

INFLUÊNCIA DE 6-BENZYLAMINOPURINA, SACAROSE E ÁGAR SOBRE A VITRIFICAÇÃO DE BROTOS DE PEREIRA *IN VITRO*¹

MOACIR PASQUAL², PATRÍCIA ANDRADE LOPES³,
EDUARDO FONSECA ARELLO⁴ e INÁCIO DE BARROS³

RESUMO - O presente trabalho objetivou estudar o efeito do BAP (6-benzilaminopurina), sacarose e ágar sobre a vitrificação de brotos de pereira (*Pyrus calleryana* L.) em cultura de tecidos. Brotos vitrificados mantidos *in vitro* através de sucessivas repicagens em meio 'MS' acrescido de BAP 1,0 mg/l foram transferidos para novo meio 'MS' suplementado de todas as combinações possíveis de BAP (0,0; 0,5; 3,0; 5,5 e 8,0 mg/l) e sacarose (0, 30, 60 e 90 g/l), e de BAP (0,0; 0,5; 3,0; 5,5 e 8,0 mg/l) e ágar (3, 6 e 9 g/l), e mantidos sob luz (3000 lux) por 16 horas diárias a 27±2°C. Brotos novos mais desenvolvidos foram formados em meio sem BAP e sem sacarose. Na ausência de sacarose não houve efeito da BAP sobre o número de novos brotos normais, enquanto que na presença de sacarose a produção de brotos normais é superior na ausência e menor dose de BAP. O maior índice de novos brotos vitrificados foi registrado nas concentrações mais elevadas de BAP. Não houve influência das concentrações de ágar sobre a formação de novos brotos vitrificados.

Termos para indexação: cultura de tecidos.

EFFECTS OF 6-BENZYLAMINOPURINE, SUCROSE AND AGAR ON *IN VITRO* VITRIFICATION OF PEAR TREE

ABSTRACT - The effects of 6-benzylaminopurine (BAP), sucrose and agar on *in vitro* vitrification of *Pyrus calleryana* L. shoots were studied. Vitrified shoots maintained by tissues culture on 'MS' medium supplemented with BAP 1.0 mg/l were transferred to test tubes containing MS medium supplemented with all of the possible combinations of BAP (0.0; 0.5; 3.0; 5.5 and 8.0 mg/l) and sucrose (0; 30; 60 and 90 g/l), and BAP (0.0; 0.5; 3.0; 5.5 and 8.0 mg/l) and agar (3; 6 and 9 g/l). They were incubated under 16 h photoperiod (3.000 lux) and at 27°C temperature. The most developed new shoots were observed in absence of BAP and sucrose. BAP in absence of sucrose did not affect the number of normal shoot production. When sucrose was present in the medium, the production of normal shoots was higher with BAP absence and lower BAP concentration. The highest frequency of shoot vitrification was registred at the highest BAP concentration. The agar concentrations did not affect the formation of vitrified shoots.

Index terms: tissues culture.

INTRODUÇÃO

Vitrificação é um termo usado para caracterizar o aspecto brilhante ou vítreo apresentado por algumas plantas obtidas *in vitro*. Esta anormalidade é resultante de problemas fisiológicos,

freqüentemente atribuídos ao uso contínuo de concentrações elevadas de citocininas no meio de cultura.

A vitrificação causa perdas significativas no processo de propagação de plantas *in vitro*, podendo atingir, segundo Novatel (1982), perdas superiores a 60%, inviabilizando um programa comercial de produção de mudas.

Estudos microscópicos (Debergh et al. 1981, Vieitez et al. 1985) revelaram que folhas vítreas apresentam epiderme inferior com estômatos proeminentes, uma camada cuticular

¹ Aceito para publicação em 27 de maio de 1991.

² Eng.-Agr., Dr., Prof.-Adjunto, ESAL, Caixa Postal 37, CEP 37200 Lavras, MG. Bolsista do CNPq.

³ No Curso de Agronomia da ESAL. Bolsista do CNPq.

⁴ Mestrando em Agronomia/Fitotecnia da ESAL.

descontínua ou ausente, um parênquima lacunar abundante, e um deficiente sistema vascular, quando comparadas com tecidos normais. Alguns estudos levados a efeito por Arnold (1982) indicaram que a vitrificação é diminuída quando se reduz o fotoperíodo aplicado às culturas.

O uso excessivo de reguladores de crescimento foi a primeira hipótese para explicar a ocorrência de vitrificação (Beauchesne 1981). Recentemente, Bornman & Vogelmann (1984) demonstraram a porção ativa do BAP influenciando a vitrificação em *Picea*. O surgimento de plantas vitrificadas e com características anormais, segundo Leshem & Sachs (1985), é devido a um desbalanço entre auxinas e citocininas. Zuccherelli (1979) recomenda uma transferência de plantas para meio isento de citocinina com o objetivo de reduzir a vitrificação.

O índice de vitrificação diminui com o aumento da concentração de ágar (Debergh et al. 1981, Debergh 1983). Bornman & Vogelmann (1984) estabeleceram que altas concentrações de ágar impedem a incorporação de BAP pela planta, confirmando citações de Debergh (1983) de que há um decréscimo na absorção de cinetina em altas concentrações de ágar.

Pasqualetto et al. (1986) observaram que a vitrificação é influenciada tanto pelo agente gelificante quanto pela concentração de BAP. Aumentando a concentração de ágar, houve uma redução na percentagem de explantes vitrificados, enquanto que a vitrificação foi maior nos níveis elevados de BAP.

A influência do K^+ , Mg^+ e agentes gelificantes (ágar e 'pelrite') sobre a vitrificação em duas cultivares de macieira foi verificada por Pasqualetto et al. (1988). Os menores níveis de K^+ produziram os maiores índices de vitrificação. O 'gelrite' (Kelco, Division of Merck & Co. Inc) produziu consistentemente mais brotos e brotos vitrificados do que o Difco Bacto ágar.

De acordo com Daguin & Letouze (1986), há uma estreita relação entre o conteúdo de N amoniacal no meio de cultura e a ocorrência de vitrificação. A vitrificação ocorre, segundo

Beauchesne (1981), com mais frequência em meios ricos, tais como o de Murashige & Skoog (1962). Há uma clara relação entre a disponibilidade de água no meio e a vitrificação (Ziv & Halevy 1983); logo, a vitrificação é maior em meio líquido do que em sólido e diminui com a redução da umidade relativa nos frascos.

Objetivou-se, com o presente trabalho, estudar o efeito do BAP, sacarose e ágar sobre a vitrificação da pereira (*Pyrus calleryana* L.) em cultura de tecidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Brotos vitrificados do porta-enxerto de pereira *Pyrus calleryana* L., mantidos *in vitro* através de sucessivas repicagens em meio 'MS' de cultura (Murashige & Skoog 1962) acrescido de BAP (6-benzilaminopurina) 1,0 mg/l, foram transferidos para novos tubos, contendo meio 'MS', formando os seguintes tratamentos:

Experimento 1: BAP nas concentrações de 0,0; 0,5; 3,0; 5,5 e 8,0 mg/l e sacarose a 0,0; 30,0; 60,0 e 90,0 g/l, em todas as combinações possíveis.

Experimento 2: BAP nas concentrações de 0,0; 0,5; 3,0; 5,5 e 8,0 mg/l e ágar a 3,0; 6,0 e 9,0 g/l, em todas as combinações possíveis.

O delineamento usado foi o inteiramente casualizado, com seis repetições de dois tubos de ensaio por parcela, contendo um broto com aproximadamente 2 cm cada. As culturas foram mantidas em temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, sob intensidade luminosa de aproximadamente 3.000 lux (lâmpadas grow-lux) por 16 horas diárias.

As avaliações, efetuadas 30 dias após a instalação dos experimentos, levaram em conta o tamanho dos brotos e o número de brotos normais e dos vitrificados. Para efeito de análise estatística, os dados foram transformados para $\sqrt{x + 0,5}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O quadrado médio, com os respectivos níveis de significância para os diversos parâmetros avaliados nos brotos vitrificados transferidos para meio de cultura, acrescido de diferentes concentrações de BAP e sacarose, é

apresentado na Tabela 1. A interação de BAP x sacarose se mostrou significativa a 1% para número de brotos normais e a 5% para número de brotos vitrificados, cujos desdobramentos são vistos na Tabela 2.

A Tabela 3 evidencia as médias para tamanho de brotos nos diferentes níveis de BAP e de sacarose, uma vez que a interação entre dois fatores não foi significativa. O melhor crescimento de brotos se deu na ausência de BAP, o que indica que este regulador de crescimento, apesar de induzir a formação de um maior número de brotos e conseqüentemente a reduzir o tamanho dos mesmos, pode estar envolvido no processo de vitrificação. Estes resultados estão de acordo com as afirmações de Bornman & Vogelmann (1984) de que a porção ativa do BAP influencia a vitrificação, e a de Pasqualetto et al. (1986), segundo a qual a vitrificação foi maior em níveis mais elevados de BAP. Raciocínio semelhante pode ser desenvolvido para a sacarose, uma vez que na sua ausência os brotos anteriormente vitrificados apresentaram o maior crescimento, embora não se tenha encontrado na literatura nenhuma alusão do efeito da sacarose sobre a vitrificação.

TABELA 1. Análise de variância para tamanho médio de brotos e número médio de brotos normais e vitrificados de pereira (*Pyrus calleryana* L.) em diferentes concentrações de BAP e sacarose.

Fontes de variação	G.L.	Quadrado médio		
		Tamanho médio de brotos	Nº médio de brotos	
			Normais	Vitrificados
BAP	4	0,3700**	1,6567**	1,607**
Sacarose	3	0,3740**	0,2217ns	1,296**
BAP x Sacarose	12	0,0990ns	0,3268**	0,471*
Resíduo	100	0,0699	0,0952	0,220
C.V. (%)		20,55	32,34	38,16

**,* = Significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente.

ns = não-significativo.

O número médio de brotos normais por explante, produzido a partir de brotos vitrificados, pode ser visto na Tabela 4. Observa-se que na ausência de sacarose todas as concentrações de BAP mostraram um comportamento similar, não diferindo do tratamento-testemunha. Por outro lado, na presença de sacarose (30, 60 ou 90 g/l), o número de brotos nor-

TABELA 2. Desdobramentos de BAP dentro de sacarose e vice-versa para número de brotos normais e vitrificados de pereira (*Pyrus calleryana* L.).

Fontes de variação	G.L.	Quadrado médio	
		Brotos normais	Brotos vitrificados
BAP: Sacarose (0,0 g/l)	4	0,1250ns	0,1677ns
BAP: Sacarose (30,0 g/l)	4	0,8103**	1,7944**
BAP: Sacarose (60,0 g/l)	4	1,1332**	0,6340ns
BAP: Sacarose (90,0 g/l)	4	0,5682**	0,4248ns
Sacarose: BAP (0,0 mg/l)	3	0,3393ns	0,1786ns
Sacarose: BAP (0,5 mg/l)	3	0,9888**	0,1725ns
Sacarose: BAP (3,0 mg/l)	3	0,1600ns	1,4589**
Sacarose: BAP (5,5 mg/l)	3	0,0409ns	0,3363ns
Sacarose: BAP (8,0 mg/l)	3	0,0000ns	1,0342*

**,* = Significativo a 1% e 5%, respectivamente.

ns = não-significativo.

TABELA 3. Tamanho médio de brotos (cm) de pereira (*Pyrus calleryana* L.) cultivados em diferentes concentrações de BAP e sacarose.

Tratamentos	Tamanho médio brotos (cm)	Tratamentos	Tamanho médio brotos (cm)
BAP-0,0mg/l	1,45 a	Sacarose - 0,0 g/l	1,42 a
BAP-0,5mg/l	1,36 ab	Sacarose - 30,0 g/l	1,34 ab
BAP-3,0mg/l	1,28 abc	Sacarose - 60,0 g/l	1,19 b
BAP-5,5mg/l	1,22 bc	Sacarose - 90,0 g/l	1,20 b
BAP-8,0mg/l	1,13 c		
DMS	0,21		0,18

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

mais nos níveis 0,0 e 0,5 mg/l de BAP foi significativamente superior aos níveis mais elevados deste regulador de crescimento. Depreende-se, deste fato, que a sacarose exerce influência positiva na produção de brotos normais, a partir de brotos vitrificados, na ausência ou com baixa dosagem de BAP. Este efeito da sacarose é inibido quando em presença de índices mais elevados de BAP, concordando com Beauchesne (1981), que afirma ser a vitrificação induzida pelo uso excessivo de reguladores de crescimento.

A produção de brotos vitrificados se apresenta de modo inverso, com valores mais expressivos nas concentrações mais elevadas de BAP, especialmente com sacarose 30 g/l (recomendado pelo meio 'MS'), como se observa na Tabela 5. Mas uma vez, pode-se deduzir o efeito prejudicial de altas doses de BAP, corroborando afirmações de Leshem & Sachs (1985) de que o surgimento de plantas vitrificadas é devido a um desbalanço entre auxinas e citocininas. Estes dados conduzem à aceitação da recomendação de Zuccherelli (1979), de que as plantas sejam transferidas para meio sem citocinina, a fim de que haja redução de índice de vitrificação.

Na Tabela 6 foram apresentados os quadra-

TABELA 4. Número médio de brotos normais de pereira (*Pyrus calleryana* L.) em diferentes concentrações de BAP e sacarose.

BAP (mg/l)	Sacarose (g/l)			
	0,0	30,0	60,0	90,0
0,0	0,9 Aa	1,3 Aa	1,3 Aa	1,4 Aa
0,5	0,7 Ab	1,5 Aa	1,6 Aa	1,2 Aa
3,0	1,1 Aa	0,7 Ba	0,7 Ba	0,8 Ba
5,5	0,8 Aa	0,7 Ba	0,7 Ba	0,9 Ba
8,0	0,7 Aa	0,7 Ba	0,7 Ba	0,7 Ba

As médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas colunas (DMS = 0,49), e minúsculas nas linhas (DMS = 0,47) não diferem entre si pelo teste Tukey 5%.

dos médios, com os respectivos níveis de significância, para os diversos parâmetros avaliados no experimento que testou combinações de BAP e ágar. A significância estatística se fez notar em BAP e apenas para número de brotos normais e vitrificados. A aplicação do teste Tukey sobre as médias pode ser observada na Tabela 7.

De modo similar ao que foi obtido no expe-

TABELA 5. Número médio de brotos vitrificados de pereira (*Pyrus calleryana* L.) em diferentes concentrações de BAP e sacarose.

BAP (mg/l)	Sacarose (g/l)			
	0,0	30,0	60,0	60,0
0,0	1,1 Aa	0,7 Ca	0,7 Aa	0,7 Aa
0,5	1,3 Aa	1,3 BCa	1,0 Aa	1,1 Aa
3,0	0,9 Ab	2,1 Aa	1,3 Ab	1,3 Ab
5,5	1,1 Aa	1,6 ABa	1,4 Aa	1,4 Aa
8,0	1,1 Ab	2,0 ABa	1,5 Aab	1,1 Ab

As médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas colunas (DMS = 0,75) e minúsculas nas linhas (DMS = 0,71) não diferem entre si pelo teste Tukey 5%.

TABELA 6. Análise de variância para tamanho médio de brotos e número médio de brotos normais e vitrificados de pereira (*Pyrus calleryana* L.) em diferentes concentrações de BAP e ágar.

Fontes de variação	G.L.	Quadrado médio		
		Tamanho médio de brotos	Nº médio de brotos	
			Normais	Vitrificados
BAP	4	0,06938ns	0,5938**	1,5975**
Ágar	2	0,08835ns	0,0709ns	0,1975ns
BAP x Ágar	8	0,07902ns	0,0861ns	0,0794ns
Resíduo	75	0,09039		
C.V. (%)		22,89	25,12	37,52

rimento anterior, na ausência e em baixas concentrações de BAP o número de brotos normais é significativamente superior às concentrações mais elevadas. A formação de brotos vitrificados demonstra um comportamento exatamente em sentido contrário, o que confirma as observações de vários autores (Zuccherelli 1979, Beauchesne 1981, Bornman & Vogelmann 1984 e Pasqualetto et al. (1986) a respeito do efeito do BAP sobre a vitrificação. Estes resultados discordam dos obtidos por Debergh et al. (1981), Debergh (1983) e Pasqualetto et al. (1986), os quais identificaram uma inibição na absorção de citocinina pela planta em altas concentrações de ágar, e, conseqüentemente, havendo uma redução nos índices de vitrificação.

CONCLUSÕES

1. Brotos vitrificados apresentam novos brotos mais desenvolvidos em meio sem BAP e sem sacarose.
2. Na ausência de sacarose, não há efeito do BAP sobre o número de brotos normais, formados a partir de brotos vitrificados.
3. Na presença de sacarose, o número de brotos normais formados de brotos vitrificados

TABELA 7. Número de brotos normais e vitrificados de pereira (*Pyrus calleryana* L.) em diferentes concentrações de BAP.

Tratamento	Número de brotos	
	Normais	Vitrificados
BAP - 0,0 mg/l	1,2 a	0,7 b
BAP - 0,5 mg/l	1,2 a	0,8 b
BAP - 3,0 mg/l	0,8 b	1,4 a
BAP - 5,5 mg/l	0,9 b	1,3 a
BAP - 8,0 mg/l	0,9 b	1,2 a
DMS	0,23	0,37

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey 5%.

é superior na ausência e na menor dosagem de BAP.

4. A produção de novos brotos vitrificados a partir de brotos vitrificados apresenta valores mais expressivos nas concentrações mais elevadas de BAP.

REFERÊNCIAS

ARNOLD, von. Factors influencing formation, development and rooting of adventitious shoots from embryos of *Picea abies* (L.) Karst. **Plant Science Letters**, v.27, p.285-287, 1982.

BEAUCHESNE, G. Les milieux minéraux utilisés en culture *in vitro* et leur incidence sur l'apparition de boutures d'aspect pathologique. **Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture**. Paris, v.67, p.1389-1397, 1981.

BORNMAN, C.E.; VOGELMANN, T.C. Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification *in vitro* in *Picea abies*. **Physiologia Plantarum**, v.61, p.505-512, 1984.

DAGUIN, F.; LETOUZE, R. Ammonium-induced vitrification in cultured tissues. **Physiologia Plantarum**, v.66, p.94-98, 1986.

DEBERGH, P.C. Effects of agar brand and concentration of the tissue culture medium. **Physiologia Plantarum**, v.59, p.270-276, 1983.

DEBERGH, P.C.; HARBAOUI, Y.; LEMEURE, R. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypothesis to overcome vitrification with special reference to water potential. **Physiologia Plantarum**, v.53, p.181-187, 1981.

LESHEM, B.; SACHS, T. Vitrified *Dianthus teratoma* *in vitro* due to growth factor imbalance. **Annals of Botany**, v.56, p.613-617, 1985.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

NOVATEL, J.C. Problèmes liés à la production de porte-greffe d'arbres fruitiers par multiplication *in vitro*. **Fruits**, v.37, p.331-336, 1982.

PASQUALETTO, P.L.; ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I. Gelling agent and growth regulator effects on shoot vitrification of 'Gala'

- apple *in vitro*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.111, n.6, p.976-980, 1986.
- PASQUALETTO, P.L.; ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I. The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.14, p.31-40, 1988.
- VIEITEZ, A.M.; BALLESTER, A.; SAN-JOSÉ, M.C.; VIEITEZ, E. Anomalous and chemical studies of vitrified shoots of chestnut regenerated *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v.65, p.177-184, 1985.
- ZIV, M.; HALEVY, A.H. Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plantlets *in vitro*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.2, p.55-65, 1983.
- ZUCCHERELLI, G. Moltiplicazione *in vitro* dei portainnesti clonali del pesco. **Frutticoltura**, v.41, p.15-20, 1979.