

EXPLANTE, CITOCININA E LUZ: FATORES QUE AFETAM A ORGANOGÊNESE DE PORTA ENXERTO DE MACIEIRA CULTIVAR M-9

EXPLANT, CYTOKININ AND LIGHT: FACTORS THAT AFFECT ORGANOGENESE OF M-9 APPLE TREE ROOTSTOCK

SILVA, Katiane da R. G. da ¹; SCHUCH, Márcia W.²; AFONSO, Ana Paula S.³; SOUZA, Joseane A. de ⁴; SOARES, Adriana P.⁵; SCHIRMBECK, Eliangel⁶

- NOTA TÉCNICA -

RESUMO

O cultivo da macieira, no Brasil, tem exigido que o fruticultor tenha a mente aberta para novas tecnologias. O porta-enxerto tem fundamental importância, pois é usado para controlar vigor da planta, oferecer resistência a patógenos e adaptação a diferentes tipos de solo. Tais características podem ser introduzidas através da transformação genética, requerendo adequado protocolo de regeneração. Para tal, foi realizado experimento com o objetivo de verificar melhor meio, tipo de explante e condições de luminosidade para organogênese do porta-enxerto de macieira M-9. O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Instituto de Biologia da UFPel, Pelotas/RS. Foram utilizados entrenós de 2 mm de comprimento e folhas do porta-enxerto, mantidos no escuro e em 16 horas de luz. O experimento foi realizado em condições assépticas, sendo testado o meio MS acrescido de 0,1 mg.L⁻¹ de ANA e 0, 1, 2 e 3 mg.L⁻¹ de BAP, mio-inositol (100,0 mg.L⁻¹), sacarose (30,0 g.L⁻¹) e gelrite (3,0 g.L⁻¹) e pH do meio de 5,8. A análise estatística foi realizada pelo sistema GENES e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Os resultados permitiram concluir que uma maior percentagem de regeneração foi obtida em meio de cultura com 1,0 mg. L⁻¹ de BAP com prévia exposição no escuro e com entrenó como explante. Também se observou que uma maior percentagem de formação de raízes foi obtida em meio de cultura sem BAP e com prévia exposição ao escuro e folha como explante.

Palavras-chave: cultura de tecidos; meio de cultura; *in vitro*.

A produção brasileira de maçã vem se ampliando a cada ano, mas mesmo assim, esse volume não é suficiente para atender à demanda interna, tornando-se necessária à importação (ABPM, 2000).

No Rio Grande do Sul, a macieira é a frutífera que mais cresceu a partir de 1985. A produção no estado está concentrada nas regiões de Campos de Cima da Serra e da Encosta Superior do Nordeste, concentrando-se no município de Vacaria a maior área plantada (FACHINELLO et al., 1995).

O número de cultivares de macieira existentes no mundo é muito grande. Algumas apresentam maior interesse econômico, como é o caso da "Gala" e "Fuji", representando 91% da área brasileira plantada (ABPM, 2000).

As mudas de macieira são obtidas através de enxertia. O porta-enxerto tem fundamental importância, pois este é imprescindível para controlar o vigor da planta, como também oferecer resistência a patógenos e adaptação a diferentes tipos de solo (FACHINELLO et al., 1995).

O porta-enxerto M-9 é o mais utilizado no Brasil e no mundo, tendo como característica principal controlar o vigor da planta, ou seja, tem efeito ananizante sobre a copa. Além de reduzir o porte da planta, o M-9 induz mais rapidamente a frutificação e, é um dos únicos porta-enxertos que apresenta boa resistência à podridão do colo.

Podem ser utilizados diversos tipos de explantes para iniciar a propagação *in vitro*. Para a escolha do explante deve-se levar em conta o nível de diferenciação do tecido e a finalidade da micropropagação. Em geral, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que tenham maior capacidade de expressar a totipotência (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

A luz influi na regulação da morfogênese e atua como fonte de energia para a realização de fotossíntese (HARTMANN & KESTER, 1990). Tanto a formação da parte aérea quanto da raiz são influenciadas pelo regime de luz (duração do período luminoso ou fotoperíodo), ao qual os explantes são expostos. O fotoperíodo pode variar desde zero horas de luz (escuro) até 24 horas de luz (luz contínua). De maneira geral, pouca luz é necessária durante os estádios iniciais, já que pode inibir o enraizamento, pelo menos na fase indutiva do processo (VIEITEZ & BALLESTER, 1988).

A utilização de técnicas de cultura de tecidos constitui-se uma importante ferramenta de auxílio ao melhoramento genético de fruteiras. O sucesso para qualquer via de regeneração *in vitro* depende da vários fatores, onde os fitorreguladores se destacam como os principais controladores da morfogênese *in vitro*. Dentre as citocininas, o BAP tem sido muito eficaz para promover a multiplicação em diversas espécies e parece ser a citocinina mais adequada para a multiplicação de parte aérea e indução de gemas adventícias (GRATTAPLAGIA & MACHADO, 1998).

A disponibilidade de protocolos eficientes e reproduzíveis para regeneração de plantas através da formação de brotos adventícios é um pré-requisito para a aplicação da engenharia

¹ Estudante de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal – Rua Celso Sellas, 46 – Bairro: Três-Vendas, CEP– 96055-810 – katrgs@pop.com.br

² Prof^a. Dr^a. Departamento de Fitotecnia Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel/UFPel

³ Engenheira Agrônoma, M.Sc., Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia

⁴ Estudante de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal

⁵ Estudante de Graduação em Engenharia Agrônoma

⁶ Estudante de Graduação em Engenharia Agrônoma

(Recebido para publicação em 12/12/2003 Aprovado em 04/04/2005)

genética, permitindo a alteração de algumas características de atuais cultivares de frutas superiores, podendo acelerar consideravelmente a obtenção de genótipos melhorados comparados com técnicas tradicionais de multiplicação em espécies frutíferas arbóreas.

O objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito dos tipos de explantes, reguladores de crescimento e luminosidade na organogênese *in vitro* de porta-enxerto de macieira M-9.

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Instituto de Biologia da UFPel, Pelotas/RS. Entrenós e folhas DE 1,0 cm do porta-enxerto de macieira M-9, obtidos de plantas cultivadas *in vitro*, foram utilizados como explantes. Estes foram retirados de plantas mantidas durante uma semana no escuro e plantas mantidas em condições normais de sala de crescimento.

O meio de cultura utilizado foi MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 30 g.L⁻¹ de sacarose, 3,0 g.L⁻¹ de gelrite, suplementado com 0,1 mg.L⁻¹ de ANA e diferentes concentrações de BAP (0, 1, 2 e 3 mg.L⁻¹). Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento no escuro durante uma semana, temperatura de 25 ± 2°C. Em seguida foram transferidos para sala de

crescimento com 16 horas de fotoperíodo com irradiação de 25 µmol.m⁻².s⁻¹ e temperatura de 25 ± 2°C.

Trinta dias após a incubação foram analisadas as seguintes variáveis: porcentagem de explantes enraizados e porcentagem de explantes brotados.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento, e quatro explantes por frasco. Para análise estatística, os dados foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{x/100}$.

A análise estatística foi realizada pelo sistema Genes (CRUZ, 2001), e as médias dos tratamentos comparadas entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Para a variável segmentos enraizados do porta-enxerto M-9, avaliada 30 dias após a transferência dos explantes para os meios contendo diferentes concentrações de citocinina, não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos utilizando luz/escuro ou entrenó/folha (Tabela 1). Entretanto, os tratamentos utilizando cultivo no escuro, e na ausência de BAP, observou-se à formação de raízes, no entanto, RADMANN (2001) verificou que utilizando a combinação de escuro e auxina, tem-se melhor enraizamento.

Tabela 1 - Porcentagem (%) de segmentos enraizados do porta-enxerto M-9. FAEM/UFPel, 2002.

Tipo de cultivo	Tipo de explante	Concentrações (mg.L ⁻¹) BAP			
		0	1	2	3
Escuro	Entrenó	30 aA ¹	0 aA	0 aA	0 aA
Luz	Entrenó	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA
Escuro	Folha	60 aA	0 bA	0 bA	0 bA
Luz	Folha	0 aA	0 aA	0 aA	0 aA

¹ Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha ou maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Foi verificado um número significativamente maior de brotações (Tabela 2) quando se utilizou a combinação escuro/entrenó com concentração de 1 mg.L⁻¹ de BAP. Os demais tratamentos independente da concentração de BAP utilizada (0, 2 e 3 mg.L⁻¹) e do tipo de explante, tiveram resultados semelhantes porém inferiores.

BARBOSA et al. (1990) e MOURA et al. (2001) estudando diferentes concentrações de BAP visando obter melhor taxa de proliferação *in vitro* de macieira "Gala", verificaram que a presença de BAP promove intensa brotação na parte basal dos explantes, de modo semelhante ao obtido

neste trabalho quando utilizou-se a concentração de 1 mg.L⁻¹. Cabe ainda ressaltar que a quantidade de BAP requerida é diferente para cada cultivar, pois a necessidade de fornecimento de BAP de forma exógena está diretamente relacionada com a quantidade endógena de citocinina que cada cultivar possui (LANE & McDougald, 1982).

Não foi verificado neste trabalho a vitrificação das brotações, fato este constatado por BARBOSA et al. (1990) e PASQUAL et al. (1991) quando se utilizam elevadas concentrações de BAP.

Tabela 2 - Porcentagem (%) de segmentos brotados do porta-enxerto M-9. FAEM/UFPel, 2002.

Tipo de cultivo	Tipo de explante	Concentrações (mg.L ⁻¹) BAP			
		0	1	2	3
Escuro	Entrenó	5 bA ¹	35 aA	10 bA	0 bA
Luz	Entrenó	0 aA	5 aB	10 aA	5 aA
Escuro	Folha	0 aA	0 aB	0 aA	6,25 aA
Luz	Folha	0 aA	0 aB	18,75 aA	10 aA

¹ Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha ou maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Tanto para a porcentagem de segmentos enraizados quanto para segmentos brotados, a permanência no escuro apresentou melhores índices de regeneração. Estes resultados concordam com BAKER & BHATIA (1993) e FERRADINI et al. (1996) que citam que o período de escuro se torna necessário para aumentar a regeneração de plantas.

Os resultados obtidos após 30 dias do início do experimento permitem concluir que obteve-se uma maior porcentagem de regeneração em meio de cultura com 1mg.L⁻¹ de BAP com prévia exposição no escuro e utilizando como explante o entrenó, bem como maior porcentagem de formação de raízes em meio de cultura sem BAP e com prévia exposição ao escuro e utilizando como explante a folha.

ABSTRACT

The apple tree's cultivation in Brazil has been demanding from the open mind for new technologies. The rootstock is very important, because it is used to control the vigor of the plant's, to offer resistance to pathogen and adaptation to different soil types. Such characteristics can be introduced through genetic transformation, requesting an appropriate regeneration protocol. Experiment was accomplished with the objective to verify the best medium, explants type and luminosity conditions for rootstock organogenesis apple tree M-9. The experiment was driven in the Laboratório de Cultura de Tecidos – Instituto de Biologia in the Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS. Internode of 2 mm of length and leaves of rootstock apple tree M-9 were used kept in the darkness under 16 hours photoperiod. The experiment was accomplished in asepsis being used the MS medium supplemented with 0.1 mg.L⁻¹ de ANA, 0, 1, 2, 3 mg.L⁻¹ BAP, mio-inositol (100.0 mg.L⁻¹), sucrose (30.0 g.L⁻¹), gelrite (3.0 g.L⁻¹) and pH 5.8. The statistical analysis was accomplished by the system GENES and the averages compared by Tukey's test at 5 %. The results allowed to conclude that a larger regeneration was obtained on culture medium with 1 mg.L⁻¹ of BAP with previous exposition in darkness and with internode as explants. The largest percentage of formation of roots was obtained on medium of culture without BAP, with previous exposition in darkness and leaves as explants.

Key words: *in vitro*; tissue culture; culture medium.

REFERÊNCIAS

- ABPM. Produção, exportação, importação, empregos gerados. Disponíveis em. < <http://abpm.org>.> Acesso em: 21 de novembro de 2000.
- BAKER, B. S.; BHATIA, S.K. Factors effecting adventitious shoot regeneration from leaf explants of quince (*Cydonia oblonga*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 35, p.273-277, 1993.
- BARBOSA, W.; CAMPO-DALL'ORTO, F.A.; OJIMA, M.; IGUE, T. Concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) na taxa de proliferação *in vitro* da macieira 'Gala'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, n.25, v.5, p. 747-751, 1990.
- CRUZ, C.D. **Programa Genes**: Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, Editora UFV, 2001. 648p.
- FACHINELLO, J.C; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C. KERSTEN; E. ; FORTES, G.R.L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Pelotas : Editora e Gráfica Universitária -FPEL, 1995. 178p
- FERRADINI, N.; FAMIANI, F.; PROIETTI, P.; STANICA, F. Influence of growth regulators on light on *in vitro* shoot regeneration in M.26 apple rootstock. **Journal of Horticultural Science**, v.71, n.6, p.859-865, 1996.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, C.A., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SP/Embrapa-CNPq, 1998, p. 183-260.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D. E. **Propagacion de plantas**: princípios y practicas. México: Compañía Editorial Continental, 1990. 760p
- LANE, W. D.; McDUGALD, J. M. Shoot tissue culture of apple: comparative response of five cultivars to cytokinin and auxin. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 62, p. 689-694, 1982.
- MOURA, T.L.; ALMEIDA, W.A.B.; MENDES, B.M.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A. Organogênese *in vitro* de *Citrus* em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.2, p.240-245, 2001.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.I.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- PASQUAL, M.; LOPES, P.A.; ARELLO, E.F.; BARROS, I. Influência de 6-benzilaminopurina (BAP), sacarose e ágar sobre a vitrificação de brotos de pereira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, n.26, v.11/12, p. 1919-1924, 1991.
- RADMANN, E. B. **Efeito de fitorreguladores e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira 'M-9'**. 2001. 90f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas.
- SAN-JOSÉ, M.C.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A.M. Factors affecting '*in vitro*' propagation of *Quercus robur* L. **Tree Physiology**, Palo Alto, v.4, p.281-290, 1988