoreceram o desenvolvimento das brotações de gravioleira (*Annona muricata* L.), enquanto a sacarose induziu maior formação de brotações adventícias nos explantes.

A cultivar MC apresentou melhores resultados quando se adicionou a concentração de 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose ao meio de cultura. Como visto anteriormente para variável massa seca das brotações, esta concentração foi 50% superior a concentração de 30 e 60 g L<sup>-1</sup> e quando comparada com a concentração de 15 g L<sup>-1</sup>, esta diferença aumentou para 65%. Essa concentração de 45 g L<sup>-1</sup> é maior do que a concentração normalmente utilizada (30 g L<sup>-1</sup>) no cultivo in vitro, e que, sustenta o desenvolvimento de brotações para a grande maioria das espécies já estabelecidas in vitro (CAO et al., 2003; AHMAD et al., 2007, ZHANG et al., 2012). O benefício advindo do aumento da concentração de sacarose no meio de cultivo, apesar de indicar um ganho sob o ponto de vista da obtenção de melhores condições de multiplicação, pode não representar uma situação de melhor condição fisiológica das plantas durante o processo de aclimatização, visto que Reuther et al. (1992) estudando o efeito de diferentes concentrações de sacarose no crescimento in vitro de Vitis vinifera cultivar Riesling verificaram que o uso de baixas concentrações de sacarose (5 g L<sup>-1</sup>) induziu a um maior grau de desenvolvimento fotoautotrófico das plantas.

A concentração ótima das diferentes fontes de carbono para multiplicação in vitro de cerejeira foi encontrada por Borkowska e Szczerba (1991) como sendo 2% ou 3% (w/v), ou seja, 20-30 g L<sup>-1</sup>. Em comparação com os outros componentes do meio, isto é uma concentração relativamente elevada, o que realça a necessidade de uma melhor compreensão da economia de utilização de carboidratos pela cultura de tecidos. Os resultados descritos por Hew et al. (1988) evidenciam a existência de uma absorção contínua de cada uma das fontes de carbono do meio. Segundo Borkowska e Szczerba (1991) a taxa de absorção de cada fonte de carbono varia de acordo com a concentração e o tipo de açúcar e com o tempo, durante o período de cultura. Em média, 25% a 29% dos açúcares inicialmente presentes no meio tinham sido absorvidos pelos explantes até o fim da subcultura. No entanto, apenas cerca de 3% a 5% da sacarose no meio foi encontrado na parte aérea da cultura de cerejeira. Estes autores também sugeriram que a sacarose, além do uso para formação de novos tecidos, é também utilizada para a regulação osmótica do meio e como energia de carbono prontamente utilizável, em uma proporção de 1/3 a 2/3, respectivamente, explicando a necessidade de aplicação de açúcares com uma concentração relativamente elevada ao meio de cultivo.

### **5 CONCLUSÕES**

Assim, o presente estudo leva à conclusão de que a sacarose na concentração de 45 g L<sup>-1</sup> para cultivar MC e 30 g L<sup>-1</sup> para cultivar Adams são as melhores concentrações e fonte de carbono para multiplicação *in vitro* de marmeleiro.

#### 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, T.; ABBASI, N. A.; HAFIZ, I. A.; ALI, A. Comparison of sucrose and sorbitol as main carbon energy sources in micropropagation. **Pakistan Journal of Botany**, Pakistan, v.39, n.4, p.1269-1275, 2007.

BORKOWSKA, B.; J. SZCZERBA. Influence of different carbon sources on invertase activity and growth of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) shoot cultures. **Journal of Experimental Botany**, Poland, v.42, n.240, p.911-915, 1991.

CAO, X.; FORDHAM, I.; DOUGLASS, L.; HAMMERSCHLAG, F. Sucrose level influences micropropagation and gene delivery into leaves from *in vitro* propagated highbush blueberry shoots. **Plant Cell**, **Tissue and Organ Culture**, Hague, v.75, p.255-259, 2003.

DE NETO, V. B. P.; OTONI, W. C. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.97, p.193-202, 2003.

FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. C.; JUNGHANS, T. G.; LEDO, C. A. S; SOUZA, A. S. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de *Plassiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.2, p.267-270, 2006.

FIORAVANÇO, J. C.; SIMONETTO, P. R.; GRELLMANN, E. O. Comportamento fenológico e produtivo de marmeleiros em Veranópolis, RS. **Ciência e Agrotecnologia,** Lavras, v.30, n.1, p.15-20, 2006.

GUREL, S.; Y. GULSEN. The effects of different sucrose, agar and pH levels on *in vitro* shoot production of almond (*Amygdalus communis* L.). **Turkish Journal of Botany**, Turkey, v.22, p.363-373, 1998.

HAQUE, M. S.; WADA, T.; HATTORI, K. Effects of sucrose, mannitol and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> on root tip derived shoots and subsequent bulblet formation in garlic. **Asian Journal of Plant Science**, Islamabad, v.2, n.12, p.903-908, 2003.

HEW, C. X.; MAH, T. C. Sugar uptake and invertase activity in Dendrobium tissues. **New Phytologist**, Cambridge, v.111, n.2, p.167-171, 1989.

- HEW, C. S.; TING, S. K.; CHIA, T. F. Substrate utilization by *dendrobium* tissues. **Botanical Gazette**, Chicago, v.149, p.153-157, 1988.
- KROMER, K.; GAMIAN, A. Analysis of soluble carbohydrates, proteins and lipids in shoots of M-7 apple rootstock cultured *in vitro* during regeneration of adventitious roots. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v.156, p.775-782, 2000.
- LEMOS, E. P.; BAKER, D. Shoot regeneration in response to carbon source on internodal explants of *Annona muricata* L. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.25, p.105-112, 1998.
- LI, M. S., LEUNG, D. W. M. Starch accumulation is associated with adventitious root formation in hypocotyls cuttings of *Pinus radiata*. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v.19, p.423-428, 2000.
- MACHADO, A. A.; CONCEIÇÃO, A. R. Sistema de análise estatística para Windows. **Winstat**. Versão 2.0. UFPel, 2003.
- MADORE, M. A. Handbook of plant and crop physiology. In: **Carbohydrate synthesis and crop metabolism**. New York: Marcel Dekker, p.257-273. 1994.
- MALYSZ, M.; CADORE, D.; TIBOLA, E.; LEONTIEV-ORLOV, O.; CANSIAN, R. L.; MOSSI, A. J. M. Desinfestação e micropropagação de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Perspectiva**, Erechim, v.35, n.131, p.69-77, 2011.
- MARINO, C. L.; LEITE, S. M. M.; FARRO, A. P. C.; SASSAKI, F. T.; CAMPOS, H. L. V.; COSCRATO, V. E. Putative metabolic pathway of mannitol and sorbitol in sugarcane. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.60, n.4, p.723-728, 2003.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossay with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- PIO, R.; CAMPO DALL'ORTO, F. A.; ALVARENGA, A. A.; ABRAHÃO, E.; BUENO, S. C. S.; MAIA, M. L.; CHAGAS, E. A. **Marmelo do plantio à marmelada.** ed. Campinas-SP: CATI, 2007. v.300. 49p.
- PUA, E. C.; CHONG, C. Requirement for sorbitol (D-glucitol) as carbon source for **in vitro** propagation of *Malus robusta* No. 5. **Canadian Journal of Botany**, Canada, v.62, p.1545-1549, 1984.
- REUTHER, G.; BOTSCH, K.; MEIER, K. Influence of nutricional and environmental factors on productivity and photoautotrophy of transplants *in vitro*. **Acta Horticulturae**, Yokohama, n.319, p.47-52, 1992.
- STOOP, J.M.H.; PHARR, D.M. Effect of different carbon sources on relative growth rate, internal carbohydrates, and mannitol 1-oxidoreductase activity in celery suspension cultures. **Plant Physiology**, USA, v.103, p.1001-1008, 1993.

WAALART, R. A. M. Distribution of sorbitol in Rosaceae. **Phytochemistry**, Inglaterra, v.19, p.2603-2610, 1980.

ZHANG, J.; GAO, W.; WANG, J.; LI, X. Effects of sucrose concentration and exogenous hormones on growth and periplocin accumulation in adventitious roots of *Periploca sepium* Bunge. **Acta Physiologiae Plantarum**, Poland, v.34, n.4, p.1345-1351, 2012.

# **CAPÍTULO III**

REGENERAÇÃO DE FOLHAS DE PORTAENXERTO DE MARMELEIRO CULTIVADAS *IN VITRO* 

### Regeneração de folhas de portaenxerto de marmeleiro cultivadas in vitro

Regeneration of leaves of quince rootstocks cultivated in vitro

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi determinar o tipo de meio de cultura (experimento 1) e verificar o potencial de uso do thidiazuron (TDZ) combinado com ácido naftaleno acético (ANA) ou ácido indol butírico (AIB) para otimizar um protocolo de regeneração dos marmeleiros 'MC' e 'Adams' (experimento 2). Os tratamentos do experimento 1 consistiram de dois meios de cultura (MS e SH) e cinco concentrações de TDZ (0, 1,5, 3, 4,5 e 6 µM), no delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 5, com quatro repetições por tratamento. Os meios de cultura constituíram-se dos sais e vitaminas MS e SH, suplementados com mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), sacarose (30 g L<sup>-1</sup>), ágar (8 g L<sup>-1</sup>), ANA (2 µM) e TDZ. Os tratamentos do experimento 2 consistiram de dois tipos de auxina (ANA e AIB) em quatro concentrações (0; 1,0; 1,5 e 2 µM) em combinação com cinco concentrações de TDZ (0, 1,5, 3, 4,5 e 6 µM) no meio de cultura, em delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4 x 5. com quatro repetições por tratamento. Os meios de cultura constituíram-se dos sais e vitaminas SH, suplementado com mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), sacarose (30 g L<sup>-1</sup>), ágar (8 g L-1), TDZ combinados com ANA ou AIB. Aos 60 dias após o início dos experimento avaliou-se a percentagem de regeneração de brotos e o número médio de brotos. Verificou-se que a regeneração in vitro de brotos adventícios de marmeleiro das cultivares MC e Adams foi favorecida pelo uso do meio de cultura SH e pela adição de 4,5 µM de TDZ para cultivar MC e 6 µM de TDZ para a cultivar Adams combinados com 2 µM de ANA.

Palavras-chave: Cydonia oblonga, auxina, citocinina, meio de cultura.

ABSTRACT - The objective of this study was to determine the type of medium and to investigate the potential use of thidiazuron (TDZ) in combination naphthaleneacetic acid (NAA) or indole butyric acid (IBA) to optimize a protocol for regeneration of quince 'MC' and 'Adams'. The treatments of experiment 1 consisted of two culture medium (MS and SH) and five TDZ concentrations (0, 1.5, 3, 4.5 and 6 µM), in the completely randomized experimental design in factorial outline 2 x 5, with four repetitions for treatment. The culture mediums used were constituded of MS and SH salts and vitamins, supplemented with myo-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), sucrose (30 g L<sup>-1</sup>) 1), agar (8 g L-1), NAA (2 µM) and TDZ. Treatments of experiment 2 consisted of two types of auxin (NAA and IBA), five auxin concentrations (0, 1.0, 1.5 and 2 µM) and five concentrations TDZ (0, 1.5, 3, 4.5 and 6 μM) in the culture medium in a completely randomized design in a factorial 2 x 4 x 5, with four replicates per treatment. The culture medium consisted of SH salts and vitamins supplemented with myo-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), sucrose (30 g L<sup>-1</sup>), agar (8 g L<sup>-1</sup>), TDZ and NAA or IBA. At 60 days after the beginning of the treatments were evaluated the regeneration percentage of shoots and the mean number of shoots. It was verified that, the in vitro regeneration of guince adventitious shoots cvs. MC and Adams was favored by the use of the culture medium SH and for the addition of 4.5 µM of TDZ to cultivar MC and 6 µM of TDZ to cultivar Adams combined with 2 µM NAA.

**Keywords:** Cydonia oblonga, auxin, cytokinin, culture medium.

## 1 INTRODUÇÃO

A regeneração *in vitro* é bastante empregada em auxílio aos programas de melhoramento de plantas, associada à transformação genética para características de interesse (CABONI et al., 2000). Na regeneração é necessário induzir gemas adventícias no explante e, em seguida, regenerar ramos alongados e obter plantas completas a partir de células e/ou tecidos utilizados como explante (NOGUEIRA et al., 2001). Estudando o potencial de regeneração *in vitro* do marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.), Silva et al. (2011) observaram que folhas inteiras eram mais responsivas e que a adição de TDZ ao meio de cultura potencializava a regeneração dos explantes.

Essa técnica de regeneração é interessante para as cultivares de marmeleiro, pois mesmo que no Brasil a cultura não apresente muitos problemas fitossanitários, algumas doenças e pragas incidem de tal forma que podem propiciar danos econômicos importantes, principalmente em viveiros durante a fase de produção das mudas. A doença mais importante da cultura do marmeleiro é, em particular, a entomosporiose, também conhecida como "Ferrugem", causada pelos fungos Fabraea maculata (forma perfeita) e Entomosporium maculatum (forma imperfeita), que também pode incidir sobre plantas de outras Rosáceas, como a pereira e macieira (PIO et al., 2005). Plantas de marmeleiro atacadas por este fungo, reduzem significativamente a área fotossintética da folha, e causa o desfolhamento precoce das plantas, afetando o acúmulo de fotoassimilados, a qualidade das mudas e a produtividade das plantas. Sendo assim, no caso da produção de portaenxertos a introdução de resistência a esta doença é importante no manejo da cultura e para a redução na aplicação de agroquímicos (CARVALHO, 1980).

Para o estabelecimento prévio de um protocolo de regeneração *in vitro* eficiente e reproduzível, de modo que os explantes regenerem brotos, deve ser levado em conta que a indução e expressão das possíveis respostas morfogênicas em culturas de células, tecidos e órgãos *in vitro*, são dependentes de fatores como meio de cultura, genótipo, reguladores de crescimento (auxina e citocinina), tamanho, idade, e posição dos explantes, fotoperíodo, ou intensidade da luz (LIU;

PIJUT, 2008). Entre os fatores destaca-se a utilização dos reguladores de crescimento como as citocininas que estimulam a formação de novos órgãos a partir da cultura de tecidos, a expansão foliar, a germinação de sementes e a superação da dominância apical em brotações e raízes (HWANG et al., 2012); e as auxinas, outro grupo de reguladores de crescimento fundamentais na indução da divisão celular e diferenciação de raízes, muitas vezes utilizadas nas fases de multiplicação para favorecer o crescimento das culturas (MANTOVANI; FRANCO, 1998). Destacase mais uma vez o trabalho clássico de Skoog e Miller (1957) sobre a importância do balanço entre citocininas e auxinas na determinação das respostas morfogênicas *in vitro*.

Outro fator que influencia a regeneração *in vitro* é o tipo de meio de cultura utilizado, que além de fornecer as substâncias essenciais para o crescimento, também controlam o padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS et al., 1998). Uma grande variedade de meios de cultura tem sido utilizada para a regeneração de diferentes espécies de plantas. Entre eles ressalta-se o meio básico MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), e, no caso da espécie em estudo, o meio SH (SCHENK; HILDEBRANT, 1972).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi determinar o tipo de meio de cultura, o tipo e concentração de auxina que combinada com thidiazuron (TDZ) favoreçam a regeneração *in vitro* de brotos adventícios de marmeleiro cultivar MC e Adams a partir de folhas.

#### **2 MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia/UFPel em Pelotas – RS, no ano de 2011.

Os explantes foram obtidos de brotações de marmeleiro, cultivares MC e Adams, em fase de multiplicação *in vitro*, 30 dias após a repicagem. Folhas inteiras escarificadas em dois locais perpendicularmente à nervura central foram inoculadas com a face adaxial em contato com o meio de cultura (Fig. 1).



**Figura 1:** Folha de marmeleiro escarificada em dois locais perpendicularmente à nervura central (A) e inoculadas com a face adaxial em contato com o meio de cultura (B) para regeneração *in vitro*. UFPel, Pelotas, 2011.

### 2.1 Experimento 1: Meio de cultura x Concentrações de TDZ

Os meios de cultura utilizados constituíram-se dos sais e vitaminas MS e sais e vitaminas SH, ambos acrescidos de 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 2 µM de ácido naftalenoacético (ANA) (ERIG; SCHUCH, 2005a) e TDZ (1,5, 3, 4,5 e 6 µM) e tratamento controle (sem TDZ).

### 2.2 Experimento 2: Concentrações de TDZ x Concentrações de auxinas

O meio de cultura utilizado constituiu-se dos sais e vitaminas SH, acrescido de 100 mg  $L^{-1}$  de mio-inositol, 30 g  $L^{-1}$  de sacarose e de concentrações de ANA ou AIB (0, 1, 1,5 e 2  $\mu$ M) combinadas com thidiazuron (TDZ) (1,5, 3, 4,5 e 6  $\mu$ M).

#### 2.3 Manutenção e avaliação dos experimentos

O pH de cada meio de cultura foi ajustados para 5,65 antes da inclusão do ágar na concentração de 8 g L<sup>-1</sup> e, posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Foram utilizados frascos de 200 mL com 30 mL de meio de cultura.

Após a inoculação, os frascos com os explantes foram mantidos em sala de crescimento no escuro durante 10 dias, sob temperatura de 25 ± 2°C. Transcorrido este período, os mesmos foram transferidos para luz com 16 horas de fotoperíodo e densidade de fluxo de fótons do período de luz de 42 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas-frias.

#### 2.4 Delineamento experimental e análise estatística

Os delineamentos experimentais foram inteiramente casualizados, em esquema fatorial 2 x 5 (meios de cultura x concentrações de TDZ) para o experimento 1, e 2 x 4 x 4 (tipos de auxina x concentrações de TDZ) para o experimento 2, ambos para as cultivares MC e Adams, analisadas separadamente.

Foram utilizadas quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída de um frasco com cinco explantes.

Aos 60 dias após a inoculação, avaliou-se a percentagem de explantes regenerantes e o número médio de brotos com comprimento acima de 0,5 cm.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro e analisados por regressão polinomial, através do programa estatístico WinStat 2.0 (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2003). Os dados da variável percentagem de brotações foram transformados para arcsen $\sqrt{x/100}$  e os dados da variável número médio de brotos foram transformados para  $\sqrt{x} + 0.5$ . Os experimentos para ambas as cultivares foram feitos em triplicatas, utilizando-se os dados do experimento que apresentou as melhores médias para das variáveis analisadas.

#### **3 RESULTADOS**

### 3.1 Experimento 1: Meio de cultura x concentrações de TDZ

Pela análise da variância dos dados da cultivar MC, observou-se efeito significativo da interação entre o tipo de meio de cultura e a concentração de TDZ

para as variáveis analisadas. Na Fig. 2 é possível observar o aspecto geral dos explantes dessa cultivar de marmeleiro.

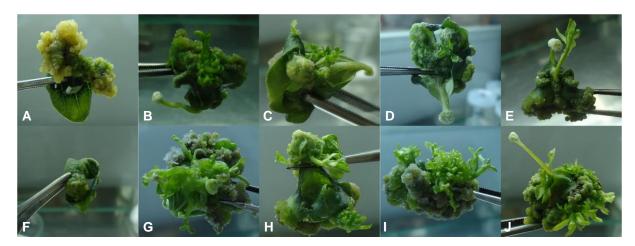
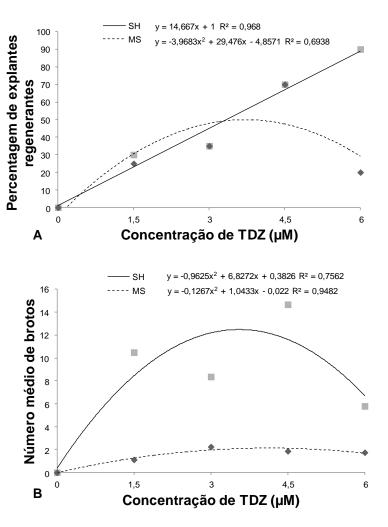


Figura 2: Regeneração de marmeleiro 'MC' cultivado por 60 dias em diferentes meios de cultura com diferentes concentrações de TDZ. (A) MS + 0 μM TDZ; (B) MS + 1,5 μM TDZ; (C) MS + 3 μM TDZ; (D) MS + 4,5 μM TDZ; (E) MS + 6 μM TDZ; (F) SH + 0 μM TDZ; (G) SH + 1,5 μM TDZ; (H) SH + 3 μM TDZ; (I) SH + 4,5 μM TDZ; (J) SH + 6 μM TDZ. UFPel, Pelotas, 2011.

A maior percentagem de explantes regenerados foi obtida no meio SH com 6 μM de TDZ (90%), seguida pela concentração de 4,5 μM de TDZ no meio SH e MS (70% para ambos) (Fig.3A). O maior número médio de brotos (14,68) foi obtido no meio SH com 4,5 μM de TDZ, enquanto que no meio MS o número médio de brotos não foi superior a 2,5, independente da concentração de TDZ utilizada (Fig.3B).



**Figura 3:** Percentagem de explantes regenerantes (A) e número médio de brotos (B) de marmeleiro 'MC' cultivado por 60 dias em diferentes meios de cultura com diferentes concentrações de TDZ. UFPel, Pelotas, 2011.

Para a cultivar Adams não foi observado regeneração dos explantes em nenhum tratamento com meio MS, independente da concentração de TDZ utilizada. Para os explantes cultivados no meio SH observou-se efeito significativo da concentração de TDZ. Na Fig. 4 é possível observar o aspecto geral dos explantes de marmeleiro 'Adams'.

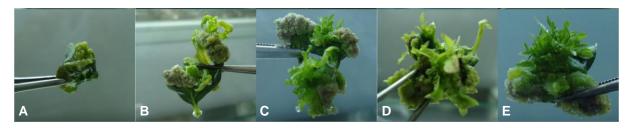
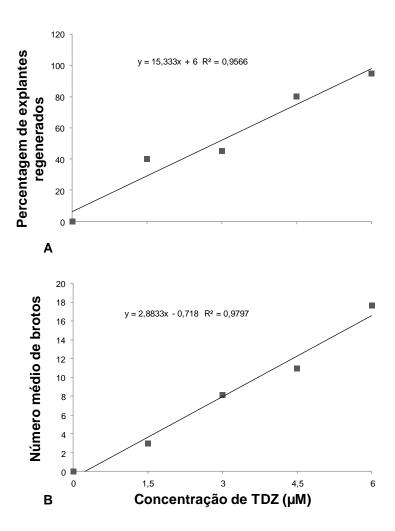


Figura 4: Regeneração de marmeleiro 'Adams' cultivados por 60 dias em diferentes meios de cultura com diferentes concentrações de TDZ. (A) SH + 0 μM TDZ; (B) SH + 1,5 μM TDZ; (C) SH + 3 μM TDZ; (D) SH + 4,5 μM TDZ; (E) SH + 6 μM TDZ. UFPel, Pelotas, 2011.

Observa-se, na Fig. 5, que a concentração de 6 µM de TDZ foi a que proporcionou maior percentagem de explantes regenerados (95%) (Fig. 5A) e maior número médio de brotos (17,65) (Fig. 5B), havendo uma resposta linear crescente, para as duas variáveis com o aumento da concentração de TDZ em meio SH.



**Figura 5:** Percentagem de explantes regenerados (A) e número médio dos brotos (B) de marmeleiro 'Adams' cultivado por 60 dias em meio de cultura SH com diferentes concentrações de TDZ. UFPel, Pelotas, 2011.

### 3.2 Experimento 2: Concentrações de TDZ x concentrações de auxinas

Para cultivar MC não houve interação entre tipo e concentração de auxina, e concentração de TDZ para a variável percentagem de explantes regenerados, observando-se efeito simples da concentração de TDZ e da concentração de auxina. O aspecto geral dos explantes de marmeleiro 'MC' pode ser observado nas Figs. 6 e 7.

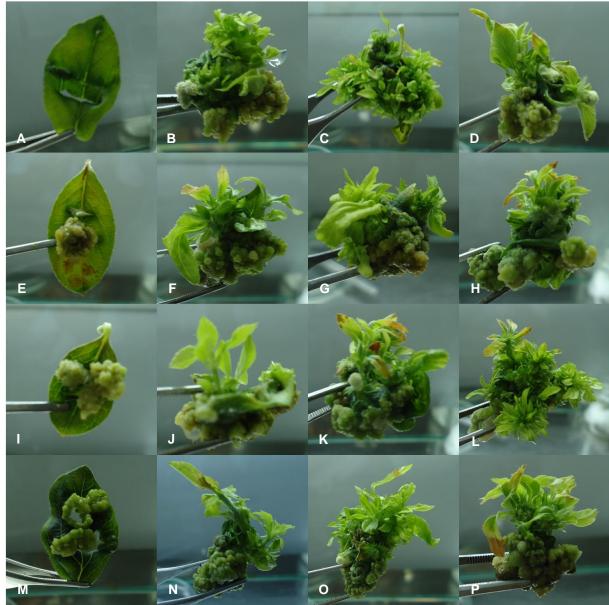


Figura 6: Regeneração de marmeleiro 'MC' cultivado por 60 dias em meio SH com diferentes concentrações de ANA combinadas com concentrações de TDZ. (A) 0 μM ANA + 1,5 μM TDZ; (B) 1 μM ANA + 1,5 μM TDZ; (C) 1,5 μM ANA + 1,5 μM TDZ; (D) 2 μM ANA + 1,5 μM TDZ; (E) 0 μM ANA + 3 μM TDZ; (F) 1 μM ANA + 3 μM TDZ; (G) 1,5 μM ANA + 3 μM TDZ; (H) 2 μM ANA + 3 μM TDZ; (I) 0 μM ANA + 4,5 μM TDZ; (J) 1 μM ANA + 4,5 μM TDZ; (K) 1,5 μM ANA + 4,5 μM TDZ; (L) 2 μM ANA + 4,5 μM TDZ; (M) 0 μM ANA + 6 μM TDZ; (N) 1 μM ANA + 6 μM TDZ; (O) 1,5 μM ANA + 6 μM TDZ; (P) 2 μM ANA + 6 μM TDZ. UFPel, Pelotas, 2012.

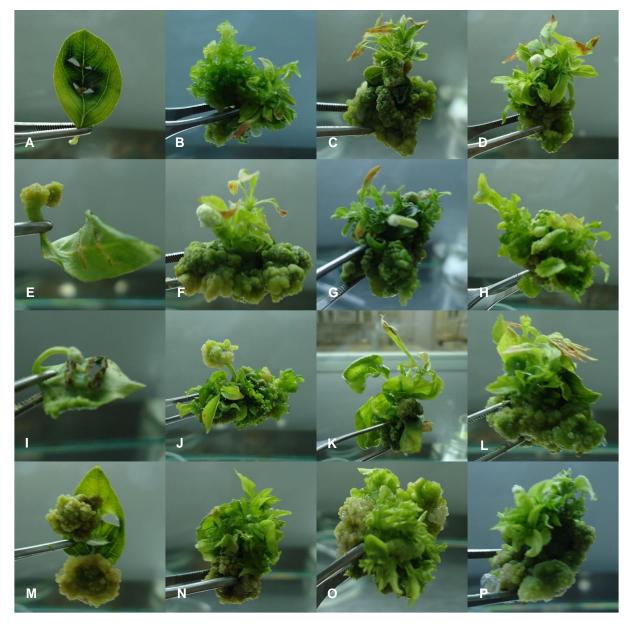
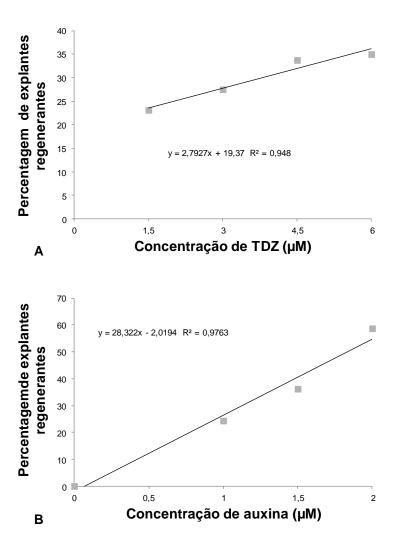


Figura 7: Regeneração de marmeleiro 'MC' cultivado por 60 dias em meio SH com diferentes concentrações de AIB combinadas com concentrações de TDZ. (A) 0 μM AIB + 1,5 μM TDZ; (B) 1 μM AIB + 1,5 μM TDZ; (C) 1,5 μM AIB + 1,5 μM TDZ; (D) 2 μM AIB + 1,5 μM TDZ; (E) 0 μM AIB + 3 μM TDZ; (F) 1 μM AIB + 3 μM TDZ; (G) 1,5 μM AIB + 3 μM TDZ; (H) 2 μM AIB + 3 μM TDZ; (I) 0 μM AIB + 4,5 μM TDZ; (J) 1 μM AIB + 4,5 μM TDZ; (K) 1,5 μM AIB + 4,5 μM TDZ; (L) 2 μM AIB + 4,5 μM TDZ; (M) 0 μM AIB + 6 μM TDZ; (N) 1 μM AIB + 6 μM TDZ; (O) 1,5 μM AIB + 6 μM TDZ; (P) 2 μM AIB + 6 μM TDZ. UFPel, Pelotas, 2012.

A maior percentagem de explantes regenerados foi 35% superior na concentração de 6  $\mu$ M de TDZ (35%), em relação a 1,5  $\mu$ M de TDZ (22,77%), não diferindo entretanto da concentração de 4,5  $\mu$ M de TDZ (33,75%) (Fig.8A). Quanto aos efeitos da auxina, verificou-se uma resposta linear crescente onde registrou-se 58,57% de explantes regenerados com uso de 2  $\mu$ M de auxina, proporcionando uma

diferença de 61,5% na taxa de regeneração quando comparado com o uso de 1 uM de auxina (Fig.8B). A partir dos resultados obtidos é possível comprovar a necessidade de uso de TDZ e de auxina, e que o aumento das concentreçãos destes reguladores de crescimento no meio de cultivo são determinantes para o aumento da percentagem de regeneração.



**Figura 8:** Percentagem de explantes regenerantes de marmeleiro 'MC' cultivado por 60 dias em meio SH com diferentes tipos e concentrações de auxina combinados com concentrações de TDZ. (A) Efeito simples da concentração de TDZ; (B) efeito simples da concentração de auxina. UFPel, Pelotas, 2012.

Para número médio de brotos verificou-se interação significativa entre o tipo de auxina, a concentração de auxina e a concentração de TDZ (Tab.1). O maior número médio de brotos (14,18) foi obtido na concentração de 4,5  $\mu$ M de TDZ combinada com 2  $\mu$ M de ANA.

Na comparação das auxinas, pode-se observar que na concentração de 1,5  $\mu$ M de auxina combinado com 4,5  $\mu$ M de TDZ, ANA foi 58% superior ao AIB. Fazendo-se essa mesma comparação, mas na concentração de 2  $\mu$ M de auxina observa-se que ANA foi 31% superior ao AIB. A concentração de 4,5  $\mu$ M de TDZ apresentou resultado 68% superior quando comparado com 6  $\mu$ M de TDZ, ambas combinadas com 1,5  $\mu$ M de ANA.

**Tabela 1:** Número médio de brotos de marmeleiro 'MC' cultivado por 60 dias em meio SH com diferentes tipos e concentrações de auxina combinados com concentrações de TDZ. UFPel, Pelotas, 2012.

ANA (μM)			AIB (μM)					
TDZ (µM)	0	1,0	1,5	2,0	0	1,0	1,5	2,0
1,5	0 aB <sup>a</sup>	7 aA <sup>a</sup>	9,5 bA <sup>a</sup>	10 bA <sup>a</sup>	0 aC <sup>a</sup>	3 aBC <sup>b</sup>	5,75 aB <sup>b</sup>	9,75 aA <sup>a</sup>
3,0	0 aB <sup>a</sup>	6,95 aA <sup>a</sup>	6,83 bcA <sup>a</sup>	8,75 bA <sup>a</sup>	0 aC <sup>a</sup>	3 aBC <sup>b</sup>	5,75 aAB <sup>a</sup>	8,5 aA <sup>a</sup>
4,5	0 aB <sup>a</sup>	3,5 abB <sup>a</sup>	13,31 aA <sup>a</sup>	14,18 aA <sup>a</sup>	0 aC <sup>a</sup>	4,25 aB <sup>a</sup>	5,5 aB <sup>b</sup>	9,75 aA <sup>b</sup>
6,0	0 aC <sup>a</sup>	2,75 bBC <sup>b</sup>	4,25 cAB <sup>a</sup>	6,75 bA <sup>a</sup>	0 aB <sup>a</sup>	5,75 aA <sup>a</sup>	7 aA <sup>a</sup>	8,75 aA <sup>a</sup>

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas para concentração de TDZ, maiúsculas para concentração de auxina e sobrescritas para tipo de auxina, diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade do erro.

Para a variável percentagem de explantes regenerados da cultivar Adams se observou interação dupla entre os fatores concentração de TDZ e concentração de auxina, concentração de TDZ e tipo de auxina, e tipo e concentração de auxina. O aspecto geral dos explantes de marmeleiro 'MC' pode ser observado nas Figs. 9 e 10.

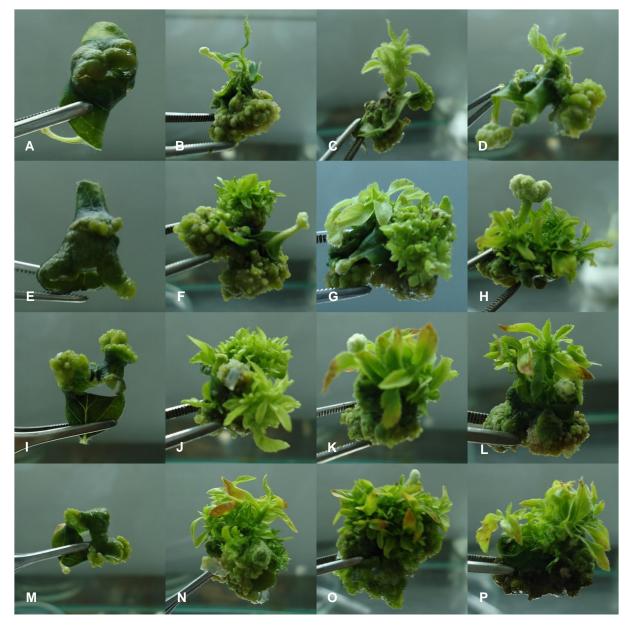


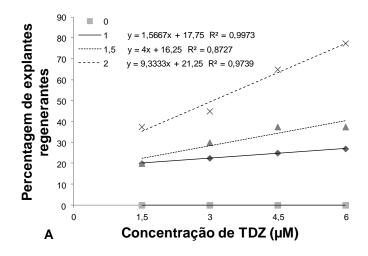
Figura 9: Regeneração de marmeleiro 'Adams' cultivado por 60 dias em meio SH com diferentes concentrações de ANA combinadas com concentrações de TDZ. (A) 0 μM ANA + 1,5 μM TDZ; (B) 1 μM ANA + 1,5 μM TDZ; (C) 1,5 μM ANA + 1,5 μM TDZ; (D) 2 μM ANA + 1,5 μM TDZ; (E) 0 μM ANA + 3 μM TDZ; (F) 1 μM ANA + 3 μM TDZ; (G) 1,5 μM ANA + 3 μM TDZ; (H) 2 μM ANA + 3 μM TDZ; (I) 0 μM ANA + 4,5 μM TDZ; (J) 1 μM ANA + 4,5 μM TDZ; (M) 1,5 μM ANA + 4,5 μM TDZ; (L) 2 μM ANA + 4,5 μM TDZ; (M) 0 μM ANA + 6 μM TDZ; (N) 1 μM ANA + 6 μM TDZ; (O) 1,5 μM ANA + 6 μM TDZ; (P) 2 μM ANA + 6 μM TDZ. UFPel, Pelotas, 2012.

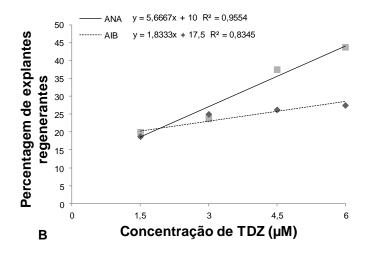


Figura 10: Regeneração de marmeleiro 'Adams' cultivado por 60 dias em meio SH com diferentes concentrações de AIB combinadas com concentrações de TDZ. (A) 0 μM AIB + 1,5 μM TDZ; (B) 1 μM AIB + 1,5 μM TDZ; (C) 1,5 μM AIB + 1,5 μM TDZ; (D) 2 μM AIB + 1,5 μM TDZ; (E) 0 μM AIB + 3 μM TDZ; (F) 1 μM AIB + 3 μM TDZ; (G) 1,5 μM AIB + 3 μM TDZ; (H) 2 μM AIB + 3 μM TDZ; (I) 0 μM AIB + 4,5 μM TDZ; (J) 1 μM AIB + 4,5 μM TDZ; (K) 1,5 μM AIB + 4,5 μM TDZ; (L) 2 μM AIB + 4,5 μM TDZ; (M) 0 μM AIB + 6 μM TDZ; (N) 1 μM AIB + 6 μM TDZ; (O) 1,5 μM AIB + 6 μM TDZ; (P) 2 μM AIB + 6 μM TDZ.. UFPel, Pelotas, 2012.

A maior percentagem de explantes regenerados foi obtida na concentração de 6  $\mu$ M de TDZ combinado com 2  $\mu$ M de auxina (77,5%) (Fig. 11A), na concentração de 6  $\mu$ M de TDZ combinado com 2  $\mu$ M de ANA (43,75%) (Fig. 11B) e na concentração de 2  $\mu$ M da auxina ANA (65%) (Fig. 11C). A partir dos resultados

expostos na Fig. 4 é possível perceber que aumentando a concentração de TDZ e a concentração de auxina ocorre um aumento da percentagem de regeneração (Fig. 11A e B) e observa-se que na ausência de auxina não ocorre regeneração dos explantes foliares (Fig. 11C).





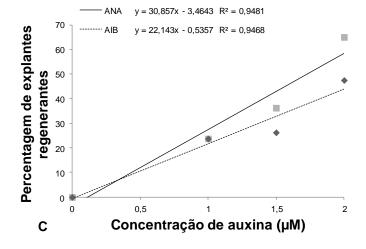


Figura 11: Percentagem de explantes regenerantes de marmeleiro 'Adams' cultivado por 60 dias em meio SH com diferentes tipos e concentrações de auxina combinados com concentrações de TDZ. (A) Interação concentração de TDZ x concentração de auxina; (B) Interação concentração de TDZ x tipo de auxina; (C) Interação tipo de auxina x concentração de auxina. UFPel, Pelotas, 2012.

Para número médio de brotos registrou-se interação entre o tipo de auxina, a concentração de auxina e a concentração de TDZ (Tab.2). Com base nos resultados é possível observar que aumentando a concentração de TDZ e de auxina aumenta o número médio de brotos, chegando a obter-se 17,37 brotos no meio de cultura acrescido de 6 µM de TDZ combinado com 2 µM de ANA.

Também para essa cultivar, pode-se observar que na concentração de 1,5 μM de auxina combinado com 6 μM de TDZ, ANA foi 68% superior ao AIB. Na concentração de 2 μM de auxina observa-se que ANA foi 42% superior ao AIB. A concentração de 6 μM de TDZ apresentou resultado 81% superior quando comparado com 1,5 μM de TDZ, ambas combinadas com 2 μM de ANA.

Tabela 2: Número médio de brotos de marmeleiro 'Adams' cultivado por 60 dias em meio SH com diferentes tipos e concentrações de auxina combinados com concentrações de TDZ. UFPel, Pelotas, 2012.

	ANA (μM)			AIB (μM)				
TDZ (µM)	0	1,0	1,5	2,0	0	1,0	1,5	2,0
1,5	0 aB <sup>a</sup>	1,5 cAB <sup>a</sup>	1,75 dAB <sup>a</sup>	3,25 cA <sup>a</sup>	0 aB <sup>a</sup>	1 aB <sup>a</sup>	1,5 bB <sup>a</sup>	4,5 cA <sup>a</sup>
3,0	0 aC <sup>a</sup>	4,25 bB <sup>a</sup>	5,75 cB <sup>a</sup>	8,87 bA <sup>a</sup>	0 aC <sup>a</sup>	2,62 abB <sup>a</sup>	3 abB⁵	7,25 bA <sup>a</sup>
4,5	0 aB <sup>a</sup>	9 aA <sup>a</sup>	9 bA <sup>a</sup>	10,37 bA <sup>a</sup>	0 aC <sup>a</sup>	3,37 abB <sup>b</sup>	4,5 aB <sup>b</sup>	7,5 bA <sup>b</sup>
6.0	0 aD <sup>a</sup>	10,75 aC <sup>a</sup>	13,75 aB <sup>a</sup>	17,37 aA <sup>a</sup>	0 aC <sup>a</sup>	4,62 aB <sup>b</sup>	4,75 aB <sup>b</sup>	10 aA <sup>b</sup>

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas para concentração de TDZ, maiúsculas para concentração de auxina e sobrescritas para tipo de auxina, diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade do erro.

#### 4 DISCUSSÃO

Embora a regeneração de novas plantas potencialmente pode ser realizada a partir de uma única célula, existe para cada espécie, um tipo de tecido e/ou órgão mais responsivo sob influência do meio de cultivo e de reguladores de crescimento. A partir desse estudo percebe-se que a regeneração de brotos de marmeleiro é possível a partir de folhas cultivadas *in vitro*, como já havia sido observado também por Silva et al. (2011). Em geral, o tipo, a concentração e a combinação de reguladores de crescimento representam um importante papel durante a regeneração *in vitro* de muitas espécies, assim como observado em portaenxertos de marmeleiro. Para Handro e Floh (1990), a organogênese é controlada pela concentração de reguladores de crescimento e pelo balanço citocinina/auxina presentes no meio de cultura.

Thidiazuron é uma feniluréia que mostra atividade citocinínica. As citocininas são substâncias que, em combinação com a auxina, estimulam a divisão celular, influenciando o crescimento das plantas (PETRI et al., 2001). Desde 1988, TDZ tem sido relatado como indutor da formação de brotos adventícios em um grande número de espécies, especialmente em plantas lenhosas, sendo que diversos estudos sugerem que o TDZ induz melhor a regeneração de brotos do que outras citocininas. Porém, a percentagem de regeneração e o número de brotos varia de acordo com a cultivar, o tipo de explante, estágio de desenvolvimento e as concentrações de citocininas e auxinas no meio de cultura (THOMAS 2003; THOMAS; PUTHUR, 2004; HUSAIN et al., 2007).

Citocininas sintéticas são conhecidas por terem notável habilidade em estimular o crescimento em cultura de tecidos e, mais recentemente, de órgãos de todo o sistema da planta (PETRI et al., 2001). Os efeitos benéficos de TDZ têm sido demonstrado em várias espécies da família Rosaceae. No presente estudo, a adição de 4,5 µM e 6 µM de TDZ combinados com ANA no meio de cultura SH favoreceu a regeneração *in vitro* de marmeleiro MC (70% e 14,68 brotos explante<sup>-1</sup>) e Adams (95% e 17,64 brotos explante<sup>-1</sup>).

Erig e Schuch (2005a) estudando as mesmas cultivares de marmeleiro, porém em meio MS obtiveram 45,29% de regeneração a partir da adição de 4,5  $\mu$ M de TDZ combinado com 2  $\mu$ M de ANA no meio de cultura e o número médio de brotos formados na folha foi de apenas 1,2 brotos explante<sup>-1</sup>, quando adicionaram 6  $\mu$ M de TDZ combinado com 2  $\mu$ M de ANA.

Os dados desse trabalho atentam para o fato de que na ausência da citocinina TDZ não ocorreu regeneração das cultivares em estudo. O mesmo foi observado por Erig & Schuch (2005a, b) também em marmeleiro 'MC' e 'Adams' e em macieira cultivares Galaxy, Maxigala e Mastergala, o que está de acordo com a afirmativa de Davies (1990), de que as citocininas constituem o grupo de fitoreguladores indispensáveis para promover a divisão celular e a diferenciação dos tecidos. Outros autores, como Howell et al., (2003), também afirmam que as citocininas promovem o desenvolvimento de brotos e a divisão celular. Portanto, a adição de citocininas ao meio de cultura promove o controle de um programa complexo da expressão de genes na cultura de tecidos, resultando na formação de brotos.

A auxina ANA foi mais eficaz do que o AIB para induzir a regeneração de brotos adventícios nas folhas de marmeleiro. Para cultivar MC a máxima concentração de ANA (2 μM) combinada com 4,5 μM de TDZ foi eficaz para essa cultivar, onde os explantes apresentaram taxa de regeneração na ordem de 58,75% e o maior número de brotos foi de 14,18 brotos explante<sup>-1</sup>, num período de 60 dias. Para cultivar Adams a máxima concentração de ANA (2 μM) combinada com a máxima concentração de TDZ (6 μM) testada foi eficaz e induziu maior percentagem de regeneração (77,5%) e maior número de brotos (17,37 brotos explante<sup>-1</sup>), também em 60 dias.

Segundo Pérez-Tornero et al. (2000) os efeitos de diferentes concentrações de TDZ são bastante variáveis em estudo de regeneração de brotos de marmeleiro a partir de folhas, o que torna necessário o estudo individualizado para cada cultivar. Baker e Bhatia (1993) obtiveram 85% de regeneração com uma média de 8 brotos por disco foliar de marmeleiro 'A' quando adicionaram 1,5 µM de TDZ e 2,5 µM de ANA ao meio de cultura MS. Já Dolcet-Sanjuan et al. (1991) inocularam marmeleiro 'A' em meio combinado MS-N6 com 32 µM de TDZ mais 0,3 µM de ANA e obtiveram uma frequência de regeneração de 78% com 3,2 brotos folha<sup>-1</sup>.

Os resultados deste trabalho demonstram que não ocorre regeneração *in vitro* de brotos de marmeleiro cultivar MC e Adams a partir de folhas na ausência de auxina, mesmo na presença de TDZ, e com aumento na concentração de auxina aumenta o número de explantes regenerados. Em amoreira, Gupta e Mahalaxmi (2009) obtiveram 91,7% de regeneração de explantes e uma taxa de 17,3 brotos explante-1 por regeneração direta de explantes foliares cultivados em MS + 0,1 µM de TDZ, o que em marmeleiro não foi possível de obter. Meng et al., 2004 observaram menor regeneração de brotos a partir folhas de *Rubus* spp. em meio contendo citocininas combinadas com AIB, estando de acordo com os resultados desse trabalho.

A escolha adequada do meio de cultura é um fator relevante para a micropropagação, devido ao importante papel dos componentes minerais no processo de regeneração dos explantes (RAMAGE; WILLIAMS, 2002; SILVA et al., 2008). Neste trabalho os resultados obtidos com meio SH são superiores aqueles obtidos por outros autores que trabalharam com meio MS, pelo fato de que o meio MS possui alta concentração de sais em sua composição, quando comparado com outros meios de cultura. Corroborando com os dados obtidos neste estudo, Silveira

et al. (2001) analisando cultivares Capdeboscq e GF677, Couto (2003) analisando o portaenxerto 'Tsukuba1' e Villa et al. (2009) estudando amoreira-preta (*Rubus* sp.) e portaenxerto de videira, e observaram que o meio de cultura com menor concentração de sais também favoreceu o crescimento e desenvolvimento destas espécies, demonstrando assim que espécies e/ou cultivares apresentam exigências nutricionais distintas.

Esse protocolo reprodutível e de alta freqüência de regeneração direta dos brotos, desenvolvido no presente trabalho, poderá ser utilizado para facilitar o melhoramento genético de marmeleiro através da transformação genética. Além disso, em uma etapa posterior, comprovado-se que os regenerantes não apresentam variação somaclonal, o método pode ser utilizado inclusive para a multiplicação direta e em larga escala no processo de produção de mudas.

### **5 CONCLUSÕES**

Com base nos resultados obtidos no presente estudo é possível concluir que:

- a) é possível regenerar brotos a partir de folhas de marmeleiro cultivadas in vitro;
- b) a auxina é essencial para a regeneração *in vitro* de marmeleiro em meio contendo TDZ:
- c) ANA é mais eficiente que AIB na indução de regeneração para ambas as cultivares de marmeleiro;
- d) o meio de cultura SH induz maior taxa de brotos regenerados comparado ao meio MS:
- e) a cultivar Adams não regenera em meio MS.

#### 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKER, B. S.; BHATIA, S. K. Factors effecting adventitious shoot regeneration from leaf explants of quince (*Cydonia oblonga*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v.35, p.273-277, 1993.

CABONI, E.; LAURI, P.; D'ANGELI, S. *In vitro* plant regeneration from callus of shoot apices in apple shoot culture. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.19, n.8, p.755-760, 2000.

- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P. F.; ELIAS, M. Meios nutritivos. In: Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA CNPH, v.1, 1998, 509 p.
- CARVALHO, P. C. T. Doenças de rosáceas. *In*: *Manual de fitopatologia:* doenças de plantas cultivadas. 2. ed. São Paulo: Ceres, 1980. p. 443-458.
- COUTO, M. A.; WAGNER JÚNIOR, A; QUEZADA. A. C. Enraizamento *in vitro* do portaenxerto de *Prunus* sp. 'Barrier' em diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) e do meio Murashige, Skoog (MS). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.9, n.4, p.367-370, 2003.
- DAVIES, P. J. **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Netherlands: Kluwer Academic, 1990. 681 p.
- DOLCET-SANJUAN, R.; MOK, D. W. S.; MOK, M. C. Plantlet regeneration from cultured leaves of *Cydonia oblonga* L. (quince). **Plant Cell Reports**, Berlin, v.10, p.240-242, 1991. v.35, p.273-277, 1993.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Regeneração *in vitro* de brotos e raízes adventícias de marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) cvs. MC E ADAMS, utilizados como portaenxertos para a pereira. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.11, n.4, p.419-424, 2005a.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Morfogênese in vitro de brotos de macieira (Malus domestica Borkh.) a partir de fragmentos delgados de folhas. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v.29, n.3, p.575-581, 2005b.
- GUPTA, S.; MAHALAXMI, V. *In vitro* high frequency direct plant regeneration from whole leaves of blackberry. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.120, p.22.- 26, 2009.
- HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa CNPH, p.203-212, 1990.
- HOWELL S. H., LALL S., CHE, P. Cytokinins and shoot development. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.8, p.453-459, 2003.
- HUSAIN M. K.; ANIS M.; SHAHZAD A. *In vitro* propagation of Indian Kino (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using thidiazuron. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Berlin, v.43, p.59–64, 2007.
- HWANG, I.; SHEEN, J.; MULLER, B. Cytokinin Signaling Networks. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.63, p.353-380, 2009.
- LIU, X.; PIJUT, P. M. Plant regeneration from *in vitro* leaves of mature black cherry (*Prunus serotina*). **Plant Cell**, **Tissue and Organ Culture**, Hague, v.94, p.113–123, 2008.

- MACHADO, A. A.; CONCEIÇÃO, A. R. Sistema de análise estatística para Windows. Winstat. Versão 2.0. UFPel, 2003.
- MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H. Cultura de tecidos de plantas lenhosas. Santa Maria: UFSM, CEPEF, FATEC, 1998. 22p.
- MENG, R., CHEN, T. H. H., FINN, C. E., LI, Y. Improving in vitro plant regeneration from leaf and petiole explants of 'Marion' blackberry. **HortScience**, Alexandria, v.39, n.2, p.316–320, 2004.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossay with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NOGUEIRA, F. T. S.; COSTA, M. G.; FIGUEIRA, M. L.; OTONI, W. C.; FINGER, F. L. Regeneração *in vitro* de plantas de tomateiros 'Santa Clara' e seu mutante natural 'Firme'. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.1, p.63-71, 2001.
- PÉREZ-TORNERO, O.; EGEA, J.; VANOOSTENDE, A. Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from in vitro cultured leaves of apricot. **Plant Science**, Calcutta, v.158, p.61-70, 2000.
- PETRI, J. L.; SCHUCK, E.; LEITE, G. B. Efeito do thidiazuron (TDZ) na frutificação de fruteiras de clima temperado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.33, n.3, p.513-517, 2001.
- PIO, R.; CAMPO DALL'ORTO, F. A.; ALVARENGA, A. A.; ABRAHÃO, E.; BUENO, S. C. S.; MAIA, M. L. **A Cultura do Marmeleiro**. 29. ed. Piracicaba: DIBD/ESALQ, 2005. 53 p.
- RAMAGE, C. M.; WILLIAMS, R. R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant, New York, v.38, p.116–124, 2002
- SCHENCK, R. U.; HILDEBRANDT, A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.50, p.199-204, 1972.
- SILVA, I. M. de C da; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B.; BIANCHI, V. J. Resposta diferencial ao uso do thidiazuron na regeneração *in vitro* de marmeleiros, cvs. Adams e MC. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.17, n.3-4, p.375-382, 2011.
- SILVA, R. P. da; MENDES, B. M. J.; MOURÃ FILHO, F. A. Indução e cultivo *in vitro* de gemas adventícias em segmentos de epicótilo de laranja-azeda. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, p.1331-1337, 2008.
- SILVEIRA, C. A. P.; FORTES, G. R. de L.; FACHINELLO, J. C.; RODRIGUES, A. C.; CITADIN, I.; QUEZADA, A. C.; SILVA, J. da. Multiplicação *in vitro* de portaenxertos do gênero *Prunus* sob diferentes concentrações de BAP em dois meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v23, n.3, p.488-492, 2001.

- SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. In: Molecular and Cellular Aspects of Development. New York: Harper and Row, 1965. p.481-494.
- THOMAS T. D. Thidiazuron induced multiple shoot induction and plant regeneration from cotyledonay explants of mulberry. **Biologia Plantarum**, Praga, v.46, p.529–533, 2003.
- THOMAS T. D.; PUTHUR J. T. Thidiazuron induced high frequency shoot organogenesis in callus from *Kigelia pinnata* L. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taiwan, v.45, p.307–313, 2004.
- VILLA, F.; PASQUAL, M.; ASSIS, A. de; ASSIS, G. A. de; ZÁRRAGA, D. Z. A. Micropropagação de duas espécies frutíferas, em meio de cultura DSD1, modificado com fontes de boro e zinco. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.33, n.2, p.468 472, 2009.

# **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os mesmo experimentos feitos para marmeleiro cultivares MC e Adams também foram feitos para a cultivar BA-29, porém esse marmeleiro apresentava baixa taxa de multiplicação, dificultando a montagem dos experimentos pela falta de material. Na regeneração, quando obteve-se um número satisfatório de folhas para se montar um experimento, ocorreu a formação de muitas raízes nos explantes, sem a formação de brotos. Sendo assim, os resultados para essa cultivar não foram apresentados.

Nos experimentos iniciais de regeneração também foram testados como explantes entrenós, porém somente ocorreu a formação de calo, sendo os dados não utilizados neste trabalho.

Para a cultivar MC também se realizou um experimento com a auxina 2,4-D combinada com TDZ, porém devido a falta de repetibilidade do experimento, os resultados não foram aqui apresentados.

Os resultados dos experimentos de multiplicação permitem que este portaenxerto seja propagado em larga escala, obtendo-se pela técnica de cultura de tecidos uma grande disponibilidade de mudas.

A obtenção de um protocolo eficiente de regeneração *in vitro* de marmeleiro permite, a partir de agora, estudos de transformação genética com essas cultivares, visando obter plantas resistentes a algumas doenças que a espécie apresenta e até mesmo adaptações para que possam ser melhor aproveitadas como portaenxerto, e também a multiplicação *in vitro* em larga escala.

**ANEXO** 

Tabela 1: Composição dos meios de cultura MS e SH

Componentes	MS Concentração	SH Concentração	
	(mg L <sup>-1</sup> )	(mg L <sup>-1</sup> )	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	-	
$NH_4H_2PO_4$	-	300	
$KNO_3$	1900	2500	
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	441	200	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	400	
$KH_2PO_4$	170	-	
Na₂EDTA	37,25	-	
KI	0,83	1,0	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,85	15	
Na <sub>2</sub> EDTA2H <sub>2</sub> O	-	20	
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16,9	13,2	
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6	1,0	
$H_3BO_3$	6,2	5,0	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	0,1	
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	0,1	
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,2	
Ácido Nicotínico	0,5	1,0	
Cloridrato de piridoxina	0,5	1,0	
Cloridrato de tiamina	0,5	10	
Glicina	2,0	-	