

# MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA Cv. MARUBAKAIDO (*Malus prunifolia* WILLD, BORKH) COM DIFERENTES NÍVEIS DE BENZILAMINOPURINA E ÁCIDO NAFTALENACÉTICO

*IN VITRO* MULTIPLICATION OF APPLE ROOTSTOCK cv. 'MARUBAKAIDO' (*Malus prunifolia* WILLD, BORKH) WITH DIFFERENT LEVEL OF BENZYLAMINO PURINE AND NAPHTHALENO ACETIC ACID

GIACOBBO, Clevison L.<sup>1</sup>; GOMES, Fernando R. C.<sup>1</sup>; KROTH, Leandro L.<sup>2</sup>; CONCEIÇÃO, Melissa K.<sup>3</sup>; FORTES, Gerson R. de L.<sup>4</sup>

## RESUMO

O trabalho objetivou avaliar o efeito de concentrações de BAP (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0  $\mu\text{M}$ ) e de ANA (0; 0,05 e 0,10  $\mu\text{M}$ ) na multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira, cv. Marubakaido (*Malus prunifolia* Willd, Borkh). O meio utilizado foi o MS com 100  $\text{mg.L}^{-1}$  de mio-inositol, 30  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose e 6  $\text{g.L}^{-1}$  de ágar. Após a inoculação, os explantes foram submetidos a 16 horas de fotoperíodo, temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , com radiação de 25  $\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Após 30 dias avaliou-se altura das brotações, número de brotações, número de gemas e a taxa de multiplicação. A altura máxima de brotações foi observada com 0,49  $\mu\text{M}$  de BAP. O melhor resultado para o número de brotações foi com 1,0  $\mu\text{M}$  de BAP e para o número de gemas e taxa de multiplicação foi obtido com 0,73  $\mu\text{M}$  de BAP. A utilização de ANA não melhorou a multiplicação do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido em todas as variáveis analisadas.

Palavras-chave: substância de crescimento, micropropagação, cultura de tecido.

## INTRODUÇÃO

Várias doenças causam prejuízos à cultura da macieira, dentre elas pode-se destacar as viroses, cujos efeitos refletem-se diretamente na produtividade e na qualidade da fruta. Assim, a multiplicação de mudas livres de vírus e um programa de indexação é de fundamental importância, considerando-se que a produção de maçãs representa na fruticultura nacional.

Obtendo-se brotações indexadas, processa-se a multiplicação destas considerando-se também o aspecto qualitativo, ou seja, que estas brotações tenham o mínimo de variação (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Dentre os porta-enxertos utilizados na macieira, destaca-se o 'Marubakaido', cultivar selvagem de origem japonesa, vigorosa, de alta adaptabilidade a diferentes tipos de solo, resistente a *Phytophthora* sp. e ao pulgão lanígero, mas sensível a viroses, indicada para replantio ou plantio em baixa densidade (LOSSO & MONDIN, 1991). Pode ainda ser utilizado para plantios adensados mediante a utilização de filtros de cv. ananizante.

Durante a fase de desenvolvimento *in vitro* das brotações da macieira, é necessário um meio rico em citocinina, pois o mesmo induz a maior proliferação de gemas

adventícias, grande número de brotações através do crescimento de meristemas laterais, tendo assim um bom desenvolvimento da parte aérea (FACHINELLO et al., 1995; CALDAS et al., 1998). LEE & KO (1984) consideram o BAP (benzilaminopurina) um regulador de crescimento essencial para a indução de brotações da macieira, pois na ausência desta no meio de cultura, não há proliferação de brotações. O tipo e a concentração utilizada deste fitorregulador, são os fatores que mais influem no sucesso da multiplicação *in vitro*, sendo a faixa mais empregada entre 0,5 e 5,0  $\text{mg.L}^{-1}$ , o excesso pode ser tóxico e comprometer o desenvolvimento das culturas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Outros fitorreguladores, as auxinas, exemplo ANA (ácido naftalenoacético) são responsáveis pela alongação e pelo aumento no tamanho dos tecidos, divisão celular, na formação de raízes adventícias, entretanto inibem a formação de brotos adventícios e axilares (PIERIK, 1987; YUI, 1990). Segundo OCHAT & CASO (1983), a adição de ANA ao meio de cultura pode inibir a proliferação de brotações, podendo induzir a formação de calos se forem utilizadas concentrações elevadas.

Com este trabalho, objetivou-se verificar o efeito de diferentes concentrações do BAP e do ANA na multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. Segmentos contendo duas gemas da porção basal do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido (*Malus prunifolia* Willd, Borkh), proveniente de plantas mantidas *in vitro*, foram utilizadas como explantes.

O meio de cultura utilizado continha os sais de base e vitaminas MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado de 100  $\text{mg.L}^{-1}$  de mio-inositol, 30  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose e 6  $\text{g.L}^{-1}$  de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,9 antes da inclusão do ágar e, posteriormente, autoclavado a 121  $^\circ\text{C}$  e 1,5 atm durante 15 minutos.

Os tratamentos foram compostos por BAP (benzilaminopurina) em seis níveis (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0  $\mu\text{M}$ ) combinados com ANA em três níveis (0; 0,05 e 0,10  $\mu\text{M}$ ).

<sup>1</sup> Eng<sup>o</sup>. Agr<sup>o</sup>. Doutorando do PPGA, área de concentração em Fruticultura de Clima Temperado. FAEM/UFPel. Cx. P. 354.

E-mail: giacobbo@ufpel.tche.br. Pelotas, RS. CEP 96001-970. Autor para correspondência.

<sup>2</sup> Eng<sup>o</sup>. Agr<sup>o</sup>. Doutorando do PPGFs, área de concentração em Fitopatologia. FAEM/UFPel.

<sup>3</sup> Bióloga, Mestranda do PPFV, área de concentração em Fisiologia Vegetal. IB/UFPel.

<sup>4</sup> Pesq., Dr., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cx. P. 02372, e-mail: gerson@cenargen.embrapa.br. Brasília, DF.

(Recebido para publicação em 05/08/2002)

Cada tratamento foi composto por um frasco de vidro com capacidade de 250 mL, contendo 30 mL do meio de cultura. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições por tratamento e cinco explantes por frasco, totalizando 72 parcelas.

Após a inoculação dos explantes no meio de cultura os frascos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas, com radiação de  $25 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , obtida através de lâmpadas fluorescente, do tipo branca-fria.

Aos 30 dias foram mensuradas as seguintes variáveis: altura de brotação, número de gemas e de brotações e taxa de multiplicação (calculada através da fórmula  $Tm = n^\circ \text{ gemas finais} / n^\circ \text{ gemas iniciais}$ ). A análise dos dados foi realizada por regressão polinomial, através do uso do software SANEST (ZONTA & MACHADO, 1987). Para as variáveis número de brotações e número de gemas, os dados foram transformados segundo raiz quadrada de  $x + 0,5$  e raiz quadrada de  $x + 1$ , respectivamente.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Altura das brotações

Observou-se um comportamento quadrático para os níveis de BAP e de ANA no que diz respeito à altura das brotações. A maior altura de brotações foi obtida na concentração de  $0,49 \mu\text{M}$  de BAP e ausência de ANA (Figura 1). Com dosagens superiores a  $0,49 \mu\text{M}$  de BAP observou-se um decréscimo no crescimento das brotações. O aumento nas concentrações de ANA resultou em efeito negativo na altura das brotações (Figura 2), semelhante ao encontrado por DUNSTAN et al. (1985), os quais verificaram que a utilização de altas concentrações de BAP (acima de  $3,0 \text{ mgL}^{-1}$ ) no meio afetou a qualidade dos brotos de macieira, produzindo brotações atrofiadas. Provavelmente este fato ocorreu pelo excesso de citocinina ter sido tóxico e comprometeu o desenvolvimento das culturas. Fato este antes observado por GRATTAPAGLIA & MACHADO (1998).

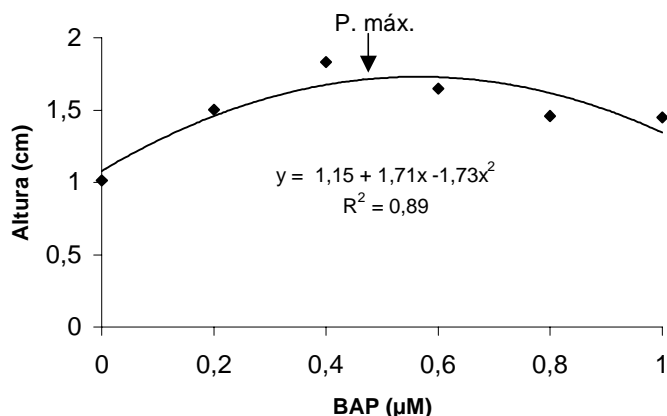


Figura 1 - Altura média de brotações de macieira cv. Marubakaido com diferentes concentrações de BAP. Embrapa Clima Temperado. Pelotas, 2001.

### Número de brotações

Para a variável número de brotações, o melhor resultado foi obtido com  $1,0 \mu\text{M}$  de BAP (Figura 3), apresentando pequena variação não significativa quando da utilização de

ANA. Resultados semelhantes obtidos por LANE (1978), que verificou não ser necessária a aplicação de auxina exógena para a proliferação de brotos e que a adição de doses entre  $0,1$  e  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA inibiu a proliferação de brotações.

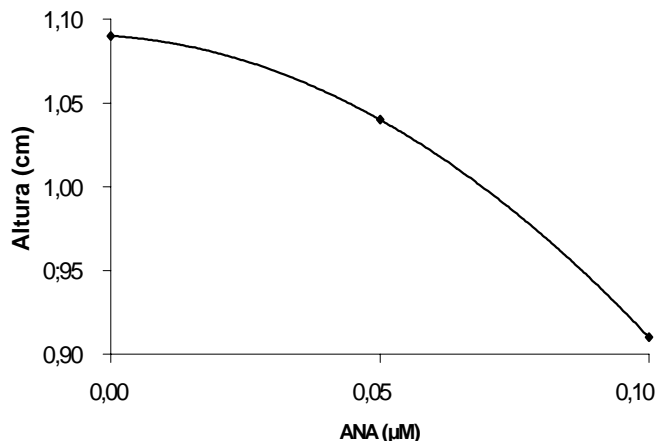


Figura 2 - Altura média de brotações de macieira cv. Marubakaido com diferentes concentrações de ANA. Embrapa Clima Temperado. Pelotas, 2001.

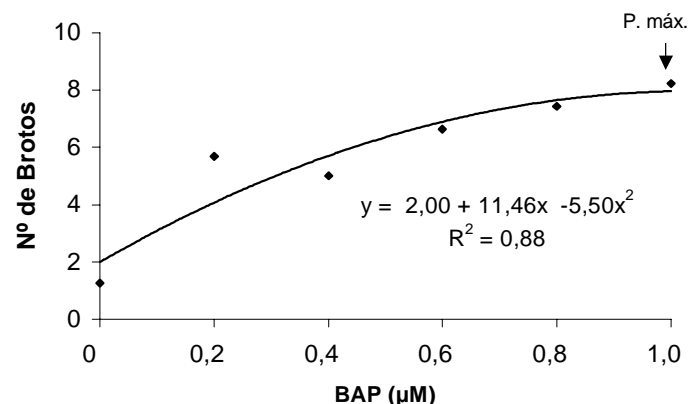


Figura 3 - Número médio de brotações de macieira cv. Marubakaido com diferentes concentrações de BAP. Embrapa Clima Temperado. Pelotas, 2001.

Quanto aos resultados com BAP, verificou-se conformidade com trabalhos anteriores com outras cultivares como, Golden Spur Delicious, Mutsu e Granny Smith, com concentrações de  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ ,  $0,7 \text{ mgL}^{-1}$  e  $1,0 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP, respectivamente (KADER et al, 1992) e porta-enxertos MI-793, com  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  (PASQUAL & ISHIDA, 1992) e M-7 com concentrações entre  $0,5 - 2,0 \text{ mgL}^{-1}$  de BAP (YUI et al, 1993). Nestes trabalhos, as concentrações de BAP adequadas para a multiplicação, variaram de acordo com as cultivares utilizadas.

### Número de gemas e taxa de multiplicação

Para a variável número de gemas e taxa de multiplicação o melhor resultado foi obtido com a concentração de  $0,73 \mu\text{M}$  de BAP na ausência de ANA (Figuras 4 e 5).

Com a presença de ANA pequena variação positiva foi observada estatisticamente, não diferindo significativamente (média de 2,66 gemas e taxa de multiplicação de 3,05). JAMES & THURBON (1981), citam que as auxinas podem ser omitidas do meio de cultura, sem afetar grandemente a

quantidade de brotações, entretanto a taxa em multiplicação de porta-enxertos de macieira possa ser incrementada com a combinação de BAP e auxina.

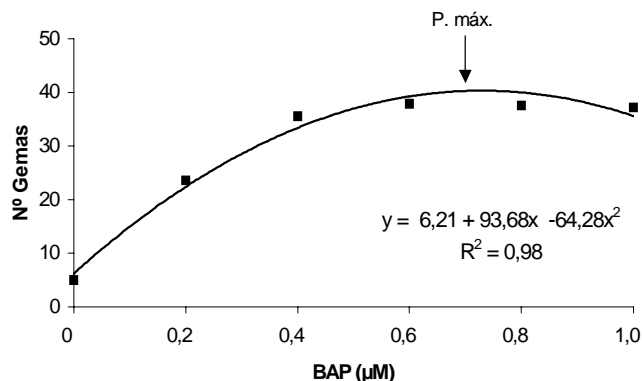


Figura 4 - Número médio de gemas de macieira cv. Marubakaido com diferentes concentrações de BAP. Embrapa Clima Temperado. Pelotas, 2001.

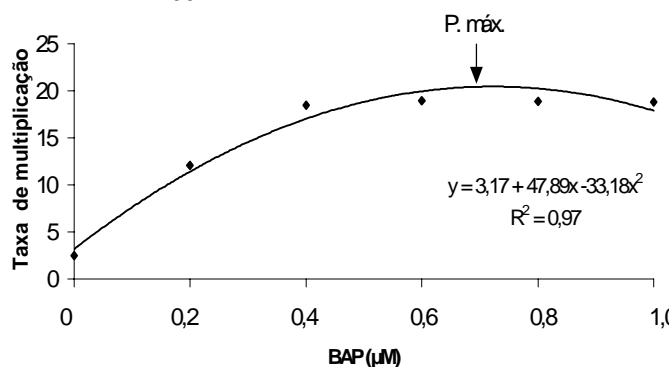


Figura 5 - Taxa média de multiplicação de porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido sob diferentes concentrações de BAP. Embrapa Clima Temperado. Pelotas, 2001.

## CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos no experimento, conclui-se que o emprego de BAP promove aumento na taxa de multiplicação de porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido, podendo ser utilizado na concentração de 0,73 µM.

A utilização da auxina ANA na multiplicação de macieira porta-enxerto cv. Marubakaido não apresenta resultado que justifique seu emprego.

## ABSTRACT

This work aimed to evaluate the effect of different BAP concentrations (0; 0.2; 0.4; 0.6; 0.8 and 1.0 µM) and NAA (0; 0.05 and 0.10 µM) on *in vitro* multiplication of the cv. Marubakaido (*Malus prunifolia* Willd, Borkh) apple rootstock. The MS nutrient medium was used added with myo-inositol 100 mg.L<sup>-1</sup>, sucrose 30 g.L<sup>-1</sup> and agar at 6 g.L<sup>-1</sup>. After inoculation, the explants were submitted at 16-hour photoperiod, at 25 ± 2°C, with radiation of 25 µmoles.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. After 30 days it were evaluated the shoot height, shoot number, number of buds and the rate of multiplication. The highest shoot height was observed at 0.49 µM BAP. The best shoot number was observed with BAP at 1.0 µM. The highest number of bud and multiplication rate were

obtained with BAP at 0.73 µM. NAA did not improve the 'Marubakaido' multiplication as the above variables were concerned.

Key words: growth substance, micropropagation, tissue culture.

## REFERÊNCIAS

- CALDAS, L.S.; HARADASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. ed. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTB/EMBRAPA - CNPH, 433p, 1998.
- DUNSTAN, D.I.; TURNER, K.E.; LAZAROFFI, W.R. Propagation "in vitro" of apple rootstock M.4: effect of phytohormones on shoot quality. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, v.4, p. 55-60, 1985.
- FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C. et al. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Editora e Gráfica Universitária - UFPEL. Pelotas, RS., 1995. 179p.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, ABCTP/EMBRAPA/CNPH, p.99-169. 1998.
- JAMES, D.J.; THURBON, I.J. Phenolic compounds and other factors controlling rhizogenesis in vitro in the apple rootstocks M.9 and M.26. **Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie**, v.105, n.5, p.11-20, 1981.
- KADER, A.; MATHE, A.; LASZLOFFY, K. *In vitro* propagation of apple. Comparative response of three cultivars to cytokinin and auxin. **Acta Horticulturae**, n.300, p.155-161. 1992.
- LANE, W.D. Regeneration of apple plants from shoot meristem tips. **Plant Science Letters**, v.13, p.281-285, 1978.
- LEE, H.J.; KO, K.C. Effects of culture media and plant hormones on shoot tip cultures of Fuji apple cultivar. **Seoul National University College of Agricultural Research**, v.9, n.1, p.61-77, 1984.
- LOSSO, M; MONDIN, V. P. **Sistema de produção para a cultura da macieira**. DID/EMPASC. Florianópolis, 1991. 71 p. (Sistemas de Produção nº 19)
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, v.15, p-473-497. 1962.
- OCHAT, S. J; CASO, O. M. *In vitro* meristem of M4 apple I. optimal nutrient medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 2, p.39-48, 1983.
- PASQUAL, M.; ISHIDA, J.S. Efeito de reguladores de crescimento na proliferação *in vitro* de brotos do porta-enxerto de macieira MI-793. **Revista Ceres**, v.39, n.233, p.584-590. 1992.
- PIERIK, R.L.M. Preparation and composition nutrient media. In: **In vitro culture of higher plants**, Dordrescht, Martinus Nijhoff, 1987, cap. 6. p. 45-82.
- ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **SANEST – Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Pelotas: DMEC/IFM/UFPEL, 1987.
- YUI, E. **Multiplicação in vitro de porta-enxerto de macieira**. Lavras: ESAL. 1990, 69p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras – ESAL, Universidade Federal de Lavras.
- YUI, E.; PASQUAL, M.; RAMOS, J.D. et al. Efeito de reguladores de crescimento sobre a proliferação *in vitro* de porta-enxertos de macieira cv. M.7. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.28, n.5, p.597-602, 1993.