

EFEITO DO BAP E TDZ NA CALOGÊNESE E ORGANOGÊNESE EM INTERNÓDIOS DE MACIEIRA CV. GALA RW1

MORALES¹, Cinara F. G.; LOMBARDI¹, Sergio R. B.; SOARES¹, Patrícia F.; FORTES², Gerson R. de L.

¹UFPe/FAEM. Caixa Postal 354, CEP.: 96010-900 - Pelotas, RS.

²Embrapa Clima Temperado. Caixa Postal 403, CEP.: 96001-970 - Pelotas, RS.

(Recebido para publicação em 02/07/1999)

RESUMO

Estudou-se o efeito da benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) na calogênese e organogênese de internódios de macieira, cv. Gala RW1, provenientes de cultivo *in vitro*. Utilizou-se o meio MS, acrescido de 30g.L⁻¹ de sacarose, 100mg.L⁻¹ de mio-inositol e 6g.L⁻¹ de ágar, sendo o pH ajustado para 5,8. Os tratamentos consistiram da aplicação de BAP e TDZ (5µM), cada um combinado com ácido naftaleno-acético (ANA), ácido indolacético (AIA) e ácido indolbutírico (AIB) nas concentrações de 5 e 10µM, com três repetições de cinco explantes, num delineamento em blocos ao acaso. Inicialmente, os explantes foram submetidos a três semanas de escuro, seguindo-se em ambiente a 25 ± 2°C, luminosidade de 1500 - 2000 lux e fotoperíodo de 16 horas. A partir da saída dos explantes da condição de escuro foram avaliadas semanalmente as percentagens de calos formados e calos regenerativos, assim como o número de brotações e gemas. Houve formação de calos em todos os tratamentos, sendo a presença de BAP e TDZ importantes para formação de calos regenerativos. Para as demais variáveis, os melhores tratamentos foram: BAP, quando se obteve 10 brotos/explante ou 39 gemas/explante; e BAP + AIB (5µM), que originou, em média, 5,6 brotos/explante ou 20 gemas/explante. As brotações originadas nos tratamentos com TDZ foram atrofiadas e vitrificadas.

Palavras-chave: *Malus spp.*, micropropagação, citocininas, auxinas.

ABSTRACT

BAP AND TDZ EFFECTS IN THE CALLOGENESIS AND ORGANOGENESIS IN GALA RW1 APPLE FRUIT INTERNODES.

The present experiment was conducted at the Tissue Culture Laboratory at Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, objectifying to study the effect of benzilaminopurine (BAP) and thidiazuron (TDZ) in the callogenesis and organogenesis *in vitro* of Gala RW1 apple fruit internodes, originating from cultivation *in vitro*. The medium used was MS, added with sucrose (30g.L⁻¹), myo-inositol (100mg.L⁻¹) and agar 6g.L⁻¹, being the medium pH adjusted for 5.8. The treatments consisted of application of BAP and TDZ (5µM), each one combined with naftalenoacetic acid (ANA), indolacetic acid (AIA) and indolbutyric acid (AIB) in the concentrations 5 and 10µM, with three repetitions of five explants. Firstly, the explants were submitted to three weeks of darkness, being after wise exposed to the following conditions: temperature of 25 ± 2°C; light of 1500 - 2000 lux and photoperiod of 16h. The percentages of formed and regenerative callus as well as the shoot and bud number, were weekly evaluated, after exit of the explants from the darkness condition. There were calli formation in all treatments, being BAP and TDZ important for formation of regenerative calli. The best treatments for the other variables were: BAP, when it was obtained 10 shoots/explant or 39 buds/explant; and BAP + AIB (5µM), being obtained 5,6 shoots/explant or 20 buds/explant on the average. The shoots originated by TDZ treatments were atrophied and vitrified.

Key words: *Malus spp.*, micropropagation, cytokinins, auxins.

INTRODUÇÃO

A macieira é a segunda espécie frutífera cultivada no mundo, perdendo apenas para a videira (MOORE & BALLINGTON, 1989). Em função da sua representatividade econômica, vários trabalhos vem sendo realizados visando obter plantas livres de viroses (KNAPP *et al.*, 1995), mais produtivas, resistentes e/ou adaptadas às diferentes regiões produtoras (DEBERGH, 1988; ZIMMERMAN, 1988). Nesse sentido, uma alternativa para obtenção de variação somaclonal é a utilização da micropropagação de material somático, pois permite, também, a aplicação de técnicas de manipulação gênica (LARKIN & SCOWCROFT, 1981; EVANS & SHARP, 1986; JAMES, 1987). De acordo com FARIA & FORTES (1996), internódios de macieira são os melhores explantes para a indução à calogênese e organogênese nessa espécie.

As citocininas e auxinas são os reguladores de crescimento mais utilizados na cultura de tecidos (CALDAS *et al.*, 1990). O tipo e a concentração influenciam na multiplicação *in vitro*, onde normalmente a melhor faixa fica entre 0,5 e 5,0mg.L⁻¹ para ambos fitoreguladores. Segundo LITZ & JARRET (1991), freqüentemente se induz a formação de calos em explantes cultivados em meio contendo auxina, ou com uma alta relação citocinina/auxina.

Os trabalhos com macieira mostram que o 6-benzilaminopurina (BAP) é essencial para a indução de brotações (DUNSTAN *et al.*, 1985; ARELLO *et al.*, 1989). Em concentrações acima de 3,1µM, pode aumentar a formação de calos e o rosetamento das brotações (LASZLOFFY *et al.*, 1992). PASQUAL & ISHIDA (1992) obtiveram os melhores resultados para o número total de brotos e número de brotos maiores que 10mm do porta-enxerto de macieira MI-793, com 2,2µM de BAP. YUI *et al.* (1993) obtiveram maior número de brotos do porta-enxerto M.7, mais longos que 1,0cm, usando BAP em concentrações entre 2,2 - 8,8µM. Para DING *et al.* (1996), a suplementação do meio com BAP em concentrações até 22,2µM é um fator importante para a regeneração de brotos adventícios em explantes de macieira.

O thidiazuron (TDZ) também tem sido usado na micropropagação pois, segundo HUETTEMAN & PREECE (1993), é um excelente estimulante para formação de calos em concentrações iguais ou maiores que 1,0µM. SARWAR & SKIRVIN (1997) obtiveram a máxima regeneração de brotos adventícios em segmentos de folhas de macieira, utilizando entre 2 e 3µM de TDZ. Entretanto, tem como inconveniente, conforme VIRSCEK *et al.* (1994), a ocorrência de altas taxas de vitrificação quando presente em meio de proliferação. CABONI *et al.* (1996) verificaram que a combinação de ANA com TDZ resultou em um alto percentual de regeneração de brotos do porta-enxerto Jork 9, porém com alta incidência de plantas vitrificadas.

Dentre as auxinas usadas na micropropagação da macieira, o ácido indolacético (AIA), geralmente, é utilizado em concentrações entre 0,006 - 57,08 μ M, visando o enraizamento *in vitro*, com comportamento ótimo entre 0,6 - 5,7 μ M (KRIKORIAN, 1991). DE KLERK *et al.* (1997) obtiveram o número máximo de raízes com 100 μ M de AIA (15 raízes), 1 μ M de AIB (15 raízes) e 3 μ M de ANA (8 raízes), pois o tipo e a concentração de auxina, influenciaram na qualidade do sistema radicular e no período de enraizamento.

Para DE KLERK *et al.* (1995), há diferenças quanto às exigências hormonais durante as sucessivas fases de enraizamento de microestacas de *Malus*, pois o AIB ocasiona efeito positivo no enraizamento durante a fase de indução radicular, combinado com um efeito inibitório durante a diferenciação morfológica. O ácido naftaleno-acético (ANA) é mais utilizado para auxiliar o processo de multiplicação *in vitro* da macieira, como também para a indução de enraizamento (CALDAS *et al.*, 1990). Segundo KRIKORIAN (1991), o ANA deve ser usado em concentrações levemente maiores que o AIA, (entre 5,37 - 53,7 μ M), com dose ótima de aproximadamente 10,7 μ M.

Objetivou-se verificar o efeito do BAP e TDZ, combinados com ANA, AIA e AIB nas concentrações 0, 5 e 10 μ M, visando induzir a calogênese e organogênese em internódios de macieira da cv. Gala RW1.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado, no período de 19/03/98 a 12/05/98. Os explantes, com 0,3 a 0,5cm, foram obtidos de internódios de macieira, cv. Gala RW1, oriundos de cultivo *in vitro*. O meio empregado foi o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescido de 30g.L⁻¹ de sacarose, 100mg.L⁻¹ de mio-inositol, 6g.L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,8. A

inoculação dos internódios foi feita em frascos de 250ml com 40ml de meio. Os tratamentos consistiram de BAP e TDZ na concentração 5 μ M, cada um combinado com as auxinas ANA, AIA e AIB nas concentrações 0, 5 e 10 μ M, num total de 14 tratamentos. O delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso, com três repetições e cinco explantes por repetição. Inicialmente, os explantes foram submetidos a três semanas de escuro e, após esse período, mantidos em ambiente com 25 \pm 2°C, luminosidade de 1500 - 2000 lux e fotoperíodo de 16 horas. As avaliações foram semanais a partir da saída dos explantes da condição de escuro, sendo avaliado por cinco semanas. As variáveis analisadas foram: percentagem de calos formados e regenerativos, número de brotações e gemas. Os resultados foram submetidos a análise estatística, sendo realizada a comparação de médias pelo teste de Duncan a 5%.

Os dados expressos em percentagem foram transformados em arco seno raiz quadrada de x/100, onde x representa o valor percentual para cada variável. Os dados das variáveis número de brotos e número de gemas foram transformados em raiz quadrada de x + 1, sendo x o valor da contagem.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 pode ser observado o resultado da análise estatística para as variáveis estudadas, onde se verifica que a percentagem de calos regenerativos, número de brotos e número de gemas foram influenciados pelos fatores citocinina e concentração. As interações em todas as variáveis estudadas não foram significativas, logo, todos os resultados sofreram apenas ação isolada da citocinina, ou concentração de auxina presente no meio.

TABELA 1 Calos formados (% CF), calos regenerativos (% CR), brotações (N^o B) e gemas (N^o G) em internódios de macieira, cv. Gala RW1. Pelotas, RS. 1998

CAUSAS DE VARIAÇÃO	Quadrados médios				
	GL	% CF	% CR	N ^o B	N ^o G
Bloco	2				
Citocinina (A)	1	117,617 ^{ns}	1563,962 [*]	3,771 ^{**}	128,814 ^{**}
Auxina (B)	2	0,00 ^{ns}	703,450 ^{ns}	0,825 [*]	6,682 ^{ns}
Concentração (C)	2	1058,55 ^{ns}	2889,935 ^{**}	4,351 ^{**}	194,258 ^{**}
A x B	2	0,00 ^{ns}	99,709 ^{ns}	0,067 ^{ns}	3,620 ^{ns}
A x C	2	117,617 ^{ns}	385,105 ^{ns}	0,846 ^{ns}	19,078 ^{ns}
B x C	4	0,00 ^{ns}	438,687 ^{ns}	0,339 ^{ns}	15,275 ^{ns}
A x B x C	4	0,00 ^{ns}	80,879 ^{ns}	0,061 ^{ns}	1,175 ^{ns}
Resíduo	34	83,023 ^{ns}	233,739 ^{ns}	0,203 ^{ns}	7,387 ^{ns}
CV (%):		10,6	30,7	20,1	36,1

^{ns} não significativo; ^{*} significativo ao nível de 5%; ^{**} significativo ao nível de 1%, pelo teste F

Para a variável percentagem de calos formados, os tratamentos não apresentaram diferenças significativas, devido ao alto percentual ocorrido. Estes resultados estão de acordo com as afirmações de HUETTEMAN & PREECE (1993) e LASZLOFFY *et al.* (1992), onde a presença de altas concentrações de citocininas no meio, induz a excessiva formação de calos em explantes de espécies lenhosas. Estão, também, de acordo com os resultados de FARIA & FORTES

(1996), que obtiveram 99,5% de calogênese em internódios do porta-enxerto de macieira Marubakaido.

O maior percentual de calos regenerativos foi obtido nos tratamentos com apenas citocininas no meio (figura 1), e o BAP induziu a formação de maior número que o TDZ. Isso, provavelmente, deve-se ao fato de que o BAP possibilita a diferenciação e desenvolvimento dos explantes em curto

espaço de tempo, dado o alto grau de atividade biológica que induz as células.

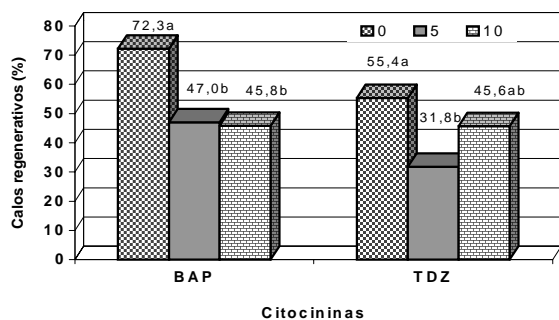


Figura 1 Percentagem de calos regenerativos nos internódios de macieira Gala RW1, em função da concentração de citocinina e das diferentes concentrações de auxina. Pelotas, RS, 1998.

Segundo HANDRO & FLOH (1990), a organogênese é controlada pela concentração de fitorreguladores e pelo balanço citocinina/auxina presentes no meio de cultura. No presente estudo, embora tenha ocorrido organogênese nesses calos, através do surgimento de brotações, foi verificada a formação de raízes apenas nos tratamentos BAP + ANA (50 e 10µM), num total de 3 raízes. Segundo PIERIK (1990), as citocininas são muito ativas na indução e regeneração de explantes, também inibem a formação de raízes e também previnem o crescimento destas. Observou-se ainda que, nos tratamentos BAP + ANA 10µM e TDZ + ANA 5 e 10µM, os calos apresentavam-se parcialmente friáveis (esboroavam ao toque), estando compactos nos demais tratamentos.

Para o número de brotos (Figura2), contendo BAP no meio, ocorreu a maior formação de brotações, pois os tratamentos com auxina não diferiram entre si. Comportamento semelhante ocorreu com o TDZ, porém este induziu um menor número de brotações, em comparação aos tratamentos com BAP.

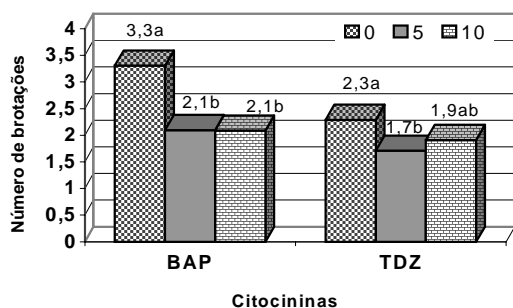


Figura 2 Número de brotações nos internódios de macieira Gala RW1, em função da concentração de citocinina e das diferentes concentrações de auxina. Pelotas, RS, 1998.

Nos tratamentos com BAP todas brotações foram alongadas, o que está de acordo com as observações anteriormente salientadas de PASQUAL & ISHIDA (1992) e YUI *et al* (1993). Comportamento semelhante foi verificado por FARIA & FORTES (1996), que obtiveram o maior comprimento das brotações em internódios do porta-enxerto Marubakaido,

com 5µM de BAP. COMPTON & GRAY (1993) concluíram que o BAP foi necessário para a formação de brotações adventícias.

Nos tratamentos com TDZ, as brotações apresentavam-se vitrificadas e rosetadas, com encurtamento dos entrenós. Provavelmente isso tenha ocorrido, devido a algum efeito fitotóxico da elevada concentração de TDZ no meio. O surgimento de vitrificação com TDZ também foi verificado por VIRSCEK *et al.* (1994) e CABONI *et al.* (1996), mesmo usando baixas doses de TDZ (1µM). Apesar do tratamento BAP + AIB (5µM) originar um menor número de brotações, estas eram mais alongadas que no tratamento onde foi usado apenas o BAP.

Com relação ao número de gemas, novamente observou-se que as citocininas foram mais efetivas, tendo o BAP induzido a uma maior formação de gemas que o TDZ, como pode ser observado nas Figura 3.

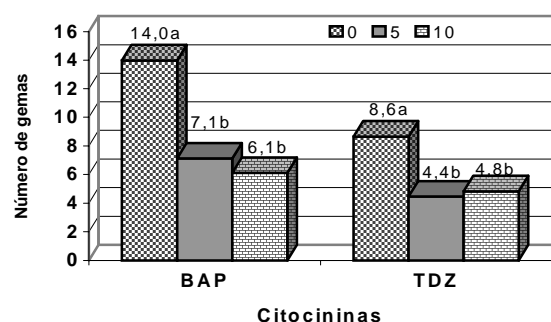


Figura 3 Número de gemas nos internódios de macieira Gala RW1, em função da concentração de citocinina e das diferentes concentrações de auxina. Pelotas, RS, 1998.

Esse maior número de gemas nos tratamentos com BAP, está diretamente relacionado com o maior número de brotações formadas, em comparação com os tratamentos com TDZ, que formaram menos brotações. Esses resultados concordam com FARIA & FORTES (1996), onde os internódios do porta-enxerto Marubakaido proporcionaram uma maior formação de gemas, em meio com BAP (14,7 gemas), em comparação com TDZ (7,82 gemas).

CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos nesse estudo, conclui-se que:

- Os internódios de macieira representam uma excelente fonte de explante para indução à calogênese e organogênese;
- O emprego do BAP no meio propicia a formação de um maior percentual de calos regenerativos, maior número de brotações e número de gemas;
- TDZ não é a citocinina mais indicada para a calogênese e organogênese em internódios de macieira, visto ocorrerem elevadas taxas de vitrificação dos tecidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ARELLO, E.F.; PASQUAL, M.; PINTO, J.E.B.P. Influência do ANA e BAP sobre a multiplicação de brotos de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cv Melrose *in vitro*. **Ciência Prática**, Lavras, v.13, n.3, p.306-313, 1989.
- CABONI, E.; TONELLI, M.; FALASCA, G.; DAMIANO, C. Factors affecting adventitious shoot regeneration *in vitro* in apple rootstock 'Jork 9'. **Advances in Horticultural Science**, v.10, n.3, p.146-150, 1996.
- 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, 1990.
- COMPTON, M.E.; GRAY, D.J. Shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of diploid, triploid, and tetraploid Watermelon. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.18, n.1, p.151-157, 1993.
- DEBERGH, P.C. Micropropagation of woody species state of the art on *in vitro* aspects. **Acta Horticulturae**, v. 227, p.287-295, 1988.
- DE KLERK, G.J.; TERZI, M.; CELLA, R.; FALAVIGNA, A. Hormone requirements during the successive phases of rooting of *Malus* microcuttings. **Current tissues in plant molecular and cellular biology**, p.111-116, 1995.
- DE KLERK, G.J.; TER BRUGGE, J.; MARINOVA, S. Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naftalenoacetic acid during adventitious root formation *in vitro* in *Malus* 'Jork 9'. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.49, n.1, p.39-44, 1997.
- DING, A.P.; WANG, H.F. Factors affecting the differentiation of adventitious buds on apple leaves cultured *in vitro*. **China Fruits**, n.4, p.20-21, 1996.
- DUNSTAN, D.I.; TURNER, K.E.; LAZAROFF, 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.
- EVANS, D.A.; SHARP, W.R. Applications of somaclonal variation. **Biotechnology**, v.4, p.528-532, 1986.
- FARIA, J.T.C.; FORTES, G.R. de L. **Calogênese e Organogênese in vitro de porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido (*Malus prunifolia*)**. Pelotas: UFPel, 1996. 50p. (Dissertação de Mestrado).
- HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. ed. **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília, ABCTP/EMBRAPA/CNPH, p.203-212, 1990.
- HUETTEMAN, C.A.; PREECE, J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for wood plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.33, n.2, p.105-119, 1993.
- 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.
- KNAPP, E.; HANZER, V.; WEISS, H.; MACHADO, A. da C.M.; WANG, Q.; WEISS, B.; KATINGER, H.; MACHADO, M.L.; BARBA, M.; HADIDI, A. Distribution of Apple Chlorotic Leaf Spot Virus in apple shoots cultivated *in vitro*. **Acta Horticulturae**, n.386, p.187-194, 1995.
- KRIKORIAN, A.D. Propagação clonal *in vitro*. In: ROCA, W.M.; MROGINSKY, L.A. **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos e aplicaciones**. Cali. CIAT, p.95-126, 1991.
- LARKIN, P.J.; SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v.60, p.197-214, 1981.
- LASZLOFFY, K.; KADER, A.M.A.; MATHE, A. *In vitro* propagation of 'Julyred' apple. **Acta Horticulturae**, n.300, p.149-154, 1992.
- LITZ, R.E.; JARRET, R.L. Regeneracion de plantas en el cultivo de tejidos, embriogênese somática y organogênese. In: ROCA, W.M.; MROGINSKY, L.A. **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos e aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991, p.143-172.
- MOORE, J.M.; BALLINGTON, J.R. Genetics resources of temperate fruit and nut crops. **Acta Horticulturae**, n. 290, p.149-154, 1989.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Plant Physiology**, v.15, p.473-497, 1962.
- 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. **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. p.69-82, 1990.
- SARWAR, M.; SKIRVIN, R.M. Effect of thidiazuron and 6-benzylaminopurine on adventitious shoot regeneration from leaves of three strains of 'McIntosh' apple (*Malus × domestica* Borkh.) *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.68, n.1-4, p.95-100, 1997.
- VIRSCEK, M.M.; JARVONIK, B.; BOHANEK, B.; KREFT, I. Thidiazuron stimulated shoot regeneration from *in vitro* leaves of apple cultivars. **Proceedings of the International Colloquium on Impact of Plant Biotechnology on Agriculture**, Rogla, Slovênia, Vol.5-7, p.91-95, 1994.
- YUI, E.; PASQUAL, M.; RAMOS, J.D.; NAGIG, N.; CHALFUN, J.; ISHIDA, J.S. 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.
- ZIMMERMANN, R.H. Micropropagation of woody plants: post tissue culture aspects. **Acta Horticulturae**, n.227, p.489-499, 1988.