

**EFEITOS DA CONSERVAÇÃO *in vitro* A 4 °C NA SOBREVIVÊNCIA E  
PROLIFERAÇÃO DE CEREJEIRA (*Prunus avium* L.)**

Gonçalves, J.C.; Coelho, M.T.

*Lab. Biologia Vegetal, Escola Superior Agrária, 6000 Castelo Branco, Portugal*

**Resumo**

A utilização de técnicas *in vitro* para o armazenamento e conservação de germoplasma, apresenta-se hoje como uma alternativa de valor potencial aos tradicionais métodos de conservação. De facto, a possibilidade de manter partes vegetativas de plantas em condições limitadas de espaço e manutenção por longos períodos de tempo, tornam estas técnicas suficientemente atractivas para constituírem no futuro uma garantia da manutenção de recursos genéticos escassos e limitados.

Neste estudo referem-se os resultados obtidos na conservação pelo frio de rebentos axilares de cerejeira com  $1 \pm 0.2$  cm de comprimento, obtidos a partir de culturas com 1 ano de idade e mantidos a 4 °C em meio de MS com diferentes concentrações de sacarose e de reguladores de crescimento, quer na sobrevivência, quer nas taxas de proliferação, durante três subcultivos sucessivos após o período de conservação de 3, 6, 9 e 12 meses.

A presença de sacarose mostrou ser determinante para a sobrevivência dos explants, o mesmo já não acontecendo às diferentes combinações dos reguladores de crescimento utilizados, BAP e AIA. Decréscimos na sobrevivência começaram a registar-se a partir dos 9 meses de conservação, apesar dos explants sobreviventes continuarem a apresentar capacidade proliferativa. As taxas de multiplicação e alongamento dos rebentos foram em geral afectadas no primeiro subcultivo após a conservação, mas estes valores normalizaram ao longo do segundo e terceiro subcultivo.

**Introdução**

A conservação *in vitro* de culturas no frio a temperaturas entre os 4 e os 15 °C tem sido utilizada para a manutenção de recursos genéticos e colecções de plantas isentas de vírus, sendo um dos exemplos mais conseguidos o citado por Mullin e Schlegel (1976), com morangueiro, onde estes autores referem a possibilidade de conservar durante 5 anos,

sem subcultivos, apenas com reposição de meio líquido para prevenir a dissecação. Também laboratórios comerciais têm utilizado esta possibilidade de conservação de material *in vitro*, para a manutenção de material vegetal em momentos em que a sua multiplicação não se afigura comercialmente vantajosa, diminuindo assim custos de laboração e continuando a dispor de stocks suficientes que a qualquer momento estão disponíveis para reentrarem no circuito convencional de micropropagação. Neste sentido, as reacções do explant às condições de conservação, bem como à sua posterior capacidade de proliferação devem ser convenientemente determinadas. Especial atenção deve ser dada a factores como o estado fisiológico dos rebentos, tipo de explant, formulação nutritiva, tipo de contentor, temperatura e luz, entre outros (Aitken-Christie & Singh, 1987; Orlikowska, 1992).

As espécies vegetais diferem na sua reacção às temperaturas baixas. Em videira (Monette, 1988), a temperatura entre 12 e 9 °C mostrou ser mais favorável do que entre os 7 e 2 °C. Já para a proliferação de rebentos de kiwi a temperatura óptima referida foi de 8°C (Monette, 1986). Na cultivar de macieira Golden delicious, a sobrevivência foi máxima se conservada a 4 °C em vez de 1°C (Lundergen & Janick, 1979). Em relação às formulações nutritivas e tipo de explant usado para conservar, também aqui se verificam particularidades de acordo com as espécies, e várias referências têm sido publicadas (Borkowska, 1990; Lundergen & Janick, 1979; Marino *et al.*, 1985; Eckhard, 1989; Monette, 1986; Janeiro *et al.*, 1995). A sobrevivência e proliferação têm normalmente sido referidos logo após o primeiro subcultivo, e poucos são os autores que referem o comportamento das culturas durante sucessivos subcultivos (Eckhard, 1989; Orlikowska, 1992).

Neste artigo descrevemos os efeitos da conservação *in vitro* a 4 °C de um clone de cerejeira (*Prunus avium* L., clone VA1) na sobrevivência e proliferação durante 3 subcultivos sucessivos, mantido no escuro por 3, 6, 9 e 12 meses. As variáveis utilizadas foram, para além do tempo de conservação, a concentração de sacarose e de reguladores de crescimento usados na formulação nutritiva de conservação do material vegetal.

#### **Material e Métodos**

Utilizaram-se neste trabalho culturas de cerejeira estabelecidas *in vitro* há mais de um ano, com subcultivos cada 4 semanas em meio de Murashige e Skoog (1962), com os

macronutrientes reduzidos a metade, suplementado com  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  de 6-benzilaminopurina (BAP),  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  de ácido indol-3-acético (AIA),  $30 \text{ g l}^{-1}$  de sacarose e  $7 \text{ g l}^{-1}$  de agar comercial. O pH foi ajustado a 5.5-5.6 antes de autoclavar. As culturas foram mantidas em condições standard de crescimento, com uma densidade de fluxo fotónico de  $50 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  durante 16 h, fornecido por lâmpadas fluorescentes branco frio, com temperaturas dia e noite de 25 e 20 °C respectivamente.

O explante de conservação usado foi o rebento inteiro isolado do tufo de multiplicação e colocado no frio logo após o subcultivo (dia zero).

Foram delineados dois ensaios. No primeiro testaram-se 4 concentrações de sacarose: 0, 10, 20 e  $30 \text{ g l}^{-1}$ . No segundo ensaio testaram-se 3 combinações de reguladores de crescimento:  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  BAP +  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  AIA,  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BAP +  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  AIA e  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  BAP. O meio de cultura, com excepção dos componentes citados, foi o utilizado durante a fase de multiplicação. Foram colocados 7 explants por frasco ( $8 \text{ } \varnothing \times 7 \text{ cm}$ ) com 50 ml de meio. Foram usados 4 frascos, 28 explants no total por tratamento, e colocados às escuras a  $4 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$ . Após 3, 6, 9 e 12 meses de conservação, as culturas foram retiradas do frio, mantidas durante 2 dias no meio de conservação, após o que foram transferidas para meio de multiplicação e condições standard de cultura. Controlos, sem tempo de conservação, foram mantidos em condições standard de cultura durante o período dos ensaios. No 1º, 2º e 3º subcultivos foram registados os seguintes parâmetros: sobrevivência, que traduz a percentagem de culturas que mantêm a capacidade de proliferação, número de rebentos por explant e comprimento do maior rebento por explant, no entanto, e para simplificação na exposição dos resultados, apenas se indicam os valores obtidos no 1º e 3º subcultivo. Os ensaios foram avaliados por ANOVA bifactorial (tempo de conservação x composição do meio) e as médias foram comparadas pelo teste da mínima diferença significativa (LSD) para  $p=0.05$ .

## Resultados

### *Influência da concentração de sacarose no meio*

Um aspecto que se afigurou como determinante na possibilidade de conservação de rebentos de cerejeira, nas condições anteriormente descritas, foi a absoluta necessidade de sacarose no meio de cultura. De facto a ausência de sacarose inviabilizou totalmente a possibilidade de conservação dos rebentos, independentemente do tempo de conservação

(Fig. 1), mostrando, assim, ser um factor que influencia significativamente a capacidade de sobrevivência. Nas restantes concentrações 10, 20 e 30  $\text{gl}^{-1}$  de sacarose, não se registaram diferenças significativas dentro de cada momento de registo de 3, 6, 9 e 12 meses, bem como ao longo deste período, embora se verifique um ligeiro decréscimo, sendo na concentração de 30  $\text{gl}^{-1}$  que se observa a menor flutuação.

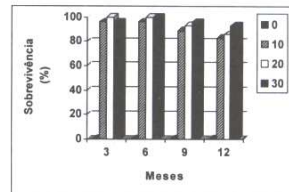


Fig. 1. Influência da concentração de sacarose ( $\text{gl}^{-1}$ ) na taxa de sobrevivência.

Em relação ao número de rebentos, verificamos que este parâmetro é significativamente afectado pela conservação no frio, independentemente do tempo de conservação bem como da concentração de sacarose (Fig. 2 e 3). De facto, no primeiro subcultivo após a conservação, registámos valores nas taxas de multiplicação entre 1 e 1.8 rebentos por explant, sem diferenças significativas entre o factor tempo de conservação e concentração de sacarose (Fig. 2), valores estes que contrastam com as taxas de multiplicação no terceiro subcultivo que atingem os valores normais de multiplicação nesta espécie, entre 4 e 5.3 rebentos por explant (Fig. 3). Embora não se tenham registado diferenças significativas nas taxas de multiplicação no terceiro subcultivo de acordo com a proveniência dos rebentos, verificamos no entanto uma ligeira superioridade nos rebentos conservados com 30  $\text{gl}^{-1}$  de sacarose (Fig. 3).

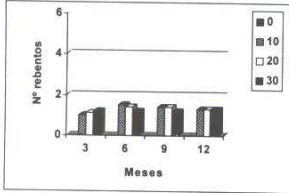


Fig. 2. Influência da concentração de sacarose na taxa de multiplicação após o 1º subcultivo.

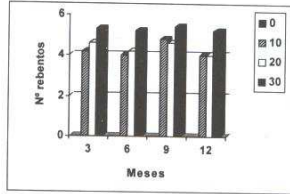


Fig. 3. Influência da concentração de sacarose na taxa de multiplicação após o 3º subcultivo.

O terceiro parâmetro analisado, comprimento do maior rebento, embora não tendo sido tão afectado no primeiro subcultivo após a conservação do material no frio, comparativamente ao que acabámos de observar para a taxa de multiplicação, mostra no entanto uma tendência de comportamento muito semelhante. Assim, verificamos diferenças significativas do 1º para o 3º subcultivo (Fig. 4 e 5), com particular incidência logo após 3 meses de conservação. No 3º subcultivo os valores de alongamento registados podem ser considerados como normais, comparativamente às culturas de controlo.

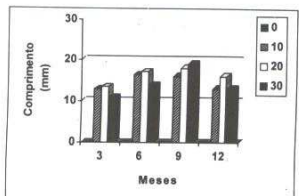


Fig. 4. Influência da concentração de sacarose no alongamento após o 1º subcultivo.

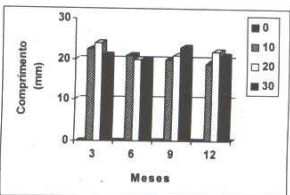


Fig. 5. Influência da concentração de sacarose no alongamento após o 3º subcultivo.

#### Influência dos reguladores de crescimento no meio de cultura

A utilização de 3 diferentes combinações de reguladores de crescimento no meio de cultura utilizado para manter no frio as culturas de cerejeira, mostrou não ser geradora de respostas significativamente diferentes e, tal como referimos em relação à influência da concentração de sacarose, também aqui o que de facto parece ser determinante é o factor temperatura, independentemente do tempo de conservação. Assim, verificamos que nas

taxas de sobrevivência as diferenças registadas quer entre os tempos de conservação quer para as diferentes combinações de reguladores de crescimento são ainda de menor amplitude, sem qualquer diferença significativa entre elas (Fig.6).

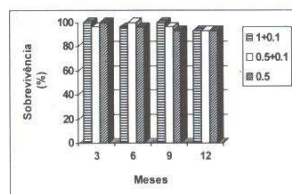


Fig. 6. Influência dos reguladores de crescimento na taxa de sobrevivência.

Em relação às taxas de multiplicação, após um significativo efeito prejudicial, os valores normais são recuperados ao 3º subcultivo (Fig. 7 e 8), desaparecendo também o efeito da combinação em que os rebentos estiveram conservados

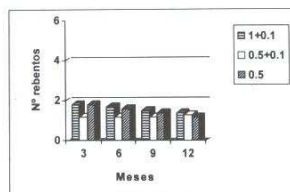


Fig. 7. Influência da combinação de reguladores de crescimento na taxa de multiplicação após o 1º subcultivo.

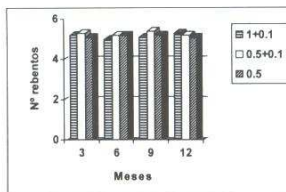


Fig. 8. Influência da combinação de reguladores de crescimento na taxa de multiplicação após o 3º subcultivo.

Para o parâmetro alongamento, o tipo de resposta apresenta uma tendência em tudo idêntica ao já descrito para a influência da sacarose, isto é, um significativo efeito no caso dos rebentos mantidos no frio durante 3 meses, mas que desaparece ao 3º subcultivo, e nas restantes modalidades esse efeito não foi tão notório (Fig. 9 e 10).

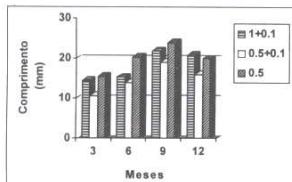


Fig. 9. Influência da combinação de reguladores de crescimento no alongamento após o 1º subcultivo.

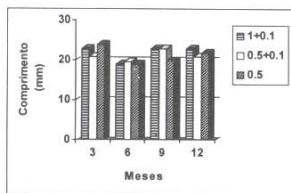


Fig. 10. Influência da combinação de reguladores de crescimento no alongamento após o 3º subcultivo.

Outro aspecto que consideramos importante referir, diz respeito ao estiolamento que os rebentos sofreram ao longo do tempo de conservação. De facto registou-se um progressivo alongamento à medida que se ia prolongando o tempo de permanência dos rebentos no frio atingindo valores máximos ao fim dos 12 meses. De referir que estes rebentos apresentaram uma certa capacidade de síntese de clorofila logo que expostos às condições standard de cultura, pelo que se mostraram possíveis de reutilizar.

#### Discussão

Os resultados indicam que a sobrevivência deste clone de cerejeira mantido no escuro a 4 °C, se exceptuarmos a modalidade de 0  $\text{gl}^{-1}$  de sacarose, não parece ser muito afectado pelas diferentes modalidades testadas, quer nas restantes concentrações de sacarose, quer nas combinações de reguladores de crescimento, tendo todas elas apresentado condições que se podem considerar altamente favoráveis para a possibilidade de conservação *in vitro* deste clone. O facto de as culturas não sobreviverem na ausência de sacarose pode ser explicada na sequência do importante contributo que este constituinte do meio de cultura tem nos valores do potencial osmótico dos meios. De facto, na concentração de 30  $\text{gl}^{-1}$ , a sacarose contribui para metade do potencial osmótico do meio de MS, e sabendo o importante papel do potencial osmótico nos equilíbrios fisiológicos dos tecidos vegetais, facilmente se constata a sua necessidade, mesmo em menores concentrações. Também em macieira a redução da concentração de sacarose para 15  $\text{gl}^{-1}$  permitiu manter a viabilidade dos explants durante 18 meses (Eckhard, 1989). A presença

de reguladores de crescimento durante o período de conservação parece não ser indispensável, permitindo até a prevenção do estiolamento dos rebentos (Orlikowska, 1992). No entanto, e tal como referimos, estes rebentos mantêm a suas capacidades fisiológicas, apesar de apresentarem entrenós muito alongados. Foi também registado uma forte capacidade proliferativa na base destes rebentos.

Se as taxas de sobrevivência foram pouco afectadas quer pelas combinações nutritivas testadas, quer pelo tempo de conservação, já os valores das taxas de multiplicação foram fortemente afectados pela conservação no frio, embora independentemente das combinações. No entanto os valores normais são progressivamente recuperados, parecendo assim, que a temperatura exerceu um certo efeito negativo na capacidade de expressão dos genes que controlam a morfogénese, que no entanto retomam a sua actividade normal após algum tempo sob as condições standard de cultura. Em relação ao tipo de efeitos que estes factores exercem nas culturas os resultados publicados apresentam, por vezes, grandes diferenças entre si. Marino *et al.* (1985), referem que após dez meses de conservação, genótipos de *Prunus* não viram a sua capacidade de proliferação afectada. Já Borkowska (1990) refere que a capacidade de proliferação sofre decréscimo após conservação prolongada. Janeiro *et al.* (1995), referem que apesar de a conservação no frio parecer incrementar a capacidade de proliferação de culturas de cerejeira, esta capacidade parece no entanto ser transitória, já que após 2-3 subcultivos elas apresentam os valores normais em relação aos controlos. Também Orlikowska (1992) refere que a conservação no frio provoca decréscimo na capacidade proliferativa do porta-enxerto M9 pelo que recomenda a conservação em tufo e não em rebento isolado.

Dos resultados já publicados bem como dos agora apresentados, fica a ideia de que parece difícil generalizar soluções para os problemas da sobrevivência e proliferação das culturas para diferentes espécies quando conservadas a baixas temperaturas, pelo que continua a manter-se necessário a definição de protocolos que permitam não só solucionar essas dificuldades bem como a minimização de custos durante a conservação.

#### Referências Bibliográficas

Aitken-Christie J & Singh AP (1987) Cold storage of tissue culture. In: Bonga JM & Durzan DJ (Eds) *Cell and Tissue Culture in Forestry*, Vol 2 (pp 285-304) Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.

- Borkowska B (1990) Influence of low temperature storage on regenerative capacity of sour cherry cultivars. *Fruit Sci Rep* 17: 1-7.
- Eckhard A (1989) Untersuchungen zur Entwicklung einer rationellen Method der *In-vitro*-Depothaltung von Kernund Steinobst unter Kuhlbedingungen. *Arch Gartenbau* 2: 131-140.
- Janeiro LV, Vieitez AM, Ballester A (1995) Cold storage of *in vitro* cultures of wild cherry, chestnut and oak. *Ann Sci For* 52: 287-293.
- Lundergen C & Janick J (1979) Low temperature storage of *in vitro* apple shoots. *HortScience* 14: 514.
- Marino G, Rosati P & Sagrati F (1985) Storage of *in vitro* cultures of *Prunus* rootstocks. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 5: 73-78.
- Monette PL (1986) Cold storage of kiwifruit shoot tips *in vitro*. *HortScience* 21: 1203-1205.
- Monette PL (1988) Grapevine (*Vitis vinifera* L.). In: Bajaj YPS (Ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 6 Crops II (pp 3-37). Springer Verlag.
- Mullin RH & Schlegel DE (1976) Cold storage maintenance of strawberry meristem plantlets. *HortScience* 11: 100-101.
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Orlikowska T (1992) Effect of *in vitro* storage at 4°C on surviving and proliferation of 2 apple rootstocks. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 31, 1-7.