

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA CV. MARUBAKAIDO: EFEITO DA ORIENTAÇÃO DO EXPLANTE NO MEIO DE CULTURA¹

ALAN CRISTIANO ERIG², MÁRCIA WULFF SCHUCH³

RESUMO - Objetivou-se avaliar o efeito da orientação do explante, vertical ou horizontal, no meio de cultura, na multiplicação *in vitro*, do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido. O meio de cultura utilizado foi o MS com N (nitrogênio) reduzido a ¼ da concentração original, 100mg.L⁻¹ de mio-inositol, 40g.L⁻¹ de sacarose e 6g.L⁻¹ de ágar, suplementado com 4,44mM de BAP (6-benzilaminopurina) e 0,2ml.L⁻¹ de PPMTM ("Plant Preservative Mixture"). Segmentos caulinares com duas gemas e o ápice excisado foram utilizados como explantes. Após a inoculação, os frascos com os explantes foram incubados a 16 horas de fotoperíodo, à temperatura de 25±2°C, com radiação de 25µmoles.m⁻².s⁻¹. O número de brotações, o número de gemas por explante, a taxa de multiplicação e a altura da brotação maior foram avaliados aos quarenta dias de cultivo. O maior número de brotações, o maior número de gemas e a maior taxa de multiplicação foram obtidos com o explante na orientação horizontal no meio de cultura. Não houve diferença significativa quanto à orientação vertical e horizontal do explante no meio de cultura para a altura da brotação maior.

Termos de indexação: micropropagação; cultura de tecidos; *Malus prunifolia*.

IN VITRO MULTIPLICATION OF THE APPLE ROOTSTOCK CV. MARUBAKAIDO: EFFECT OF THE ORIENTATION OF EXPLANT IN THE MEDIUM OF CULTURE

ABSTRACT - The aim of this study was evaluate the effect of the vertical and the horizontal orientation of the explant in the culture medium, in the *in vitro* multiplication, for the apple rootstock cv. Marubakaido. The culture medium used was the MS with N reduced to ¼ of the original concentration, myo-inositol (100mg.L⁻¹), sucrose (40g.L⁻¹) and agar (6g.L⁻¹), supplemented with BAP (4.44mM) and PPMTM (0.2ml.L⁻¹). Stem segments with two buds and the apex excised were used as explants. After the inoculation, the flasks with the explants were incubated at 16 hour of photoperiod, 25±2°C temperature, with irradiation of 25µmoles.m⁻².s⁻¹. The number of shoots and buds, the rate of multiplication and the height of the larger shoot were evaluated after 40 days of cultivation. The highest shoot number, number of buds and the largest rate of multiplication were obtained with the explant in the horizontal orientation in the culture medium. There were not significant difference with vertical and horizontal orientation of the explant in the culture medium for the height of the larger shoot.

Index terms: micropropagation; tissue culture; *Malus prunifolia*.

INTRODUÇÃO

Tendo em vista a grande necessidade de mudas de macieira para abastecer a demanda do mercado, a micropropagação torna-se uma alternativa, devido à rápida multiplicação quando comparada aos métodos tradicionais (Schwartz et al., 2000).

Entretanto, deve-se considerar que, na multiplicação *in vitro*, não basta conseguir-se altas taxas de multiplicação em alguns explantes. O importante é obter-se uma taxa média satisfatória, com o mínimo de variação de explante para explante. Outros aspectos essenciais são a qualidade e a homogeneidade das partes aéreas produzidas, pois determinarão o sucesso no enraizamento (Grattapaglia & Machado, 1998).

A forma das plantas depende da correlação de crescimento entre suas várias partes. Assim, o crescimento de ramos laterais está geralmente sob controle do ápice vegetativo (Válio, 1986), sendo que, nos caules da maioria das espécies, a gema

apical exerce uma influência inibitória (dominância apical) sobre as gemas laterais (axilares), impedindo ou retardando seu desenvolvimento (Salisbury & Ross, 1992). Diante disto, para incrementar as ramificações nas plantas cultivadas, os horticultores cortam as gemas apicais e as folhas jovens (Salisbury & Ross, 1992), provocando a quebra da dominância apical.

Durante a multiplicação *in vitro*, alguns tratamentos podem ser dados aos explantes para estimular uma maior proliferação (Grattapaglia & Machado, 1998). Vieitez et al. (1993) obtiveram uma eficiente produção de brotações em *Quercus rubra*, combinando três tratamentos que favoreceram o crescimento das gemas laterais: excisão do ápice, cultivo na orientação horizontal e tratamento com citocininas.

Lane (1979) quebrou a dominância apical em explantes de *Pyrus*, retirando o ápice ou inoculando as partes aéreas deitadas sobre o meio de cultura. Para Yae et al. (1987), a orientação

1 (Trabalho 097/2001). Recebido: 30/04/2001. Aceito para publicação: 08/02/2002.

2 Engenheiro Agrônomo, Aluno do Programa de Pós - Graduação em Agronomia, área de concentração em Fruticultura de Clima Temperado. FAEM/UFPEL. Cx. P. 354, Cep 96.010-900, Pelotas, RS. e-mail: acerig@ufpel.tche.br. Autor para correspondência.

3 Engenheira Agrônoma, Dra., Professora do Departamento de Fitotecnia. FAEM/UFPEL. Cx. P. 354, Cep 96.010-900, Pelotas, RS. e-mail: marciaaws@ufpel.tche.br.

horizontal mostrou ser superior à vertical para vários clones de "Delicious", apesar de ter pouco efeito em outras cultivares testadas.

Chevreau & Leblay (1993) observaram que brotações de pereira, cultivadas horizontalmente com o ápice excisado, mostraram um atraso antes do recomeço do crescimento das gemas axilares. Este atraso, comparado com o crescimento normal do meristema apical de brotações crescidas na vertical, resultou em menor desenvolvimento de folhas no final do período de cultivo.

O presente trabalho objetivou avaliar o efeito da orientação, vertical ou horizontal, do explante no meio de cultura, na multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos de Plantas, Departamento de Botânica, do Instituto de Biologia da UFPel-RS. Segmentos caulinares do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido (*Malus prunifolia* Willd, Borkh), obtidos de plantas cultivadas *in vitro*, consistindo de duas gemas e com o ápice excisado, foram utilizados como explantes, com tamanho aproximado de 1,0cm.

O meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige & Skoog, 1962) com N (nitrogênio) reduzido a $\frac{3}{4}$ da concentração original, 100mg.L⁻¹ de mio-inositol, 40g.L⁻¹ de sacarose e 6g.L⁻¹ de ágar, suplementado com 4,44μM de BAP (6-benzilaminopurina) e 0,2ml.L⁻¹ de PPM™ ("Plant Preservative Mixture", 5-Cloro-2-Metil-3[2H]-Isotiazolone 0,1350% + 2-Metil-3[2H]-Isotiazolone 0,0412% + ingredientes inertes 99,8238%) com ação bacteriostática.

Foram utilizados frascos de 250ml com 30ml de meio de cultura. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,9 antes da inclusão do ágar e, posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,5atm por 15 minutos.

Os tratamentos utilizados foram duas orientações do explante no meio de cultura - vertical e horizontal. Após a inoculação, os frascos com explantes foram mantidos em sala de crescimento com 16 horas de fotoperíodo, temperatura de 25±2°C, com radiação de 25μmoles.m⁻².s⁻¹.

Aos quarenta dias de cultivo, foram avaliados o número de brotações, o número de gemas por explante, a taxa de multiplicação e a altura da brotação maior. A taxa de multiplicação foi

determinada, dividindo-se o número de gemas por explante, obtido aos 40 dias de cultivo, pelo número inicial de gemas do explante, no estabelecimento do experimento (duas gemas).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com vinte repetições por tratamento, com cinco explantes por frasco. As médias dos tratamentos foram comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan, através do uso do software SANEST (ZONTA & MACHADO, 1987).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de brotações aos quarenta dias de cultivo foi maior nos explantes colocados na orientação horizontal (5,81), quando comparado ao obtido para orientação vertical (3,78) (Tabela 1). Resultado semelhante foi obtido por Turovskaya (1994), que obteve, com o porta-enxerto de macieira 62-396, 5,0 brotações por explante na orientação horizontal e 2,7 brotações por explante na vertical. Este resultado também está de acordo com Lane (1979), que obteve maior número de brotações axilares em explantes de pereira com o ápice removido e colocados horizontalmente no meio de cultura. Chevreau & Leblay (1993) utilizaram explantes de pereira, cv. Passe Crassane, com o ápice excisado e na orientação horizontal sobre o meio e produziram várias brotações axilares. Resultados similares foram também obtidos em castanheira (Vieitez & Vieitez, 1983), em *Amelanchier spicata*, em *Acer rubrum* cv. Red Sunset, em *Forsythia X intermedia* cv. Sunrise, em macieira cv. McIntosh e em *Betula nigra* (McClelland & Smith, 1990).

A obtenção de um maior número de brotações, com o segmento nodal na orientação horizontal, deve-se principalmente à quebra da dominância apical. De acordo com Salisbury & Ross (1992), o transporte de auxinas na planta é polar, e é provável que este transporte seja importante para a regulação da inibição do desenvolvimento das gemas laterais. Desta maneira, a orientação horizontal pode ter inibido esta translocação de auxina, ocorrendo uma maior brotação nos segmentos nodais.

Para o número de gemas por explante e taxa de multiplicação, também foram obtidos resultados superiores com os explantes na orientação horizontal sobre o meio de cultura (Tabela 1). Estes resultados estão de acordo com Chevreau & Leblay (1993), que obtiveram maior taxa de multiplicação com os explantes na horizontal, quando comparado com explantes cultivados na vertical sem excisão do ápice. Nobre (1994) também obteve alta taxa de proliferação em *Myrtus communis* L., a partir

TABELA 1 - Número de brotações, número de gemas por explante, taxa de multiplicação e altura da brotação maior, em explantes de macieira, cv. Marubakaido, cultivados por 40 dias em orientação horizontal e vertical, sobre meio MS. Pelotas, RS, 2000.*

Orientação do explante	Número de brotações	Número de gemas por explante	Taxa de multiplicação	Altura da brotação maior (cm)
Horizontal	5,81 a	30,90 a	15,45 a	1,07 a
Vertical	3,78 b	20,70 b	10,35 b	0,96 a
Média	4,79	25,80	12,90	1,02
CV (%)	23,06	23,96	23,96	44,31

* Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

de explantes colocados horizontalmente no meio de cultura.

Não houve diferença significativa para a altura da brotação maior, quanto à orientação vertical ou horizontal do explante no meio de cultura (Tabela 1). Este resultado está de acordo com Zimmerman & Fordham (1989), que não obtiveram diferença significativa quanto à orientação vertical e horizontal do explante, para o número de brotações de "Delicious" com comprimento maior que 5mm, após três semanas de cultivo. Por outro lado, Chevreau & Leblay (1993) obtiveram maior altura das brotações de pereira, cv. Passe Crassane, com os explantes colocados na vertical sem excisão do ápice.

CONCLUSÕES

1. A orientação horizontal dos explantes de Marubakaido, no meio de cultura, possibilitou a obtenção de maior número de brotações, maior número de gemas por explante e maior taxa de multiplicação, em relação à vertical.
2. Não houve diferença significativa quanto à orientação vertical e horizontal do explante de Marubakaido em meio de cultura para a altura da brotação maior.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHEVREAU, E.; LEBLAY, C. The effect of mother plant pretreatment and explant choice on regeneration from *in vitro* pear leaves. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.336, p.263-268, 1993.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI/Embrapa – CNPH, 1998. v.1, p.183-260.
- LANE, W. D. Regeneration of pear plants from shoot meristem-tips. **Plant Science Letters**, Limerick, v.16, p.337-342, 1979.
- MCCLELLAND, M. T.; SMITH, M. A. L. Vessel type, closure, and explant orientation influence *in vitro* performance of five woody species. **HortScience**, Alexandria, v.25, n.7, p.797-800, 1990.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v.15, p.473-497, 1962.
- NOBRE, J. *In vitro* shoot proliferation of *Myrtus communis* L. from field-grown plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.58, n.3, p.253-258, 1994.
- SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant Physiology**. California, Wadsworth Publishing Company, 1992. 682p.
- SCHWARTZ, E.; RONCATTO, G.; FORTES, G. R. L. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido utilizando 6-Benzilaminopurina e Ácido Naftalenoacético. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.22, n.1, p.77-79, 2000.
- TUROVSKAYA, N. I. *In vitro* micropropagation of apple and pear. **Sadovodstvo i Vinogradarstvo**, Moscow n.1, p.10-12, 1994.
- VÁLIO, I. F. M. Auxinas. In: FERRI, M. G. **Fisiologia vegetal**. São Paulo: EPU, 1986, v.2, p.39-72.
- VIEITEZ, A. M.; PINTOS, F.; SAN JOSE, M. C.; BALLESTER, A. *In vitro* shoot proliferation determined by explant orientation of juvenile and mature *Quercus rubra* L. **Tree Physiology**, Victoria, v.12, n.2, p.107-117, 1993.
- VIEITEZ, A. M.; VIEITEZ, M. L. *Castanae sativa* plantlets proliferated from axillary buds cultivated *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.18, p.343-351, 1983.
- YAE, B. W.; ZIMMERMAN, R. H.; FORDHAM, I.; KO, K. C. Influence of photoperiod, apical meristem, and explant orientation on axillary shoot proliferation of apple cultivars *in vitro*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.112, p.588-592, 1987.
- ZIMMERMAN, R. H.; FORDHAM, I. Explant orientation affects axillary shoot proliferation of apple cultivars *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v.24, n.2, p.351-352, 1989.
- ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **SANEST – Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Pelotas: DMEC/IFM/UFPel, 1987. 138p.