

# EFEITO DO ESCURO E DO SECCIONAMENTO DE INTERNÓDIOS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA, CV. MARUBAKAIDO, NA CALOGÊNESE *IN VITRO*

CAMARGO, J.T.<sup>1</sup>; FORTES, G.R. de<sup>2</sup>; SILVA, J.B.<sup>1</sup>; FLORES, R.<sup>1</sup>; CENTELLAS, A.Q.<sup>1</sup>; OLIVEIRA, M.F.<sup>1</sup>; MULLER, N.G.<sup>1</sup>; ANDRADE, L.B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UFPEL/FAEM – Depto. de Fitotecnia, Campus Universitário - Caixa Postal 354, CEP 96.010-900, Pelotas, RS.  
Tel. (0532) 757382 - E-mail: jcamargo@zaz.com.br

<sup>2</sup> EMBRAPA/Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (CPACT) Cx. Postal 403, CEP 96.001-970, Pelotas, RS.  
(Recebido para publicação em 04-03-1999)

## RESUMO

A regeneração de plantas a partir de células somáticas pode ser uma boa alternativa na indução de variações somaclonais e na aplicação de técnicas de manipulação genética. O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas, RS. Testou-se a duração do período de escuro e o seccionamento de internódios, sobre a calogênese do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido, proveniente de cultivo *in vitro*. Internódios de aproximadamente 0,8 cm de comprimento foram colocados em meio de cultivo contendo os sais de MS, acrescido de BAP (5,0mg/l), 2,4-D (0,1mg/l), vitaminas de LS, mio-inositol (100mg/l), sacarose (30,0g/l) e ágar (6,0g/l). Foram utilizados frascos de 250ml, contendo 40ml do meio. Os tratamentos foram testados segundo um delineamento em blocos casualizados num sistema fatorial 4 x 2, sendo: período de escuro com cinco níveis (0; 1; 2; 3 e 4 semanas) e seccionamento do material com dois níveis (seccionado ou não). Cada tratamento constou de seis repetições com cinco explantes em cada repetição. Após o tratamento de escuro os cultivos foram mantidos a  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , com fotoperíodo de 16 h, utilizando-se 2000 lux de luminância, onde permaneceram por 30 dias. Não houve diferença significativa entre os tratamentos, para a percentagem de calos formados.

Palavras-chave: regeneração, escuro, macieira, calogênese.

## ABSTRACT

LENGTH OF THE DARK PERIOD AND SECTIONING OF INTERNODE ON CALOGENESIS OF MARUBAKAIDO (*Malus prunifolia*) APPLE ROOTSTOCK. Regeneration of plants from somatic cells may be a good alternative for inducing somaclonal variations and for genetic manipulation technics. Callus the starting material for somaclonal variation can show high incidence of variation, depending on the plant species and on the methodology employed as well. This phenomenon seems to be very important to obtain improved new clones. The study was carried out at the Laboratory of Tissue Culture at EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas, RS. Length of dark period length and sectioning of internodes were tested. Internodes about 0,8 cm length were placed in culture medium containing MS salts, added BAP (5.0mg/l), 2,4-D (0.1mg/l), LS vitamins, mio-inositol (100mg/l), sucrose (30.0g/l) and agar (6.0 g/l). Glass flasks of 250 ml were employed, containing 40 ml of medium. According to a randomized complete design the treatments were arranged in a factorial, as following: dark period on five levels (0; 1; 2; 3 or 4 weeks) and internodes sectioning on two levels (sectioned or not). Each treatment consisted of 6 replications of 5 explants each. After the dark treatment the explants were kept in a  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  temperature, 16 h photoperiod, under  $\pm 2000$  lux, for 30 days. There was not significant difference between treatments concerning callosis formed.

Key words: regeneratiion, darkness, apple, calogenesis.

## INTRODUÇÃO

No Brasil poucas são as regiões favoráveis ao cultivo da macieira, sendo que, na Região Sul foi implantada em solos ácidos com alto teor de alumínio o que dificulta a produção e aumenta os custos, de correção do solo e esta cultura cresceu rapidamente em área plantada e ainda continua expandindo-se tornando-se necessário o aperfeiçoamento das tecnologias de produção existentes.

O porta-enxerto Marubakaido (*Malus prunifolia*) tem despertado grande interesse entre os produtores e pesquisadores devido a sua adaptabilidade e resistência às doenças de solo. Mas a busca de novos porta-enxertos, com melhores características, continua (MAILLARD & HERMAN, 1988), e, nessa busca, técnicas de cultura *in vitro* têm sido empregadas (JONES & HADLOW, 1989), mais recentemente com a utilização de variação genética somaclonal (ANCHERANI *et al.*, 1990) via cultura de calo.

A regeneração de plantas a partir de células somáticas pode ser uma boa alternativa na indução de variações somaclonais (EVANS & SHARP, 1986) e na aplicação de técnicas de manipulação gênica (JAMES, 1987). A indução de calo, material inicial para a variação somaclonal, faz com que se tenha alta frequência de variação genética, sendo que esta é dependente da espécie vegetal e do refinamento metodológico utilizado, fenômeno este de grande importância ao melhoramento vegetal. Existem poucos relatos sobre trabalhos com esta técnica com árvores frutíferas de clima temperado, e, a maioria destes relatos, citam calos originados de sementes ou de "seedlings".

A maximização da produção de calos regenerativos requer a consideração de vários fatores, como a composição do meio de cultura, a escolha do tipo de explante e as condições de ambiente.

Com o presente trabalho teve-se por objetivo desenvolver uma metodologia para maximizar a calogênese do porta-enxerto de macieira, cv. Marubakaido.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa/Clima Temperado, Pelotas, RS. Foram utilizados os sais de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e as vitaminas de LS (LINSMAIER & SKOOG, 1965), acrescidos de 5,0 mg/l de BAP, 0,1 mg/l de 2,4-D. O pH foi ajustado para 5,8 antes da colocação do ágar. Os explantes foram inoculados em frascos de 250 ml, contendo 40 ml do meio, em câmara de fluxo

laminar, colocando-se 5 explantes/frasco. Testaram-se os fatores seccionamento longitudinal dos internódios com dois níveis (seccionado, não seccionado) e cinco períodos (0; 1; 2; 3 e 4 semanas) de permanência dos explantes no escuro após a inoculação. No tratamento 0 (zero) dia de escuro os explantes foram colocados diretamente na luz, logo após a inoculação. Adotou-se o delineamento experimental de blocos casualizados, sendo que cada tratamento constou de seis repetições.

As variáveis analisadas foram: percentagem de calo formado; intensidade de formação de calo (foram atribuídas notas de 0 a 3, adotando-se o número 0= não formação de calo; 1= pequena; 2= média; 3= grande formação de calo) conforme metodologia empregada por FORTES & ZANOL (1995) (Figura 1).

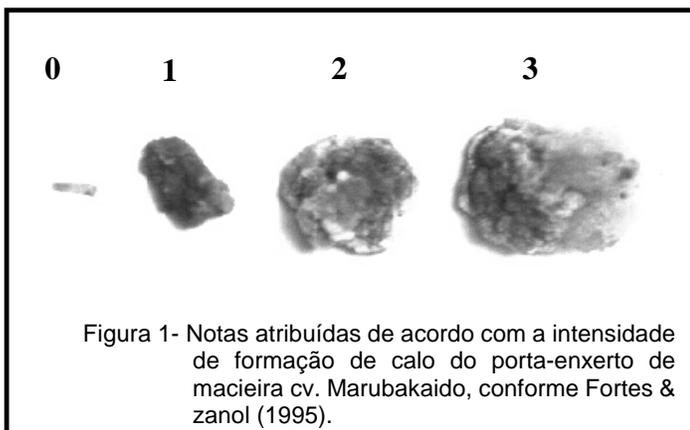


Figura 1- Notas atribuídas de acordo com a intensidade de formação de calo do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido, conforme Fortes & zanol (1995).

Os dados expressos em percentagem, foram transformados em arco seno raiz quadrada de  $X/100$ , onde X representa o valor percentual obtido para cada variável, os dados de intensidade de formação de calo foram transformados em logaritmo de  $X+1$ , onde X significa o valor obtido.

Os dados foram analisados pelo teste de Duncan, utilizando-se  $\alpha$  de 0,05.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após os 30 dias de inoculação, não observou-se diferenças significativas para as variáveis percentagem e intensidade de calo formado, entre os diferentes períodos de permanência no escuro (Tabela 1). Estes resultados contradizem outros estudos envolvendo efeito comparativo de luz e escuro, em que foi observado que a calogênese desenvolveu-se melhor no escuro (DUFOR, 1990; HURWITZ & AGRIOS, 1984; KOUIDER *et al.*, 1984). Porém, observou-se que os internódios que permaneceram no escuro por um período de três semanas, e, foram então transferidos para luz, formaram calo compacto, de coloração verde, o qual diferenciou-se em brotos (Figura 2). Estes resultados são concordantes com os de FORTES & TEIXEIRA (1992) que verificaram, com material somático de macieira (*Malus domestica*, Borkh.), que os explantes expostos diretamente à luz ou permanecendo até duas semanas no escuro, apresentaram maior percentagem de calos regenerativos.

TABELA 1 - Análise de variação para percentagem e intensidade de calo formado em internódios do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido submetidos a diferentes períodos de escuro.

Causas da Variação	G.L.	Quadrado Médio	
		Calo (%)	Calo (intensidade)
Blocos	5	218,428 ns	0,039 ns
Seccionamento (A)	1	1364,769 *	0,012 ns
Escuro (B)	4	383,418 ns	0,049 ns
AxB	4	142,881 ns	0,037 ns
Resíduo	45	261,769 ns	0,044
C.V.(%)		20,81	22,52

\* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de F  
 NS Não significativo



Figura 2- Calo de macieira verde e compacto diferenciando-se em brotações.

COFFIN, citado por Chong & Taper (1974) verificou, com várias espécies de Rosáceas, que a luz teve um efeito neutro ou inibitório no crescimento dos calos dependendo da espécie.

DUFOR (1990) verificou que os calos precisavam de um período de escuro para regenerar, e que exposição inferior a dez dias de escuro reduziu a percentagem de regeneração nas cultivares Gala e Golden Delicious.

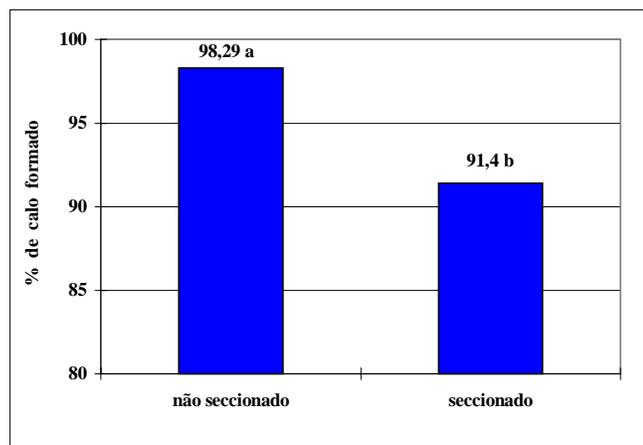
HURWITZ & AGRIOS (1984) relataram que calos de discos foliares de macieira quando colocados no escuro e subcultivados por 4 à 5 semanas, alcançaram 95% de calogênese em três semanas, com um peso médio de 1,2 g no final de três meses. KOUIDER *et al.* (1984) trabalhando com cotilédones sem embrião de macieira cv. Red Delicious, verificaram que os explantes expostos ao escuro por 4 dias e após transferidos para a luz, formaram calo compacto e verde, o qual diferenciou-se em brotos dentro de três semanas. O progresso da formação de brotos foi retardado quando os cotilédones foram transferidos diretamente para a luz. FORTES (1992) trabalhando com a cv. Belgolden, afirma que 8 h de ausência de luz são suficientes para obtenção de uma máxima

formação de calo. CID *et al.* (1995) observaram que a regeneração foi melhorada quando os explantes foram inicialmente expostos a um período de escuro.

BAKER & BHATIA (1993) observaram que um período de três semanas de escuro foi necessário para regeneração ótima de brotações.

Embora SRISKANDARAJAH *et al.* (1994) tivessem obtido calos, a posterior regeneração de brotações somente foi possível com a utilização de um período de escuro. No entanto, HUANCARUNA & SCHIEDER (1993) obtiveram regeneração de brotações de calos que se formaram sob condições de luz.

A percentagem de calo formado foi afetada pelo seccionamento dos internódios (Tabelas 1), e os internódios não seccionados apresentaram maior percentagem de calo formado (Figura 3).



Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F

Figura 3- Percentagem de calo formado em internódios do porta-enxerto de macieira Marubakaido, seccionado ou não.

Estes resultados são opostos aqueles obtidos por JAMES *et al.* (1988) que observaram que o uso do seccionamento do explante aumentou a resposta à calogênese e à organogênese. DRUART (1990) também obteve a organogênese da cv. McIntosh "Wijcik" utilizando folhas escarificadas. A diferença de resposta obtida talvez seja devido ao emprego de genótipos diferentes.

## CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos conclui-se quanto a calogênese do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido:

O internódio não seccionado é a melhor fonte de explante para a calogênese;

O período de escuro não influencia a percentagem e intensidade de formação de calos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ancherani, M.; predieri, S; Rosati, P. Adventitious shoot formation from "in vitro" leaves of MM. 106 apple clonal rootstock. **ACTA Horticulturae**, n.280, p.95-98, 1990.
- 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, n.3, p.273-277, 1993.
- CHONG, C.; TAPER, C.D. Influence of light intensity on sorbitol metabolism, growth and chlorophyll content of Malus tissue cultures. **Annals of Botany**, v.38, n.155, p.359-362, 1974.
- CID, L.P.; BRASILEIRO, A.C.; DURZAN, J. Shoot regeneration mediated by Thidiazuron in *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 2, 1995, Puerto Iguazu, p.n.A-13
- DRUART, P.H. Effect of conditions and leaf selection on organogenesis of *Malus domestica* cv. McIntosh "Wijcik" and *Prunus canescens* Bois GM 79. **Acta Horticulturae**, n.280, p.117-124, 1990.
- DUFOUR, M. Improving yield of adventitious shoots in apple. **ACTA Horticulturae**, n.280, p. 51-60, 1990.
- EVANS, D.A.; SHARP, W.R. Applications of somaclonal variation. **Biotechnology**, v.4, p. 528-532, 1986.
- FORTES, G.R.L. **Calogênese e organogênese "in vitro" de macieira (*Malus spp.*) afetadas por fatores físicos, químicos e biológicos**. Minas Gerais: UFV. 1992. 163p. Dissertação. (Doutorado) Fitotecnia.
- FORTES, G.R.L.; TEIXEIRA, S.L. Calogênese e organogênese de material somático de macieira (*Malus domestica*, Borkh). In: CONGRESSO IBERO AMERICANO, 1, CONGRESSO LATINOAMERICANO, 5, CONGRESSO NACIONAL DE HORTICULTURA, 4, 1992, Montevideo, p.21.
- FORTES, G.R. de L.; ZANOL, G.C. Uso do ácido indolbutírico e floriglucinol no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*). In: REUNIÃO TÉCNICA DE FRUTICULTURA, 4, Porto Alegre: FEPAGRO, 1995, **Resumos**. p.89-91.
- HUANCARUNA, P.E., SCHIEDER, O. Plant regeneration from leaf protoplasts of apple. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.34, n.1, p.71-76, 1993.
- HURWITZ, C.D.; AGRIOS, G.N. Isolation and culture of protoplasts from apple callus and cell suspension culture. **Journal American Society Horticultural Science**, v.109, n.3, p. 348-350, 1984.
- JAMES, D.J. Cell and tissue culture technology for genetic manipulation of fruit trees. In: RUSSEL, G.E. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, Intercepts, Newcastle-Upon Tyne: v.5, p.33-79, 1987.
- JAMES, D.J.; PASSEY, A.J.; RUGINI, E. Factors affecting high frequency plant regeneration from apple leaf tissues cultures in vitro. **Journal Plant Physiology**, v.132, p.148-154, 1988.
- JONES, O.P.; HADLOW, W.C.C. Juvenile-like character of apple trees produced by grafting scions and rootstocks produced by micropropagation. **Journal of Horticultural Science**, v.64, n.4, p.395-401, 1989.
- KOUIDER, M.; SKIRVIN, R.M.; KORBAN, S.S.; WIDHOLM, J.M. Adventitious shoot formation from Red Delicious apple cotyledons "in vitro". **Journal of Horticultural Science**, v.59, n.3, p.295-302, 1984.
- LINSMAIER, E.M.; SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. **Physiology Plant**, v.18, p.100-27, 1965.
- MAILLARD, A.; HERMAN, P. Experimentation with mark rootstock in Castang. **Compact Fruit Tree**, v.21, p.76-78, 1988.
- SRISKANDARAJAH, S.; GOODWIN, P.B.; SPEIRS, J. Transformação genética do enxerto de maçã, cultivar "Delicious" via "Agrobacterium tumefaciens". **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.36, n.3, p.317-329, 1994.