

FONTES DE CARBONO NA MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE PORTA-ENXERTOS DE MARMELEIRO 'MC' E 'ADAMS'

CARBON SOURCE ON *in vitro* MULTIPLICATION OF 'MC' AND 'ADAMS' QUINCE ROOTSTOCKS

MIRIAN DE FARIAS RIBEIRO¹, CRISTINA WEISER RITTERBUSCH²,
VALMOR JOÃO BIANCHI³, JOSÉ ANTONIO PETERS³

¹Doutora - UFPel - Avenida Eliseu Maciel, s/n - 96160-000 - mirianfribeiro@yahoo.com.br

²Doutoranda do curso de Fisiologia Vegetal - UFPel - Avenida Eliseu Maciel, s/n - 96160-000 - crisritterbusch@hotmail.com

³Doutor, Prof. Associado - Departamento de Botânica - Instituto de Biologia - UFPel - Avenida Eliseu Maciel, s/n - 96160-000 - valmorjb@yahoo.com, japeters@hotmail.com

RESUMO

Objetivou-se determinar a melhor fonte e concentração de carbono para a multiplicação *in vitro* de marmeleiro cultivares MC e Adams. Segmentos nodais (1,0 cm e 1-2 gemas) foram inoculados em meio MS e como fonte de carbono se utilizou sacarose, frutose ou sorbitol nas concentrações 15, 30, 45, 60 g L⁻¹ e tratamento controle. Aos 60 dias verificou-se que, para 'MC', 60 g L⁻¹ de sacarose e 30 g L⁻¹ de frutose proporcionaram 100% de explantes brotados. O maior comprimento médio das brotações (1,49 cm) foi obtido com 30 g L⁻¹ de sacarose e 60 g L⁻¹ de sorbitol. A concentração de 45 g L⁻¹ proporcionou maior número de brotações (1,76), maior massa fresca (0,058 g) e maior massa seca (0,02 g), independente da fonte de carbono. Para 'Adams' o maior número de brotações (1,47) foi obtido com sacarose e a maior massa seca das brotações (0,01 g) foi obtida com sacarose e sorbitol. Sacarose na concentração de 30 g L⁻¹ proporcionou maior comprimento médio das brotações (2,14 cm) e maior massa fresca (0,1 g) e 45 g L⁻¹ de sorbitol proporcionou 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 brotações (1,45) foi obtido com 30 g L⁻¹. Concluiu-se que 45 g L⁻¹ de sacarose para 'MC' e 30 g L⁻¹ de sacarose para 'Adams' foram as melhores para concentrações multiplicação *in vitro*.

Termos para indexação: *Cydonia oblonga*, micropropagação, sacarose, frutose, sorbitol.

ABSTRACT

The objective was to determine the best carbon source and concentration for *in vitro* multiplication of quince MC and Adams cultivars. Nodal segments (1.0 cm and 1-2 buds) were inoculated in MS and as a carbon source, sucrose, fructose or sorbitol were used with the following concentrations: 0, 15, 30, 45 and 60 g L⁻¹. After 60 days, it was observed that, for 'MC', 60 g L⁻¹ sucrose and 30 g L⁻¹ fructose yielded 100% sprouted explants. The highest shoot length average (1.49 cm) was obtained with 30 g L⁻¹ sucrose and 60 g L⁻¹ sorbitol. The concentration of 45 g L⁻¹ provided the highest number of shoots (1.76), higher fresh mass (0.058 g) and

higher dry matter (0.02 g), regardless of the carbon source. For 'Adams', the highest number of shoots (1.47) was obtained with sucrose and the higher dry mass of shoots (0.01 g) was obtained with sucrose and sorbitol. The sucrose concentration of 30 g L⁻¹ provided the highest shoot length average (2.14 cm) and higher fresh weight (0.1 g) and 45 g L⁻¹ sorbitol provided greater dry mass of shoots (0.03 g). The highest percentage of sprouted explants was obtained at a concentration of 30 g L⁻¹ (79.58%) and sucrose as carbon source (71.25%). The highest average number of shoots (1.45) was obtained with 30 g L⁻¹. It was concluded that 45 g L⁻¹ sucrose for 'MC' and 30 g L⁻¹ sucrose for 'Adams' were the best concentrations for *in vitro* multiplication.

Index terms: *Cydonia oblonga*, micropropagation, sucrose, fructose, sorbitol.

INTRODUÇÃO

O marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.), pertence à família Rosaceae e vem sendo utilizado com bastante sucesso como porta-enxerto para pereira em países da Europa, e mais recentemente no Brasil, devido a fundamental característica agrônômica de induzir à cultivar copa menor crescimento, permitindo o adensamento de plantas no campo, o que eleva a produtividade do pomar e, conseqüentemente, a maior retorno econômico ao produtor (DALL'ORTO et al., 2007). Dentre os métodos de propagação desta espécie se utiliza o cultivo *in vitro*, sendo que alguns trabalhos que visam o estabelecimento, multiplicação, enraizamento e regeneração *in vitro* têm sido desenvolvidos no Brasil (ERIG & SCHUCH, 2005; SILVA et al., 2011).

O crescimento e a multiplicação *in vitro* de brotos de diferentes espécies são afetados por muitos fatores,

(Recebido em 1 de Junho de 2015 e aprovado em 16 de Setembro de 2015)

podendo-se destacar a formulação e a consistência do meio, reguladores de crescimento e suas concentrações, tipo e concentração das fontes de carbono, número de subcultivos, bem como o tipo de explante utilizado (AHMAD et al., 2007; ZHANG et al., 2012). Quanto ao meio de cultivo, o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) tem sido o mais utilizado para diversas espécies, bem como diluições deste meio ou mesmo outras formulações contendo menores concentrações de sais, conforme observado por Couto et al. (2004) e Staniene & Stanys (2004).

A concentração e tipo de fonte de carbono adicionada ao meio de cultura pode melhorar significativamente o desempenho do cultivo, devido seus efeitos sobre o aporte de energia para o explante e também para manter o potencial osmótico do meio (HAQUE et al., 2003; DE NETO & OTONI, 2003). Entretanto, pouco se conhece sobre a influência de fontes de carbono no crescimento e a multiplicação *in vitro* de marmeleiro.

Em geral, a sacarose é a fonte de carbono utilizada na cultura *in vitro*, porque é o carboidrato predominante na seiva do floema da grande maioria das plantas (KÜHN & GROF, 2010). Porém, o sorbitol é o principal açúcar sintetizado nas folhas e 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 se verificasse ser uma boa fonte de carbono para a cultura de cerejeira doce (BORKOWSKA & SZCZERBA, 1991).

A influência de diferentes fontes e concentrações de carboidratos tem sido estudada em várias espécies de Rosáceas (BORKOWSKA & SZCZERBA, 1991; AHMAD et al., 2007), porém as respostas parecem depender, dentre outros fatores, do estágio da cultura e do genótipo. Considerando que os requerimentos em carboidratos devem ser definidos e otimizados para cada sistema de micropropagação, objetivou-se estudar os efeitos da concentração e fonte de carbono na multiplicação *in vitro* dos marmeleiros 'MC' e 'Adams'.

MATERIAL E MÉTODOS

Segmentos nodais com aproximadamente 1,0 cm e 1-2 gemas foram utilizados como explantes e inoculados em meio MS, suplementado com mio-inositol (100 mg L⁻¹) e 0,3 mg L⁻¹ de 6- benzilaminopurina (BAP). Como fonte de carbono se utilizou sacarose, frutose ou sorbitol nas concentrações 15, 30, 45, 60 g L⁻¹ e tratamento controle (sem adição de carbono).

O pH do meio foi ajustado para 5,65 e após autoclavado a 121°C (1,5 atm) durante 20 minutos. Os explantes foram inoculados em frascos de 300 mL, contendo 30 mL de meio de cultura, e mantidos em sala de crescimento convencional (temperatura de 25±2°C; 16 horas de luz, com intensidade de 48 μmol m⁻² s⁻¹, 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, foi avaliada para cada cultivar a percentagem de explantes brotados, o número médio de brotações por explante, o comprimento médio das brotações (cm), a massa fresca e massa seca média das brotações (g), sendo esta obtida a partir da secagem das brotações de cada explante em estufa de circulação forçada a 50°C durante três dias, até obter massa constante.

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 explantes brotados foram transformados para $\arcsen(x/100)^{1/2}$ e da variável número médio de brotações foram transformados para $(x + 0,5)^{1/2}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base na análise de variância dos dados obtidos com a cultivar MC, observou-se interação entre os fatores para

as variáveis percentagem de explantes brotados e comprimento médio das brotações (Figuras 1A e 1B, respectivamente). Pela estimativa com a equação de regressão observou-se que a concentração de 43,78 g L⁻¹ de sacarose e 38,06 g L⁻¹ de frutose proporcionaram 100% de explantes brotados (Figura 1A). Entretanto, com 30 g L⁻¹ de frutose também se obteve percentagem máxima de explantes brotados.

Para comprimento médio das brotações foi possível estimar pela equação de regressão que a utilização de 35,22 g L⁻¹ de sacarose e 45,28 g L⁻¹ de sorbitol proporcionaram maiores comprimento dos explantes (1,48 e 1,52 cm, respectivamente). Embora as concentrações de sacarose tenham proporcionado uma resposta quadrática para o comprimento médio das brotações, verificou-se que com 30 g L⁻¹ de sacarose foi possível obter comprimento médio de brotações similar (1,47 cm) ao valor estimado com 35,22 g L⁻¹ de sacarose (Figura 1B).

Na Figura 1A é possível observar que aumentos na concentração de sorbitol, a partir de 30 g L⁻¹, implicou na diminuição da capacidade de brotação dos explantes e redução em valores percentuais, comparado às demais fontes de carbono. Mesmo assim, aqueles brotos formados no meio contendo esta fonte de carbono apresentaram comprimento médio das suas brotações, variando de 1,05 a 1,49 cm, sendo superior aos valores obtidos nas demais fontes de carbono, a partir da referida concentração.

Na Figura 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.

Verificou-se efeito significativo e independente do fator concentração de carbono para as variáveis número médio de brotações por explante, massa fresca e massa seca das brotações (Figuras 1C, 1E e 1G). Para o fator fonte de carbono o efeito foi independente para as variáveis número médio de brotações por explante e massa seca das brotações (Figuras 1D e 1F).

Para a variável número médio de brotações foi possível estimar pela equação de regressão que a

concentração de 38,30 g L⁻¹ das fontes de carbono foi mais efetiva quando comparada com as demais concentrações (1,76 brotos explante⁻¹) (Figura 1C). A concentração de 45 g L⁻¹ das fontes de carbono proporcionou maior massa fresca (0,058 g) (Figura 3E) e maior massa seca das brotações (0,02 g) (Figuras 1G e 1E, respectivamente). Para esta última variável, observou-se que 45 g L⁻¹ proporcionou uma resposta 50% superior a concentração de 30 e 60 g L⁻¹. Quando comparada com 15 g L⁻¹, esta diferença aumentou para 65%. Com relação ao tipo de fonte de carbono, o maior número de brotações foi obtido na presença de sacarose (1,47) (Figura 1D). Embora não tenha diferido da fonte sorbitol, os resultados obtidos com sacarose evidenciaram uma superioridade de 27% e 35% em relação ao sorbitol e à frutose (respectivamente). A maior massa seca (0,01 g) foi obtida com sacarose e sorbitol (Figura 1F), sendo estas 50% superiores à frutose.

Para a cultivar Adams, observou-se interação entre fatores para as variáveis comprimento médio das brotações (Figura 3A), massa fresca (Figura 3B) e massa seca média das brotações (Figura 3C). Com 30 g L⁻¹ de sacarose se obteve maior comprimento médio das brotações (2,14 cm) e maior massa fresca média (0,1 g), enquanto que 45 g L⁻¹ sorbitol proporcionou maior massa seca média das brotações (0,03 g), sendo cerca de 73% superior, em relação a mesma concentração de sacarose e frutose.

Para a variável percentagem de explantes brotados verificou-se efeito significativo, porém independentes para os fatores fonte e concentração de carbono (Figuras 3D e 3E). Pela estimativa com a equação de regressão, a maior percentagem de explantes brotados foi obtida na concentração de 35,27 g L⁻¹ (86,33%) (Figuras 3D) e com a sacarose como fonte de carbono (71,25%) (Figuras 3E). 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 brotações verificou-se efeito apenas da concentração de carbono. O maior número médio de brotações (1,53 brotos explante⁻¹), estimado pela equação de regressão, foi obtido na concentração de 36,75 g L⁻¹ (Figura 3F).

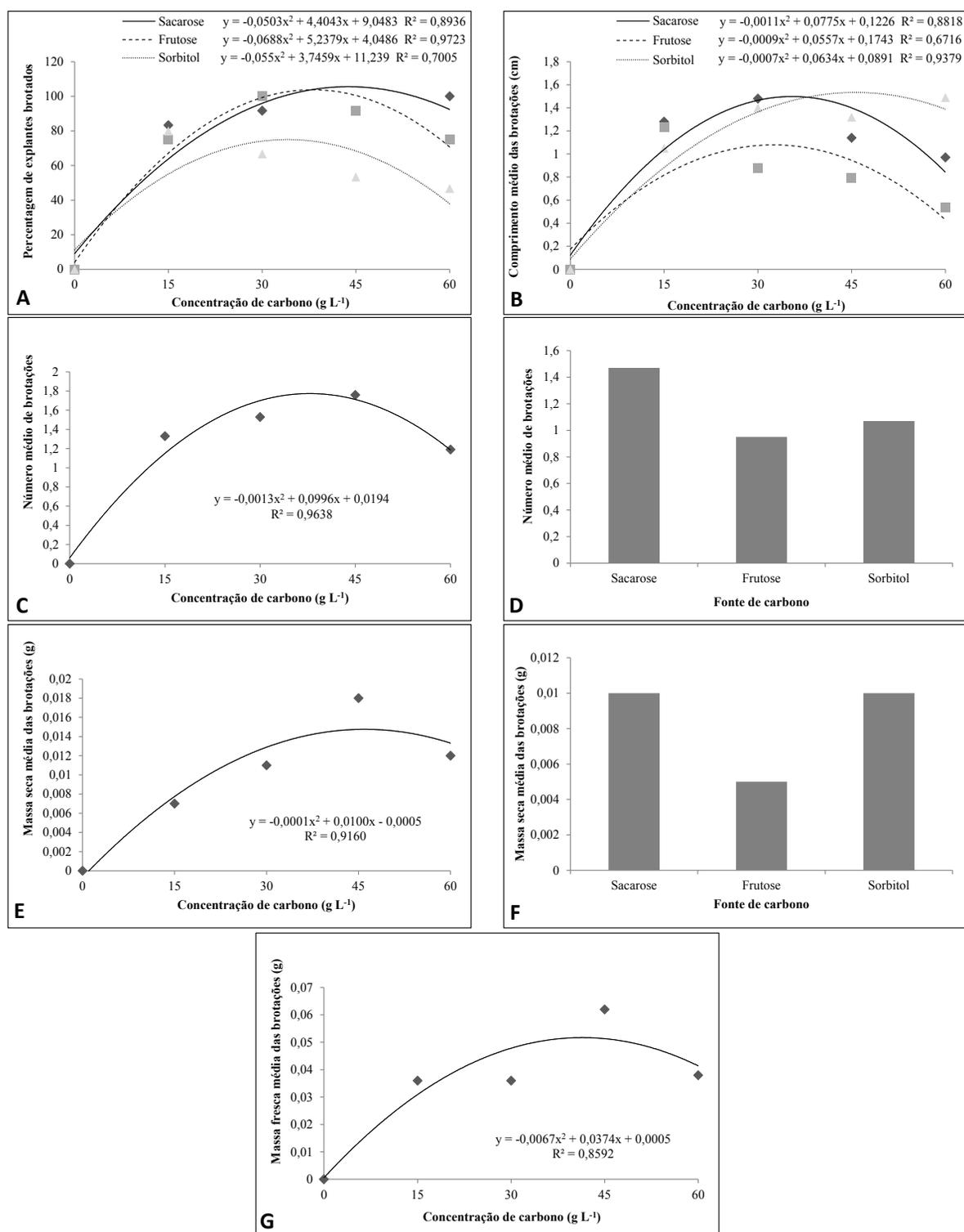


FIGURA 1 – Percentagem de explantes brotados (A), comprimento médio das brotações (cm) (B), número médio de brotações (C e D), massa seca (g) (E e F) e massa fresca média das brotações (g) (G) de marmeleiro ‘MC’ cultivado por 60 dias em meio de cultura com diferentes fontes e concentrações de carbono.

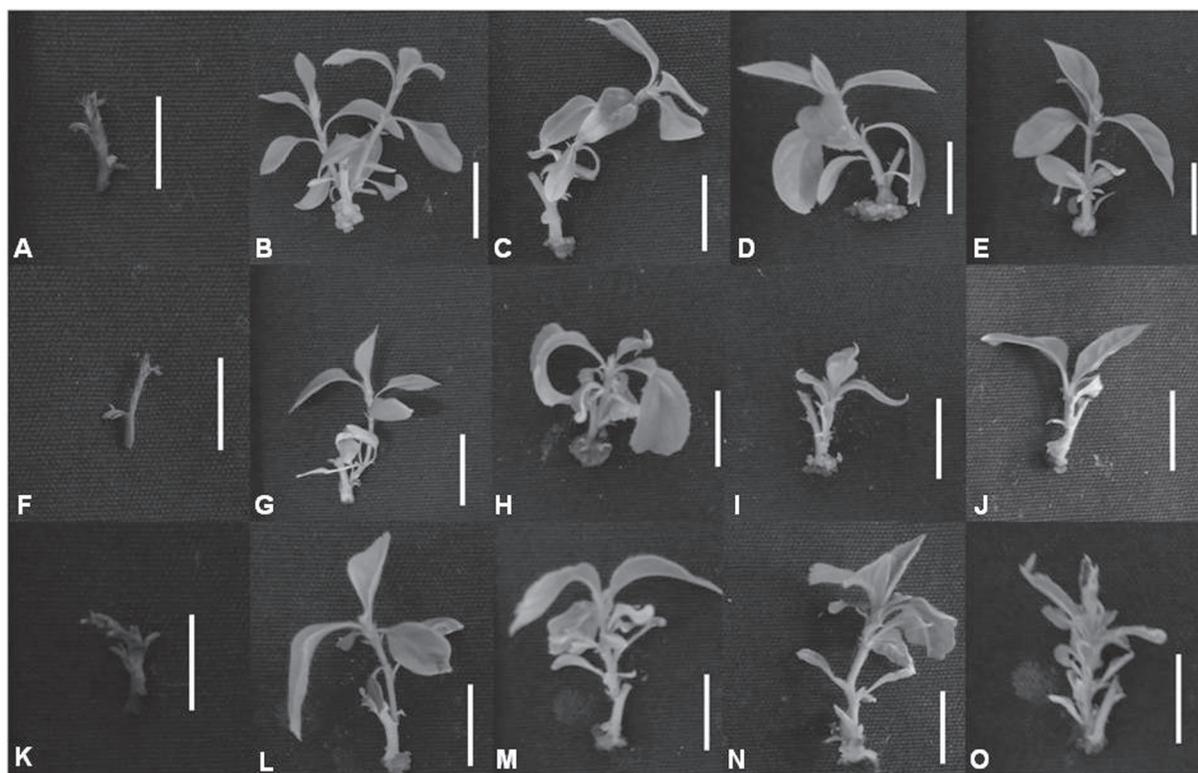


FIGURA 2 – Explantes de marmeleiro ‘MC’ cultivado por 60 dias em meio de cultura com diferentes fontes e concentrações de carbono. (A) Controle; (B) 15 g L⁻¹ sacarose; (C) 30 g L⁻¹ sacarose; (D) 45 g L⁻¹ sacarose; (E) 60 g L⁻¹ sacarose; (F) Controle; (G) 15 g L⁻¹ frutose; (H) 30 g L⁻¹ frutose; (I) 45 g L⁻¹ frutose; (J) 60 g L⁻¹ frutose; (K) Controle; (L) 15 g L⁻¹ sorbitol; (M) 30 g L⁻¹ sorbitol; (N) 45 g L⁻¹ sorbitol; (O) 60 g L⁻¹ sorbitol. Barra = 1 cm.

Na Figura 4 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.

Na maioria das espécies vegetais a sacarose é o principal carboidrato translocado dos tecidos fonte para os drenos (KÜHN e GROF, 2010), porém em Rosaceae (*Prunus*, *Malus*, *Pyrus* e *Cydonia*), o sorbitol é o principal carboidrato sintetizado em folhas maduras e translocado para os drenos. Em macieira (*Malus domestica*), 70% do carbono translocado no floema é na forma de sorbitol (KLAGES et al., 2001), e juntamente com outros polióis, também são propostos para funcionar como carboidratos de armazenamento.

Nas espécies da família Rosaceae, embora o sorbitol seja o principal açúcar transportado via floema (AHMAD et al., 2007), tais espécies apresentam capacidade muito variável de

armazenamento desse açúcar. Wallaart (1980) verificou que em folhas de duas amostras de marmeleiro continham 0,7 e 0,1% de sorbitol, 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.

O sucesso na multiplicação *in vitro* em meio contendo sorbitol pode estar associado à espécie, bem como a suficiente atividade das enzimas sorbitol desidrogenase e sorbitol oxidase responsáveis pelo metabolismo deste poliól (LEMOIS; BAKER, 1998). Os resultados do presente estudo levam a sugerir que o marmeleiro apresenta baixa atividade das enzimas responsáveis pelo metabolismo do sorbitol, enquanto que as enzimas responsáveis pela hidrólise da sacarose teriam maior atividade, justificando os melhores resultados obtidos com o uso da sacarose, em que o número

de brotos da cultivar MC foi 27% superior com sacarose comparado ao sorbitol. Por sua vez, na cultivar Adams a percentagem de explantes brotados com sacarose adicionada ao meio de cultivo foi 38% superior comparado ao sorbitol.

Com relação a frutose, a preferência desta fonte de carbono em relação às demais por algumas

espécies e tecidos, como o que foi observado na multiplicação de cerejeira por Borkowska e Szczerba (1991), 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).

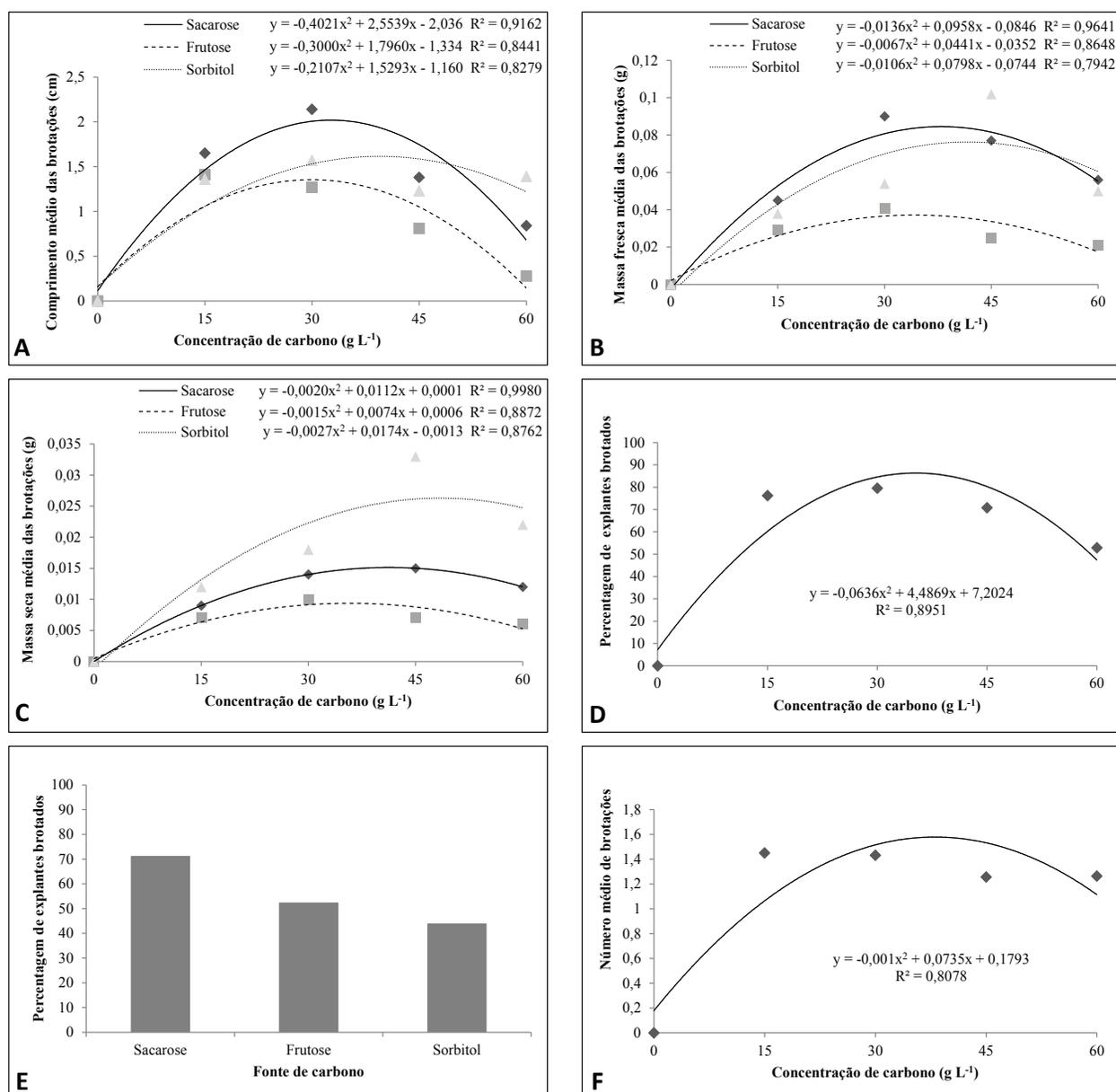


FIGURA 3 – Comprimento médio das brotações (cm) (A), massa fresca (g) (B), massa seca média das brotações (g) (C), percentagem de explantes brotados (D e E) e número médio de brotações (F) de marmeleiro ‘Adams’ cultivado por 60 dias em meio de cultura com diferentes fontes e concentrações de carbono.

Neste trabalho 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) e como visto anteriormente, o acúmulo de sorbitol em folhas de marmeleiro é muito baixo em relação as outras espécies da família Rosaceae, chegando a armazenar 92% a menos do que armazena a pereira, utilizando assim a sacarose como melhor fonte de carbono.

A cultivar MC apresentou melhores resultados quando se adicionou a concentração de 45 g L⁻¹ 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⁻¹ e quando comparada com a concentração de 15 g L⁻¹, esta diferença aumentou para 65%. A concentração de 45 g L⁻¹ é maior do que aquela normalmente utilizada (30 g L⁻¹) no cultivo *in vitro*, e que, sustenta o desenvolvimento de brotações para a grande maioria das espécies já estabelecidas *in vitro* (AHMAD et al., 2007, ZHANG et al., 2012). A concentração ótima das diferentes fontes de carbono para multiplicação *in vitro* de cerejeira foi encontrada por Borkowska e Szczerba (1991) como sendo de 20 a 30 g L⁻¹. Em comparação com os outros componentes do meio, esta é uma concentração relativamente elevada, o que realça a necessidade de uma melhor compreensão da economia de utilização de carboidratos pela cultura de tecidos.

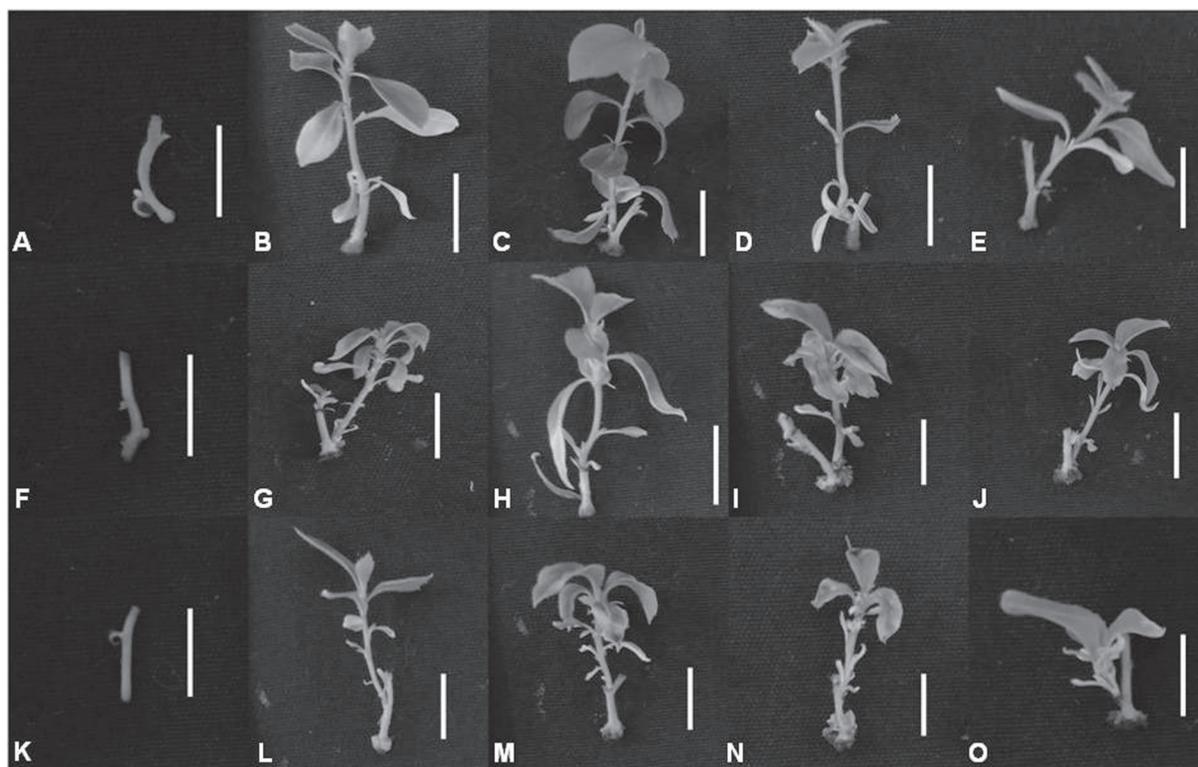


FIGURA 4 – Explantes de marmeleiro ‘Adams’ cultivado por 60 dias em meio de cultura com diferentes fontes e concentrações de carbono. (A) Controle; (B) 15 g L⁻¹ sacarose; (C) 30 g L⁻¹ sacarose; (D) 45 g L⁻¹ sacarose; (E) 60 g L⁻¹ sacarose; (F) Controle; (G) 15 g L⁻¹ frutose; (H) 30 g L⁻¹ frutose; (I) 45 g L⁻¹ frutose; (J) 60 g L⁻¹ frutose; (K) Controle; (L) 15 g L⁻¹ sorbitol; (M) 30 g L⁻¹ sorbitol; (N) 45 g L⁻¹ sorbitol; (O) 60 g L⁻¹ sorbitol. Barra = 1 cm.

CONCLUSÃO

Sacarose na concentração de 45 g L⁻¹ para cultivar MC e 30 g L⁻¹ para cultivar Adams são as melhores concentrações e fonte de carbono para multiplicação *in vitro* destas cultivares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, T. et al. Comparison of sucrose and sorbitol as main carbon energy sources in micropropagation of peach rootstock GF-677. **Pakistan Journal of Botany**, 39(4):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**, 42(240)911-915, 1991.
- COUTO, M.; OLIVEIRA, R. P.; FORTES, G. R. L. Multiplicação *in vitro* dos porta-enxertos de *prunus sp.* Barrier e Cadaman. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 26(1):5-7, 2004.
- DALL'ORTO, F. A. C.; OJIMA, M.; PIO, R.; CHAGAS, E. A. Avaliação da capacidade reprodutiva de algumas cultivares de marmeleiros visando a obtenção de porta-enxertos. **Ciência e Agrotecnologia**, 31(2):274-278, 2008.
- DE NETO, V. B. P.; OTONI, W. C. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? **Scientia Horticulturae**, 97:193-202, 2003.
- 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**, 11(4):419-424, 2005.
- HAQUE, M. S.; WADA, T.; HATTORI, K. Effects of sucrose, mannitol and KH₂PO₄ on root tip derived shoots and subsequent bulblet formation in garlic. **Asian Journal of Plant Science**, 2(12):903-908, 2003.
- HEW, C. X.; MAH, T. C. Sugar uptake and invertase activity in *Dendrobium* tissues. **New Phytologist**, 111(2):167-171, 1989.
- KLAGES, K. et al. Diurnal changes in non-structural carbohydrates in leaves, phloem exudate and fruit in 'Braeburn' apple. **Australian Journal of Plant Physiology**, 28:131-139, 2001.
- KÜHN, C.; GROF, C. P. L. Sucrose transporters of higher plants. **Current Opinion in Plant Biology**, 13(3):287-297, 2010.
- LEMOS, E. E. P.; BAKER, D. Shoot regeneration in response to carbon source on internodal explants of *Annona muricata* L. **Plant Growth Regulation**, 25:105-112, 1998.
- MACHADO, A. A.; CONCEIÇÃO, A. R. Sistema de análise estatística para Windows. **Winstat**, Versão 2.0. UFPel, 2003.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15:473-497, 1962.
- 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**, 62:1545-1549, 1984.
- SILVA, I. M. de C. da et al. Resposta diferencial ao uso do thidiazuron na regeneração *in vitro* de marmeleiros, cvs. Adams e MC. **Revista Brasileira de Agrociência**, 17(3-4):375-382, 2011.
- STANIENE, G.; STANYS, V. Plant regeneration from leaves of *Cydonia oblonga* cultivars. **Acta Universitatis Latviensis ser. Biology**, 676:231-233, 2004.
- WALLAART, R. A. M. Distribution of sorbitol in Rosaceae. **Phytochemistry**, 19:2603-2610, 1980.
- ZHANG, J. et al. Effects of sucrose concentration and exogenous hormones on growth and periplocin accumulation in adventitious roots of *Periploca sepium* Bunge. **Acta Physiologiae Plantarum**, 34(4):1345-1351, 2012.