



Congrega
Urcamp 2016

13ª Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa

REVISTA DA JORNADA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA ISSN:1982-2960

13ª JORNADA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Reguladores vegetais na propagação in vitro de Tamarileiro (*Solanum betaceum*)

Plant growth regulators on in vitro propagation of Tamarillo (*Solanum betaceum*)

Andrio Copatti⁽¹⁾, Flávia Loy⁽¹⁾, Jéssica Gonzalez Cruz⁽²⁾, Camila Dias Schwartz⁽²⁾, Paulo Mello-Farias⁽³⁾.

(1) Doutorando(a) em Fruticultura de Clima Temperado, PPGA, Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, RS., CAPES, andriocopatti@gmail.com, flavia_loy@yahoo.com.br

(2) Mestranda em Fruticultura de Clima Temperado, PPGA, Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, RS., CAPES, jessica.gonzalez@hotmail.com, Camilaschdias@hotmail.com

(3) Dr(a). Professor (a)- Fruticultura de Clima Temperado, PPGA, Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, RS. mellofarias@yahoo.com.br

Resumo

Objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito dos reguladores de crescimento na multiplicação in vitro de tamarileiro (*Solanum betaceum*). O trabalho foi conduzido no Laboratório de Propagação de Plantas Frutíferas da Universidade Federal de Pelotas, RS. Segmentos caulinares com uma gema foram inoculados em meio de cultura MS, acrescidos ou não dos reguladores 6 - benzilaminopurina (BAP) (0,0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 mg L⁻¹) e ácido naftalenoacético (ANA) (0,0 e 0,1 mg L⁻¹), em diferentes combinações, sendo após mantidos em sala de crescimento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema bifatorial (concentrações de BAP x presença ou ausência de ANA), com quatro repetições, sendo cada constituída de um frasco com quatro explantes. Aos 45 dias de cultivo, foi avaliado o número médio de folhas, de brotações, comprimento médio das brotações (cm), número médio de raízes, comprimento médio da maior raiz (cm) e presença de calo. Verificou-se incremento no número de folhas e de brotações quanto maior foi a dosagem de BAP e sem a presença de auxina (ANA), porém a dosagem de BAP 0,75 mg L⁻¹, quando acrescido do regulador ANA (0,1 mg L⁻¹) promoveu o maior número de brotações em tamarileiro na multiplicação in vitro. Enquanto a menor produção de raízes ocorreu na dosagem de 0,5 mg L⁻¹ de BAP sem adição de ANA. Com relação à variável comprimento de raízes, o maior valor pode ser observado quando não houve adição de reguladores ao meio de cultivo. A adição de BAP e BAP+ANA favoreceu a formação de folhas e brotações nos explantes de tamarileiro, enquanto que em meio de cultivo sem adição de reguladores o comprimento médio das brotações foi maior e a dosagem de reguladores não interferiu na formação de calo na base dos explantes.

Palavras chave: micropropagação, auxina, citocinina.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of growth regulators on in vitro propagation of tamarillo (*Solanum betaceum*). The study was conducted at Fruit Trees Plant Propagation Laboratory of Federal University of Pelotas, Brazil. Stem segments with a bud were inoculated in MS medium plus or not plant growth regulators 6-benzylaminopurine (0,0; 0,25; 0,5; 0,75 and 1,0 mg L⁻¹ and naphthalene acetic acid (0,0 and 0,1 mg L⁻¹), in different combinations, and kept in a growth room. The experimental design was completely randomized in a factorial 5x2 (BAP x presence or absence of NAA), with four repetitions, each consisting of a bottle with four explants. At 45 days of culture the number of leaves, shoots, medium shoot length (cm), average number of roots, average length of roots (cm) and the presence of callus were evaluated. There was an increase in the number of leaves and shoots the higher the BAP dose and without the presence of auxin (NAA), but the BAP dose of 0,75 mg L⁻¹, when added growth regulator NAA (0, 1 mg L⁻¹) promoted the highest number of shoots on in vitro propagation of tamarillo. While the smaller root production occurred at BAP dose (0,5 mg L⁻¹) without NAA. The highest length roots value can be observed when there was no addition of growth regulators to the culture medium. The addition of BAP and BAP + NAA favored leaves and shoots formation in tamarillo explants whereas in medium without growth regulators the average shoot length was larger and growth regulators dosage did not interfere in callus formation on the basis of explants.

Keywords: micropropagation, auxin, cytokinin

Introdução

O tamarileiro (*Solanum betaceum*), é uma planta pertencente à família das Solanáceas nativa dos Andes, caracteriza-se como um arbusto de clima subtropical, semi lenhoso e de crescimento rápido (CHACÓN-CERDAS et al., 2014). Em países como Colômbia e Nova Zelândia tem importância comercial, pois produz um fruto chamado tamarilho, que é consumido *in natura* ou utilizado para processamento de doces, conservas e bebidas, apresentando-se também como produto de exportação. É cultivado em vários países da América do Sul e Central, podendo ser encontrado em países do leste da África, sudeste da Ásia e Índias Orientais, sem fins comerciais (ACOSTA-QUEZADA et al., 2010; DURANT et al., 2013).

É propagado tradicionalmente através de sementes ou estacas. Porém, esta forma de multiplicação não vem suprindo as necessidades de material vegetal. A propagação por via sexuada traz consigo problemas devido à alta heterogeneidade e qualidade das plantas e a proliferação de patógenos presentes na planta (CHACÓN-CERDAS et al., 2014).

A utilização de processos baseados no cultivo *in vitro* de plantas vem se tornando uma alternativa à propagação por métodos convencionais e suas limitações, pois permite a

multiplicação de forma rápida, econômica e rentável, obtendo-se plantas de alta qualidade em qualquer época do ano. Juntamente a isso, a micropropagação permite produzir plantas completas a partir de secções de materiais vegetais previamente estabelecidas *in vitro*. Com isso, obtêm-se plantas livres de doenças, vigorosas e que mantêm as características produtivas das plantas selecionadas (CORREIA; LOPES e CANHOTO, 2011).

A micropropagação do tamarileiro pode ser efetuada pela proliferação dos meristemas axilares. Devendo-se utilizar meio apropriado que disponibilize nutrientes necessários à espécie, bem como a adição de reguladores de crescimento, visando aperfeiçoar o processo de multiplicação (REIS, 2013).

As auxinas e as citocininas fazem parte do grupo de hormônios mais frequentemente utilizados. Embora às vezes facultativas no meio de multiplicação, as auxinas têm sido utilizadas para promover o crescimento de calos, suspensões celulares e no enraizamento de explantes e, em combinação com as citocininas, regular a morfogênese estabelecendo o equilíbrio adequado entre os reguladores de crescimento (SILVEIRA et al., 2002). A concentração de auxina empregada dependerá da finalidade a qual o hormônio terá, em geral, para a indução de calos utiliza-se uma maior concentração do que quando se busca o enraizamento dos explantes (CID, 2014).

As citocininas são pertencentes a um grupo hormonal que tem por característica promover a divisão celular nos vegetais. A fonte de citocinina, assim como sua concentração, são os fatores que mais influenciam o processo de desenvolvimento *in vitro* (CID, 2014). A citocinina 6 - benzilaminopurina (BAP), comercialmente disponível, tem sido muito eficaz para promover a multiplicação em diversas espécies, sendo utilizada em 60% dos meios de cultivo (CORDEIRO et al., 2004).

Objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito dos reguladores de crescimento (BAP e ANA) na multiplicação *in vitro* de *Solanum betaceum*.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Propagação de Plantas Frutíferas, Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas, no Município de Capão do Leão, RS, no ano de 2015. Os explantes

utilizados no experimento foram originados de segmentos nodais caulinares com uma gema e o ápice excisado de material pré-estabelecido de tamarileiro (*Solanum betaceum*).

O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado arranjado em esquema bifatorial, com quatro repetições. O fator de tratamento A testou diferentes hormônios (BAP e BAP + ANA) e, o fator B as doses dos mesmos (0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 mg L⁻¹, além da dose zero, que representou o controle). Na combinação de BAP + ANA a dose padronizada de ANA foi de 0,1 mg L⁻¹. Cada tratamento foi composto por quatro frascos (repetições) com quatro explantes em cada frasco.

Os explantes foram inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 30 g.L⁻¹ de sacarose, acrescidos ou não de reguladores, conforme os tratamentos. O pH do meio de cultivo foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar na concentração de 6 g.L⁻¹ e, posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Foram utilizados frascos de vidro com capacidade de 300 mL, com 30 mL de meio de cultura por frasco.

Os frascos foram fechados com papel alumínio e selados com filme de PVC transparente, após a inoculação, os frascos permaneceram em sala de crescimento com temperatura constante de 25 ± 2°C e luminosidade artificial de lâmpadas fluorescentes brancas frias, com fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 27 μmol m⁻² s⁻¹.

Aos 45 dias de cultivo, as variáveis analisadas foram número médio de folhas, número médio de brotações, comprimento médio das brotações (cm), número médio de raízes, comprimento médio da maior raiz (cm) e formação de calo.

Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk; à homocedasticidade pelo teste de Hartley; e a independência dos resíduos por análise gráfica. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância através do teste F ($p \leq 0,05$). Constatando-se significância estatística, os efeitos dos hormônios foram comparados pelo teste t ($p \leq 0,05$) e, quando presente a interação dos fatores de tratamento, a DMS do teste foi plotada no gráfico, as diferenças entre os níveis do tratamento foram consideradas significativas quando não houve sobreposição entre as barras verticais. Os efeitos das doses (mg L⁻¹) foram avaliados por modelos de regressão ($p \leq 0,05$), conforme segue: $y = y_0 + ax + bx^2$, onde: y = variável resposta; y_0 = variável resposta correspondente ao ponto mínimo da curva; a = valor máximo estimado para a variável resposta; b = declividade da curva; x = doses (mg L⁻¹).

Resultados e Discussão

Para as variáveis dependentes, número de folha, número de brotação e comprimento de raiz ocorreram interações significativas entre os fatores de hormônio e dose (Figura 1). Enquanto que para as variáveis comprimento de brotação e número de calo ocorreu somente efeito de dose (Figura 2). A variável, número de raízes não apresentou significância estatística para os fatores de tratamento hormônio ($F = 0,31$; $p = 0,5895$), dose ($F = 2,90$; $p = 0,08$) e nem para interação entre os mesmos ($F = 1,72$; $p = 0,2156$).

Verificou-se um incremento contínuo no número de folhas e de brotações na presença de BAP e sem a auxina ANA, indicando a necessidade do regulador BAP para obter maiores valores para estas variáveis (Figura 1A; 1B). Em trabalho realizado por Barghchi (1998) as doses de 0,25 a 1,0 mg L⁻¹ foram consideradas ótimas na regeneração de explantes terminais e axilares de tamarileiro.

Para Canhoto et al. (2005) a dose de 0,5 mg L⁻¹ de BAP obteve melhor resultados tanto para estabelecimento quanto para multiplicação desta espécie. Um dos principais eventos controlados pelas citocininas é a citocinese ou divisão celular, corroborando com os dados obtidos, onde observou-se aumento da produção de brotações quanto maior a dose de citocinina empregada.

Para a variável número de folhas e número de brotações, BAP na dose (0,75 mg L⁻¹) quando acrescido com o regulador ANA (0,1 mg L⁻¹) obteve os maiores valores, decaindo na dosagem de 1,0 mg L⁻¹ (BAP), porém, não diferindo significativamente da dose de (1,0 mg L⁻¹) (Figura 1A; 1B). Porém para o comprimento de raízes, o maior valor pode ser observado quando não houve adição de reguladores ao meio de cultivo (Figura 1C).

Trabalhos clássicos realizados ainda nos anos de 1950 revelaram a interação das auxinas com as citocininas, demonstrando a necessidade destas nos processos de divisão celular. Todavia, a auxina atua de forma sinérgica à citocinina. Assim, elevadas proporções de auxina induzem a formação de raízes, enquanto doses altas de citocininas se traduzem em maior formação de gemas caulinares (PERES; KERBAUY, 2013).

Com relação ao comprimento das brotações, quando não houve incremento de reguladores no meio de cultivo, evidencia-se um maior alongamento das hastes das plantas. Possivelmente devido ao explante não ter multiplicado suas brotações, pois o BAP é uma citocinina associada à indução de brotações laterais nas plantas, sincronizando a ativação das gemas (PERES; KERBAUY, 2013).

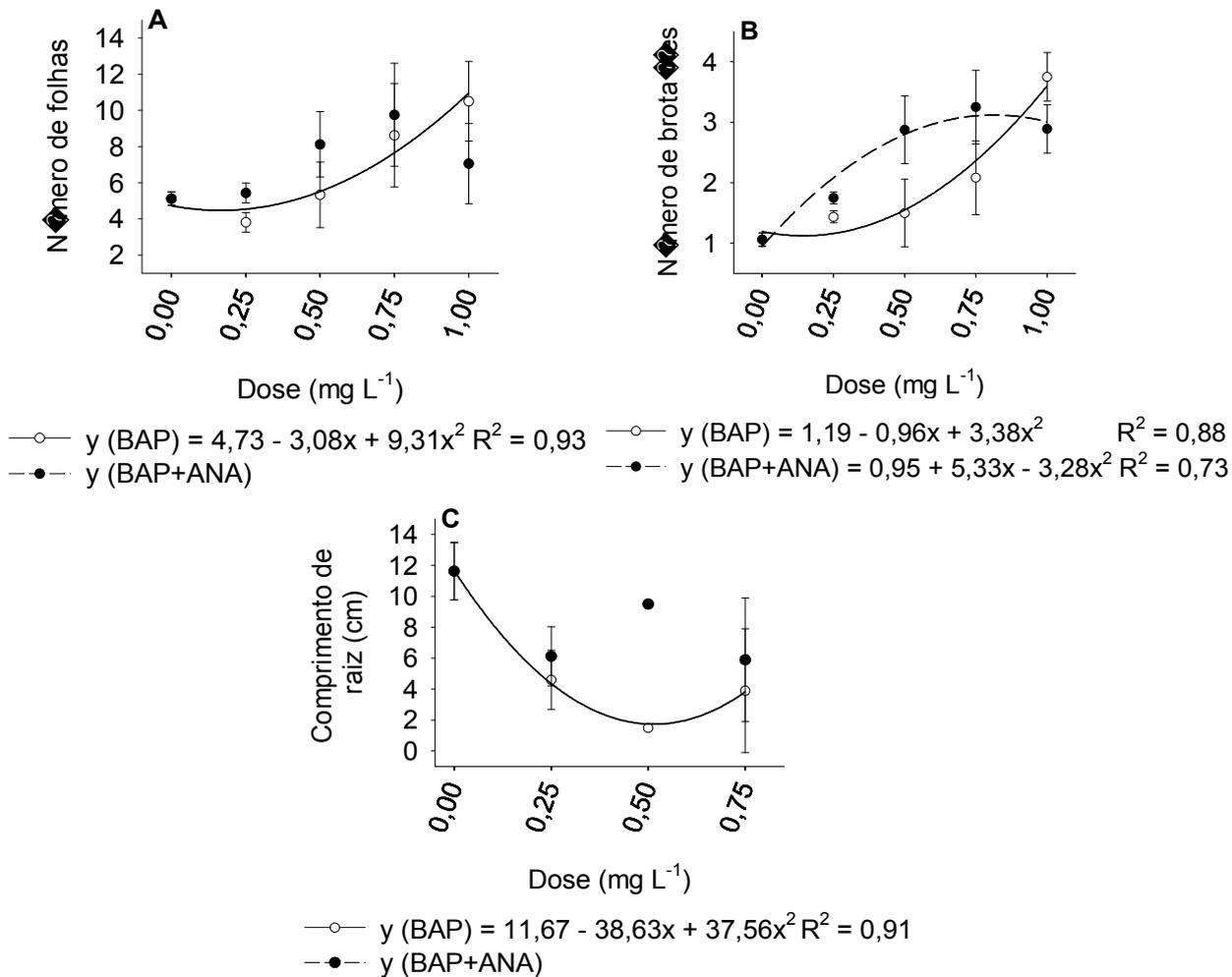
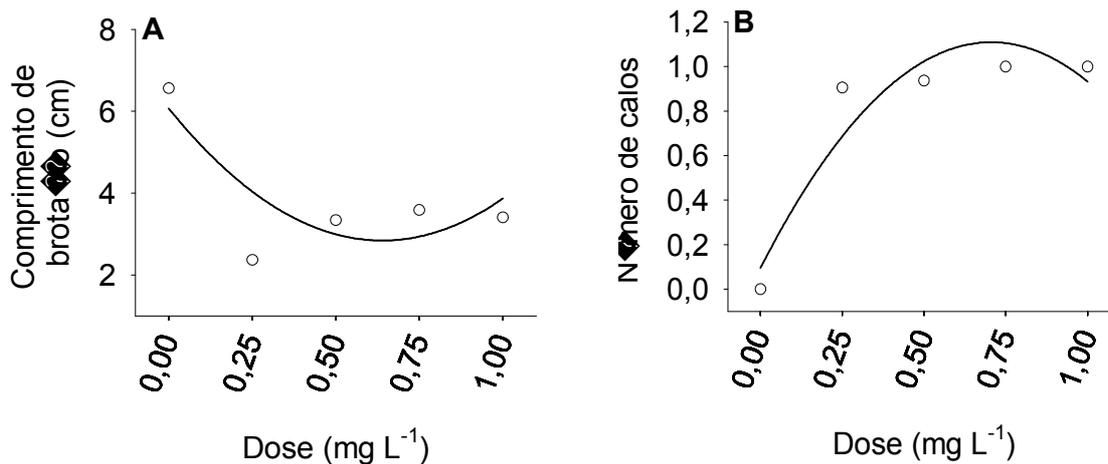


Fig. 1. Número de folhas (A), de brotações (B) e comprimento de raiz (cm) (C) de tamarileiros submetidos à aplicação de BAP e BAP+ANA em diferentes doses (0, 0,25, 0,50, 0,75 e 1,00 mg L⁻¹). UFPel, Pelotas, RS. (As barras verticais representam a DMS do teste t (p<0,05)).

A cultura se mostrou sensível à formação de calos na base dos explantes (Figura 2B), independentemente da adição de auxina, mesmo a menor dose de citocinina promoveu a formação de tecido caloso, não diferindo da maior dose de BAP empregada. Segundo Taiz e Zeiger (2013), a formação de calos depende da razão de auxina/citocinina no meio de cultura. Enquanto uma alta razão estimula a formação de raízes, uma baixa induz a formação de parte aérea, em níveis intermediários de ambos os reguladores, o tecido cresce como células indiferenciadas, tanto em meio sólido, quanto em líquido. Aparentemente as doses empregadas de BAP e a combinação destas com ANA, produziram níveis adequados à produção de tecidos indiferenciados nos explantes de tamarileiro.



—○— $y = 6,07 - 10,10x + 7,89x^2$ $R^2 = 0,61$ —○— $y = 0,10 + 2,87x - 2,04x^2$ $R^2 = 0,86$

Fig. 2. Comprimento de brotação (cm) (A) e número de calos (B) de tamarileiros submetidos à aplicação de BAP e BAP+ANA em diferentes doses (0, 0,25, 0,50, 0,75 e 1,00 mg L⁻¹). UFPel, Pelotas, RS.

Pouco depois da descoberta dos reguladores de crescimento, foi postulado que a auxina e citocinina agiam em conjunto, sendo que um dos possíveis pontos de interação poderia ser encontrado no próprio metabolismo de ambos os hormônios. Agindo de forma conjunta, um balanço auxina/citocinina favorável à citocinina induz a formação de gemas caulinares tanto *in vitro* quanto *ex vitro*. (PERES; KERBAUY, 2013). Neste trabalho também foi demonstrado através das variáveis números de folhas e de brotações, em que houve um ponto de máximo desenvolvimento decaindo posteriormente.

Conclusões

A adição de BAP e BAP+ANA favoreceu a formação de folhas e brotações nos explantes de tamarileiro.

Quando não houve adição de reguladores de crescimento, o comprimento médio das brotações foi maior que em tratamentos com adição de reguladores de crescimento.

A formação de calos na base dos explantes ocorreu independentemente da dosagem de reguladores utilizados.

Referências Bibliográficas

- ACOSTA-QUEZADA, P.G.; MARTÍNEZ-LABORDE, J.B.; PROHENS, J. Variation among tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.) accessions from different cultivar groups: implications for conservation of genetic resources and breeding. In: **Genetic Resources and Crop Evolution**, 58: 943-960. 2011.
- BARGHCHI, M. In vitro rejuvenation of *Cyphomandra betacea* (tamarillo). **Plant Physiology Division Biennial Report**, Department of Scientific and Industrial Research (DSIR), New Zealand, 52. 1998.
- CANHOTO, J.M.; LOPES, M.L.; CRUZ, G.S. Protocol for somatic embryogenesis: tamarillo (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.). In: Jain, S. M.; Gupta, P. K. (Eds.) **Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody plants**, Dordrecht, Springer. p. 379-389. 2005.
- CHADÓN-CERDAS, R.; MORA, D.F.; ALVARADO-MARCHENA, L.; SCHIMIDT-DURÁN, A.; ALVARADO-ULLOA, C. Cultivo *in vitro* del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.)Sendt. (Fenótipo naranja) proveniente da Costa Rica. In: **Tecnologia em Marcha**. VI Encontro de Investigación y Extencion. p. 45-55. 2014.
- CID, L.P.B. Editor Técnico. **Cultivo in vitro de plantas**. 3 ed. Brasília, DF, Embrapa, 2014, 325p.
- CORDEIRO, I.M.C.C.; LAMEIRA, O.A.; OHASHI, S.T.; ROSAL, L.F. Efeito de BAP sobre a proliferação de brotos in vitro de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (Paricá). **Cerne**, 2004.
- CORREIA, S.; LOPES, M.; CANHOTO, J. Somatic embryogenesis induction system for cloning an adult *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (tamarillo). **Trees** 25: p. 1009–1020. 2011.
- DURANT, A.A.; RODRÍGUEZ, C.; SANTANA, A.I.; HERRERO, C.; RODRÍGUEZ, J.C.; GUPTA, M.P. Analysis of Volatile Compounds from *Solanum betaceum* (Cav.) Fruits from Panama by Head-Space Micro Extraction. **Record Natural Products**, p. 15-26, 2013.
- GUIMARÃES, M.; TOMÉ, M.; CRUZ, G. *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn. (Tamarillo). In: **Biotechnology in agriculture and forestry**. Trees IV. Springer-Verlag, Berlin, p. 120-137. 1996.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, p. 473-497, 1962.
- PERES, L.E.P.; KERBAUY, G.B. Citocininas. In: KERBAUY, G.B. (Ed.) **Fisiologia Vegetal**. 2ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 213 – 234. 2013.
- REIS, D.T.N. **Ensaio de poliploidização in vitro em vários explantes de tamarillo (*Cydomandra betacea* (Cav) Sendt)**. Dissertação de mestrado. Departamento de Ciência da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade de Coimbra/Pt, 2013.
- SILVEIRA, C.A.P.; FORTES, G.R. de L.; FACHINELLO, J.C.; RODRIGUES, A.C.; CITADIN, I.; QUEZADA, A.C.; SILVA, J.B. da. Multiplicação in vitro de porta-enxertos do gênero *Prunus* sob baixas concentrações e diferentes tipos de auxinas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 2002.

TAIZ, L. ZAIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5 ed. Artmed, Porto Alegre, 2013.