

Artigo original

CONCENTRAÇÕES DE CITOCININA INFLUENCIAM A MULTIPLICAÇÃO IN VITRO DE KIWIZEIRO

Arruda AL*

Universidade do Estado de Santa Catarina
<https://orcid.org/0000-0001-9791-4850>

Buss M†

Universidade do Estado de Santa Catarina
<https://orcid.org/0000-0003-1271-9306>

Nerbass FR‡

Universidade do Estado de Santa Catarina
<https://orcid.org/0000-0002-6545-8771>

Rufato L§

Universidade do Estado de Santa Catarina
<https://orcid.org/0000-0001-9545-7035>

Resumo: O cultivo in vitro de kiwizeiro em sistema dupla-fase aparece como alternativa para melhoria da taxa de multiplicação da espécie. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) na multiplicação in vitro de kiwizeiro em sistema dupla-fase. O experimento foi realizado no Laboratório de Micropropagação Vegetal pertencente à Universidade do Estado de Santa Catarina – Centro de Ciências Agroveterinárias (UDESC/CAV), em Lages. Os tratamentos consistiram

* Doutoranda no Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal da Universidade do Estado de Santa Catarina; Engenheira Agrônoma; Rua Tito Espindola, 8, apartamento 10, Conta Dinheiro, 88520-080, Lages, Santa Catarina; analuiza1arruda@hotmail.com

† Graduanda no Curso de Agronomia da Universidade do Estado de Santa Catarina; marceli.buss@hotmail.com

‡ Professora substituta de Fruticultura na Universidade do Estado de Santa Catarina; Engenheira Agrônoma; fnerbass@hotmail.com

§ Doutor em Fruticultura de Clima Temperado pela Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel; Mestre em Fruticultura de Clima Temperado pela Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel; Professor de Fruticultura na Universidade do Estado de Santa Catarina; Engenheiro Agrônomo; leoruffato@yahoo.com.br

na adição de três concentrações de BAP (0,0; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) ao meio de cultura MS em sistema dupla-fase. As variáveis analisadas aos 30 dias de cultivo dos explantes in vitro foram: número de brotações, comprimento médio de brotações, número de folhas e comprimento médio de folhas. A análise de variância foi significativa para a regressão linear e foi possível observar um crescimento nas médias de todas as variáveis analisadas, à medida que se aumentaram as concentrações de BAP no meio de cultivo. Dessa forma, conclui-se que para a multiplicação in vitro de kiwizeiro em sistema dupla-fase a concentração de BAP a ser utilizada é 2 mg L⁻¹.

Palavras-chave: Micropropagação. Meio de cultura. Citocinina.

Concentration of cytokinin influence the in vitro multiplication of kiwifruit

Abstract: *The in vitro cultivation of kiwifruit in double-phase system appears as an alternative for improving the rate of multiplication of the species. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of different concentrations of BAP in the in vitro multiplication of kiwifruit in double-phase system. The experiment was carried out in the Laboratory of Plant Micropropagation belonging to the University of the state of Santa Catarina - Centro de Ciências Agroveterinárias (UDESC/CAV), in Lages. The treatments consisted of adding three concentrations of BAP (0,0; 1,0 and 2,0 mg L⁻¹) to the MS culture medium in a double-phase system. The variables analyzed after 30 days of cultivation of the in vitro explants were: number of shoots, average length of shoots, number of leaves and average length of leaves. The analysis of variance was significant for the linear regression and it was possible to observe a growth in the means of all variables analyzed as the BAP concentrations in the culture medium were increased. Thus, for in vitro multiplication of kiwifruit in a double-phase system the concentration of BAP to be used is 2 mg L⁻¹.*

Keywords: Micropropagation. Culture medium. Cytokinin.

Recebido em 6 de novembro de 2018

Aceito em 15 de maio de 2019

1 INTRODUÇÃO

O kiwizeiro (*Actinia deliciosa*) é uma cultura comercial na Nova Zelândia e em outros países como Chile, China e Itália.^{1,2} Foi introduzido no Brasil na década de 1970 e, desde então, vem ganhando destaque no cenário nacional.

Embora tenha sido observado um aumento constante na produção do fruto, verifica-se que a maior parte do kiwizeiro consumido é proveniente de importações, o que garante ao cultivo um bom potencial de mercado a ser explorado.³ Em razão das condições climáticas, o Estado do Rio Grande do Sul caracteriza-se por ser o principal produtor de kiwi do Brasil, concentrando metade da quantidade de frutos produzidos no País.⁴

Os frutos de kiwi têm propriedades terapêuticas, elevado conteúdo de vitamina C e de elementos minerais quando comparados a outras frutas, como a maçã e o limão, podendo ser consumidos in natura, processados ou congelados, sendo que dessa última maneira podem ser conservados por longos períodos.⁵

Os métodos convencionais para a propagação da espécie (estaquia e enxertia) foram complementados por técnicas de cultivo in vitro em diversos países.⁶ Na micropropagação, as plantas são cultivadas em meios nutritivos adequados e sob condições controladas de temperatura, luminosidade e fotoperíodo. Essa técnica, que viabiliza a produção de um elevado número de mudas idênticas à planta matriz e com qualidade fitossanitária evidência, portanto, uma grande vantagem comparativa sobre a propagação vegetativa tradicional.⁷

A composição do meio de cultura e os fatores ambientais podem resultar na intensificação das respostas morfogênicas, assim como aumentar o número de explantes responsivos.⁸ O sistema de cultivo dupla-fase (meio semissólido e líquido juntos) surge como uma alternativa para a melhoria nas taxas de multiplicação, crescimento das brotações e redução da hiperidricidade, e também é verificado em estudos realizados com o gênero *Pyrus*.⁹

Além do meio de cultura, a avaliação sobre qual regulador de crescimento é o mais eficiente para a multiplicação in vitro de cada espécie é fundamental, e isso ocorre porque os reguladores estão associados às respostas morfogenéticas das plantas.¹⁰

O uso de BAP (6-benzilaminopurina) tem revelado eficiência no processo de multiplicação, com bons resultados na proliferação de brotações de kiwizeiro.¹¹ Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a multiplicação in vitro de kiwizeiro sob diferentes concentrações de BAP.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Micropropagação de Plantas (LMV) pertencente à Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC/CAV), na Cidade de Lages.

Para avaliar o efeito da suplementação do meio de cultura com diferentes concentrações da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP), foram utilizados segmentos nodais de kiwizeiro provenientes de sementes germinadas *in vitro*.

O estudo de multiplicação de brotações foi realizado em sistema dupla-fase (líquido-geleificado), em que os segmentos nodais foram inoculados em frascos de vidro com capacidade para 250 mL, contendo 30 mL dos sais e vitaminas do meio de cultura MS¹² com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol e 6 g L⁻¹ de ágar, cultivados por 10 dias. Após esse período de cultivo em meio sólido, receberam a adição de 10 mL de meio de cultura MS líquido (sem a presença do agente geleificante) com 0,1 g L⁻¹ de Fe EDDHA como fonte de ferro, e suplementado de acordo com as distintas concentrações de BAP (0,0; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹).

O experimento foi instalado em sala de crescimento, onde foi exposto a um fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±2 °C e intensidade luminosa de 42 μmol m⁻²s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas, durante 30 dias.

Foram realizadas avaliações aos 30 dias após o cultivo *in vitro* por meio da contagem do número de brotações e do número de folhas e medição, com auxílio de uma régua, do comprimento médio de brotações (cm) e do comprimento médio de folhas (cm).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com três tratamentos e quatro repetições contendo três explantes cada. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância com a aplicação do teste F, e as médias, quando significativas, efetuada a análise de regressão com auxílio do programa estatístico Sisvar versão 5.6.

3 RESULTADOS

Observa-se, na Tabela 1, que a análise de regressão linear foi significativa, ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F, para as variáveis número de brotações,

comprimento médio de brotações (cm), número de folhas e comprimento médio de folhas (cm), em que foram verificados os respectivos valores de quadrado médio e erro: 34,75 e 2,08; 0,22 e 0,049; 1622,33 e 59,66; e 0,93 e 0,08.

Tabela 1 – Resumo da análise de variância (ANOVA) para as variáveis número de brotações, comprimento médio de brotações (cm), número de folhas e comprimento médio de folhas de kiwizeiro multiplicado in vitro em razão das concentrações da citocinina BAP adicionadas ao meio de cultura MS em sistema dupla-fase

Fonte de variação	GL	Quadrado médio			
		Número de brotações	Comprimento médio de brotações (cm)	Número de folhas	Comprimento médio de folhas (cm)
Regressão linear	2	34,75*	0,22*	1622,33*	0,93*
Erro	9	2,08	0,049	59,66	0,08
CV (%)		13,43	12,85	12,43	11,77

Nota: *Teste F significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro.

As maiores médias para as variáveis número de brotações (4,4) e maior comprimento médio de brotações (1,93 cm) de kiwizeiro foram verificadas com a utilização da concentração mais elevada da citocinina BAP (2,0 mg L⁻¹) (Figura 1).

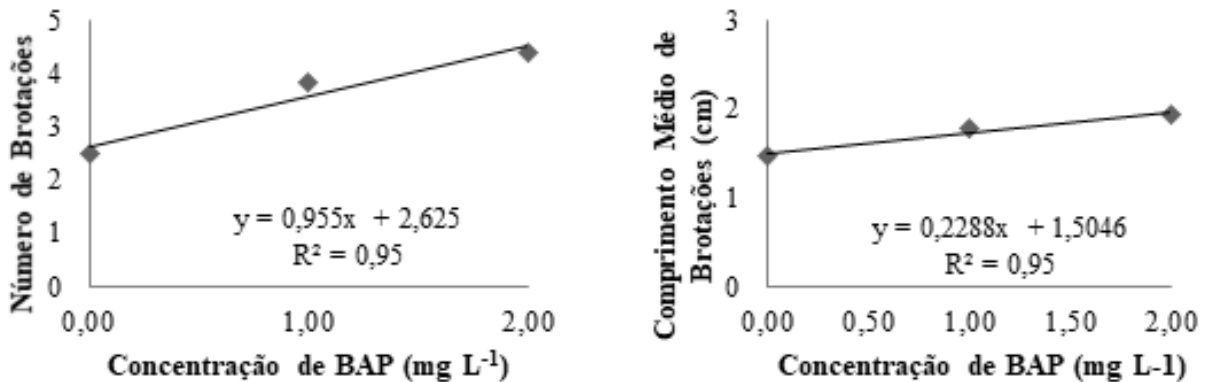


Figura 1 – Número de brotações e comprimento médio de brotações (cm) de explantes de kiwizeiro multiplicados in vitro em razão de diferentes concentrações de BAP adicionadas ao meio de cultura MS em sistema dupla-fase.

À medida que se aumentaram as concentrações de BAP no meio de cultivo, houve aumento no número de brotações e no comprimento médio de brotações (0,0 mg L⁻¹: 2,5 brotações e 1,47 cm; 1,0 mg L⁻¹: 3,8 brotações e 1,79 cm; 2,0 mg L⁻¹: 4,4 brotações e 1,93 cm) (Figura 2).

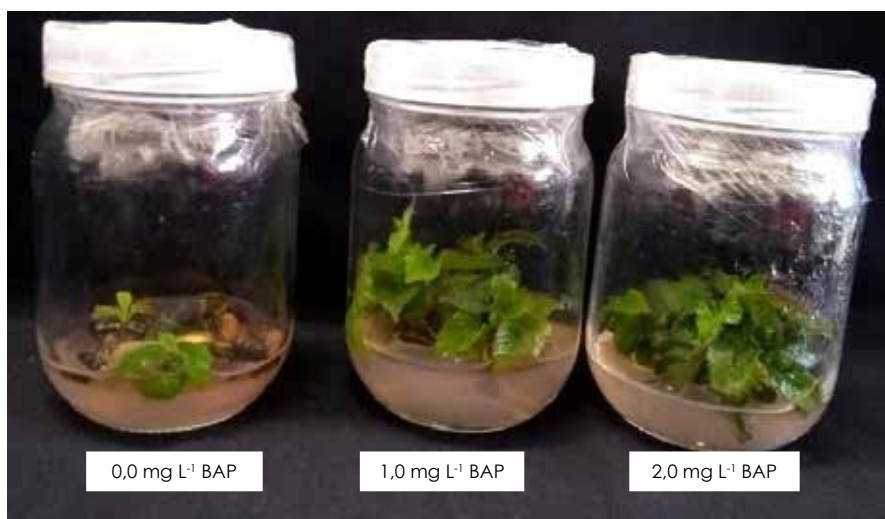


Figura 2 – Explantes de kiwizeiro cultivados in vitro em sistema dupla-fase com diferentes concentrações de BAP.

Para as duas variáveis demonstradas na Figura 3, número de folhas e comprimento médio de folhas, constata-se um comportamento de regressão linear semelhante ao observado nas variáveis número de brotações e comprimento médio de brotações, em que a concentração de 2,0 mg L⁻¹ de BAP proporcionou médias superiores em relação às demais avaliadas, com 8,6 folhas e comprimento médio de folha de 2,8 cm.

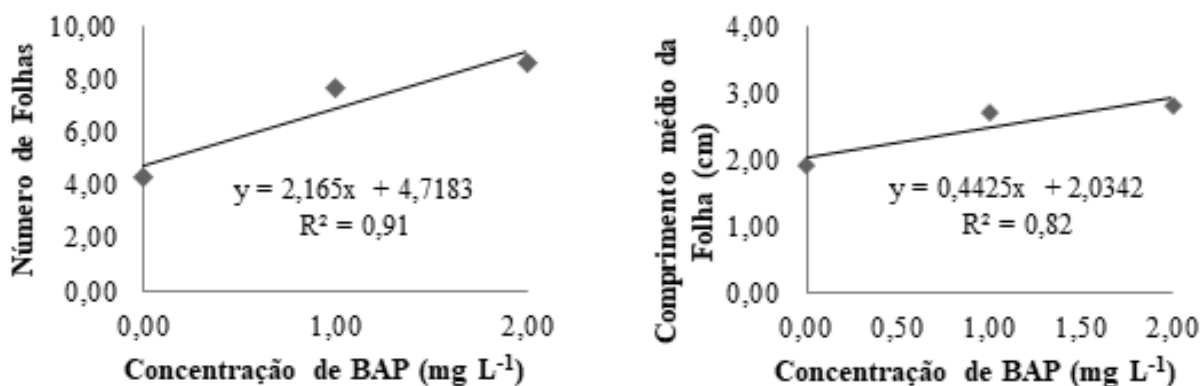


Figura 3 – Número de folhas e comprimento médio de folhas (cm) de explantes de kiwizeiro cultivados in vitro em sistema dupla-fase com distintas concentrações de BAP.

O comprimento das folhas em relação à adição das distintas concentrações de BAP pode ser visualizado por meio da Figura 4, em que se pode observar que o aumento

das concentrações de BAP no meio de cultivo proporcionaram um maior comprimento médio de folhas (0,0 mg L⁻¹: 1,9 cm; 1,0 mg L⁻¹: 2,7 cm; 2,0 mg L⁻¹: 2,8 cm).

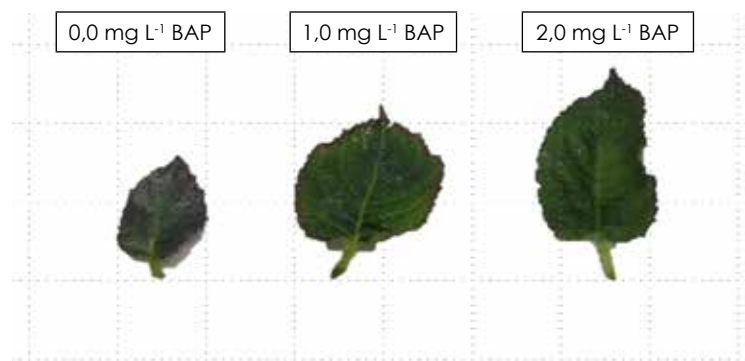


Figura 4 – Comprimento de folhas de explantes (cm) de kiwizeiro multiplicados *in vitro* em sistema dupla-fase com diferentes concentrações de BAP.

4 DISCUSSÃO

A 6-benzilaminopurina (BAP) é uma citocinina sintética utilizada na multiplicação *in vitro* de diversas espécies,¹³ inclusive do kiwizeiro.¹¹ O BAP é adicionado ao meio de cultura para melhorar a micropropagação, com aumento no número de gemas, folhas e brotos, e para induzir um incremento na produção de massa fresca e qualidade das plantas cultivadas.¹⁴

Os resultados encontrados neste estudo estão de acordo com Moncaleon, Cañal, Feito, Rodriguez e Fernandez,¹⁵ os quais relataram que os níveis de citocininas endógenas são insuficientes para o desenvolvimento de kiwizeiro em condições *in vitro*, sendo necessária a suplementação com uma fonte de citocinina externa para a melhoria dos parâmetros. Segundo Torres, Caldas e Buso,¹⁶ o acréscimo de reguladores de crescimento ao meio de cultivo é utilizado para suprir possíveis deficiências endógenas e melhorar as características de cultivo *in vitro*. O tipo de citocinina utilizada influencia nas respostas, sendo que, para a multiplicação *in vitro* de kiwizeiro, estudos demonstram que os melhores resultados foram observados nos tratamentos utilizando BAP em vez de tratamentos com cinetina.¹¹

O principal objetivo do estágio de multiplicação *in vitro* é produzir o maior número de plantas possível, com o mínimo de variação entre explantes.¹⁷ Desse modo, uma das variáveis mais importantes a ser considerada é o número de brotações. A maior concentração de BAP adicionada ao meio (2,0 mg L⁻¹) possibilitou a obtenção da maior

taxa de multiplicação (4,4 brotações) e, conseqüentemente, o maior número de folhas. Estudo realizado com o objetivo de avaliar a influência do BAP na multiplicação *in vitro* de kiwizeiro demonstram que a variável número de brotações apresentou efeito crescente até a concentração de aproximadamente 2,0 mg L⁻¹ a partir da qual houve redução.¹⁸ Fortes, Santos Filho e Zecca,¹⁹ em experimento realizado nas mesmas condições, encontraram um incremento linear do número de brotações de kiwizeiro até próximo à concentração de 2,5 mg L⁻¹ de BAP. Contrariamente ao observado neste trabalho, Akbas, Isikalan, Namli e Basaran,¹¹ estudando reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de kiwizeiro, observaram queda no número de brotações com o aumento das concentrações de BAP até 4,0 mg L⁻¹. Esses mesmos autores relataram que a melhor resposta foi observada com a utilização de 0,5 mg L⁻¹ de BAP com um número de brotações de 4,7 aos 28 dias de cultivo.

O número de folhas é uma variável de extrema importância para o crescimento e desenvolvimento das plantas, desde a realização da fotossíntese, absorção de CO₂ e captação da energia solar.²⁰ Assim, um maior número de folhas é associado a um maior metabolismo, crescimento e desenvolvimento da planta.²¹ Estudos realizados com mudas de banana *in vitro* detectaram que as plântulas com maior número de folhas apresentaram maior crescimento inicial e desenvolvimento no estágio de aclimatização em decorrência do aumento da produção de fotoassimilados, resultando em aumento da produção.²²

O maior comprimento médio das brotações foi verificado na concentração de 2,0 mg L⁻¹ de BAP, em que ocorreu um incremento de 33%, quando comparado na concentração zero. O resultado encontrado concorda com o obtido por Nachtigall, Zecca, Figueiredo e Fortes,¹⁸ e é muito importante, visto que era de se esperar que o aumento no número de brotações promovesse uma competição por sais e vitaminas presentes no meio de cultivo, podendo acarretar redução do crescimento delas.²³

5 CONCLUSÃO

O uso de 6-benzilaminopurina foi eficiente na multiplicação *in vitro* de kiwizeiro.

Nas condições em que o experimento foi realizado, os melhores resultados para todas as variáveis analisadas foram obtidos com a utilização de 2,0 mg L⁻¹ de BAP.

REFERÊNCIAS

1. Ferguson AR, Huang HW. Genetic resources of kiwifruit: domestication and breeding. *Hortic Rev.* 2007;(33):1-121.
2. Nishiyama I. Fruits of the Actinidia Genus. *Adv Food Nutr Res.* 2007;(52):293-324.
3. Silveira SV, Anzanello R, Simonetto PR, Gava R, Garrido LR, Santos RSS, Girardi CL. Aspectos técnicos da produção de kiwizeiro. Bento Gonçalves: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; 2012. 79 p.
4. Vieira MJ, Argenta LC, Amarante CVT, Steffens CA, Vieira AMFD. Preservação da qualidade pós-colheita de kiwizeiro 'Bruno' pelo controle do etileno. *Rev Bras Frutic.* 2010;(32):397-406.
5. Disqual. Manual de boas práticas agrícolas: kiwizeiro. 2012. 25 p.
6. Oliveira MM, Fraser LG. Actinidia spp. In: Litz RE. *Biotechnology of fruit and nut crops*. 1a ed. Wallingford: CABI Pub.; 2005. p. 1-27.
7. Almeida NM, Pacheco Junior RG, César JO, Gonçalves HÁ, Souza AS. Produção de mudas micropropagadas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em larga escala: uma inovação tecnológica. In: Congresso Brasileiro De Mandioca; Congresso Latino-Americano e Caribenho de Mandioca. Novembro 9-13, 2005. Foz do Iguaçu: SBM; 2015.
8. George EF. Plant tissue culture procedure: background. In: George EF, Hall MA, De Klerck GJ. *Plant propagation by tissue culture*. Dordrech: Springer; 2008. v.1.
9. Kadota M, Imizu K, Hirano T. Double-phase in vitro culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear. *Sci Hortic.* 2001;(89):207-15.
10. Garcia R, Pacheco G, Falcão E, Borges G, Mansur E. Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2011;(106):47-54.

11. Akbas, FA, Isikalan C, Namli S, Basaran D. Micropropagation of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Int J Agric Biol.* 2007;(1):489-93.
12. Murashige T, Skoog FA. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 1962;(15):473-97.
13. Lucas MAK, Fagundes JD, Pereira DD, Sarmiento MB. Micropropagação de violeta-africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl.): efeito da benzilaminopurina na multiplicação. *Ciênc Agrotec.* 2007;(31):1380-85.
14. Rubin S, Lima CSM, Bandeira JM, Ribeiro MV, Benitz LC, Peters JA, et al. Reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de *Thymus vulgaris* L. *Rev Bras Biocienc.* 2007;(5):480-82.
15. Moncaleon P, Cañal MJ, Feito I, Rodriguez A, Fernandez B. Cytokinins and mineral nutrition in *Actinidia deliciosa* (kiwi) shoots cultured *in vitro*. *J Pl Physiol.* 1999;(155):606-612.
16. Torres AC, Caldas LS, Buso JA. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas.* Brasília, DF: EMBRAPA: CBAB; 1998. 509 p. v.1.
17. Grattapaglia D, Machado MA. Micropropagação. In: TORRES AC, CALDAS LS, Buso JA. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.* Brasília, DF: Embrapa – SPI: Embrapa – CNPH; 1998. p. 183-260.
18. Nachtigall JC, Zecca AGD, Figueiredo SLB, Fortes GRL. Influência da benzilaminopurina (bap) na multiplicação *in vitro* de kiwi (*Actinidia deliciosa*). *Ciênc Rural.* 1995;(25):23-26.
19. Fortes GRL, Santos Filho BG, Zecca AGD. Multiplicação *in vitro* de kiwi, cv. Hayward. *Rev Bras Frutic.* 1992;(14):71-75.
20. Rodrigues DB, Nadal MC, Camargo SS, Assis AM, Schuch MW, Peil RMN, et al. Growth regulators and substrates for *Oncidium baueri* Lindl. *Micropropagation. Semina.* 2016;(37):2901-910.

21. Benincasa MMP, LEITE IC. Fisiologia vegetal. Jaboticabal: Funep; 2002. 168 p.
22. Santos JA, Silva CR, Carvalho JG, Nascimento TB. Efeito do calcário dolomítico e nitrato de potássio no desenvolvimento inicial de mudas da bananeira 'Prata-Anã' (AAB), provenientes de cultura in vitro. Revista Brasileira de Fruticultura. 2004;(26):150-54.
23. Oliveira RP, Silveira DG, Silva SO. Concentração de BAP e a eficiência de micropropagação de bananeira tetraplóide (grupo AAAB). Scientia Agrícola. 2001;(58):73-78.

