

## USO DE ÁGAR, AMIDO E ÁCIDO INDOLBUTÍRICO NO ENRAIZAMENTO IN VITRO DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA MM 111

### THE USE OF THE AGAR, STARCH AND IBA ON THE IN VITRO ROOTING OF APPLE ROOSTOCK MM 111

Valdecir Carlos Ferri<sup>1</sup> Alberto Quezada Centellas<sup>2</sup>  
Wilson Eduardo Helbig<sup>3</sup> Gerson Renan de Luces Fortes<sup>4</sup>

#### RESUMO

O ágar é um dos componentes mais caros do meio de propagação *in vitro*. Visando a reduzir custos, os estudos foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos da EMBRAPA/CPACT, Pelotas RS, objetivando-se testar a ação do ágar e da sua substituição parcial pelo amido de mandioca na composição do agente solidificante (AS) do meio MS, associados às concentrações de 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 µM de ácido indolbutírico (AIB). Os dois AS de meio de cultivo testados: AS<sub>1</sub> - 6g/l de ágar e; AS<sub>2</sub> - combinação de 3g/l de ágar mais 50g/l de amido de mandioca (fécula), tiveram redução de ½ dos sais de MS e acréscimos de 100mg/l de mio-inositol e 30g/l de sacarose, juntamente com pH ajustado em 5,9 antes da autoclavagem. Os explantes foram mantidos por 30 dias em sala de crescimento sob condições de 25±2°C, 16 horas de fotoperíodo e ±2000 lux de intensidade luminosa. O AS<sub>2</sub>, além de apresentar o maior número de raízes, e maximizá-las na presença de 5 µM de AIB, antecipou em cerca de 10 dias o surgimento destas e apresentou consistência semelhante ao AS<sub>1</sub>, sendo apenas menos transparente.

**Palavras-chave:** micropropagação, agente solidificante, auxina, *Malus*.

#### SUMMARY

The agar is one of the most expensive components in a tissue culture medium when *in vitro* propagation is concerned. This work was carried out in the tissue culture laboratory at EMBRAPA/CPACT, Pelotas RS. The objective of this work was to test the agar action and its partial substitution for cassava starch in the composition of the solidifying agent in the MS basal medium associated with 0; 2.5; 5.0; 7.5 and 10.0 µM indolyl butyric acid (IBA). The solidifying agents were as follows: agar

(6g.L<sup>-1</sup>); agar (3g.L<sup>-1</sup>) + cassava starch (50g.L<sup>-1</sup>). The MS basal medium was reduced to half strength and added to myo-inositol (100mg.L<sup>-1</sup>); sucrose (30g.L<sup>-1</sup>) and the pH adjusted to 5.9 before autoclaving. The explants were kept for 30 days in the growth room under 25±2°C, 16-hour photoperiod and about 2000 lux light intensity. The use of agar + starch promoted a higher number of roots, and a maximization was observed in the presence of 5 µM IBA. It also anticipated the new roots in about 10 days. The consistency of the agar/starch was quite the same as agar and it appeared less transparent.

**Key words:** micropropagation, gelling agent, auxin, *Malus*.

#### INTRODUÇÃO

A cultura da macieira (*Malus domestica*, Borkh), no sul do Brasil, atinge uma área cultivada de aproximadamente 30 mil hectares. Sua produção amplia-se a cada ano, alcançando na safra 95/96, a produção de 524 mil toneladas (ABPM, 1997).

A produção de mudas para estes pomares é tradicionalmente realizada por mergulhia de cepa, o que leva, freqüentemente, a uma redução na capacidade de enraizamento das estacas à medida que as matrizes envelhecem e as doenças se estabelecem. Além disso, este processo é demorado e pouco eficiente, rendendo aproximadamente quatro porta-enxertos/ano/planta matriz (FACHINELLO *et al.*, 1988).

<sup>1</sup>Engenheiro Agrônomo, MSc., doutorando no Curso de Agronomia da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Bolsista da CAPES., Rua Gonçalves Chaves, 805/203, 96015-560, Pelotas, RS. Autor para correspondência

<sup>2</sup>Engenheiro Agrônomo, MSc., doutorando no Curso de Agronomia da UFPEL. Bolsista da CAPES.

<sup>3</sup>Engenheiro Agrônomo, Mestrando no Curso de Agronomia da UFPEL. Bolsista do CNPq.

<sup>4</sup>Engenheiro Agrônomo, Doutor, Pesquisador da EMBRAPA/CPACT, Pelotas - RS.

Atualmente, os porta-enxertos mais utilizados são os do tipo anão e semi-anão. O porta-enxerto semi-anão MM 111 não apresenta rebrotos, resiste ao pulgão lanígero e à seca, por possuir um amplo sistema radicular e adaptar-se a solos de diferentes texturas (DENARDI, 1986).

A micropropagação comercial de frutíferas incrementou-se a partir da década de 70. Os procedimentos foram desenvolvidos para diversas espécies, inclusive para a macieira, a mais pesquisada neste campo. Este processo possibilita a obtenção de porta-enxertos e também de cultivares comerciais já enraizados, evitando problemas de incompatibilidade da enxertia e de disseminação de vírus e outros patógenos durante a propagação (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

Para a maioria das espécies lenhosas, o enraizamento é a etapa mais difícil, principalmente, quando se usa material menos jovem. A formação de raízes adventícias permite obter plantas para posterior aclimação às condições de casa de vegetação (HU & WANG, 1983). Além disso, os fatores genéticos da espécie/cultivar afetam o processo (MULLINS 1985) e, no enraizamento *in vitro* de macieiras, o ácido indolbutírico (AIB) pode influir de forma decisiva (WERNER & BOE, 1980).

A respeito dos meios de cultivo, a solidificação ou semi-solidificação é dependente da concentração de ágar utilizada, do pH, da concentração de sais e da presença de substâncias que interferem na gelatinização, como o carvão ativado (CALDAS *et al.*, 1990). Sabe-se que o ágar é um dos ingredientes mais caros do meio, pela quantidade utilizada, sendo de difícil substituição. Visando a reduzir o custo de produção têm-se testado substitutos para o ágar, como amido de milho ou de mandioca e sacarose. Estes têm apresentado interessantes resultados, principalmente na fase de enraizamento (FORTES *et al.*, 1994 e FERRI & NACHTIGALL, 1996). O amido, entre os polissacarídeos, é a substância de maior importância fisiológica, abundantemente encontrado na natureza, de fácil obtenção e de baixo custo.

Dentro desse contexto, testou-se a ação do ágar e da sua substituição parcial pelo amido de mandioca, na composição do meio MS, no enraizamento do porta-enxerto de macieira MM 111, bem como concentrações do AIB nos meios de cultivo.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os explantes que provieram de brotações do porta-enxerto de macieira MM 111, obtidas da casa de vegetação do Setor de Cultura de Tecidos da EMBRAPA/CPACT, com três pares de folhas (20 a

25mm), foram inoculados em tubos de ensaio (150 x 20mm), contendo 10ml de meio de cultivo, com as concentrações de 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 $\mu$ M de ácido indolbutírico (AIB). Os dois agentes solidificantes (AS) de meio de cultivo testados foram: AS<sub>1</sub> - composto por 6g/l de ágar, e AS<sub>2</sub> - composto pela combinação de 3g/l de ágar mais 50g/l de amido de mandioca (fécula de mandioca).

Para os meios utilizaram-se, também, sais de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), reduzidos à metade, acrescidos de vitaminas, 100mg/l de mioinositol e 30g/l de sacarose. O pH foi ajustado para 5,9 antes da autoclavagem. Após a inoculação, os tubos, com um explante cada, foram transferidos para sala de crescimento sob condições de 25  $\pm$  2°C, 16 horas de fotoperíodo e intensidade luminosa de  $\pm$  2000 lux, onde permaneceram por um período de 30 dias. O experimento fatorial (5 doses de AIB x 2 tipos de AS) foi conduzido seguindo o delineamento de blocos ao acaso com nove repetições. A unidade experimental constou de um tubo com um explante.

As variáveis observadas foram número de raízes, percentagem de enraizamento, comprimento das raízes e intensidade de formação de calo na base das brotações. A esta última, atribuíram-se notas de 0 a 3, sendo 0 = ausência, 1 = pouca, 2 = média e 3 = alta intensidade de calo.

Os resultados foram submetidos à análise de variância. Para comparação das médias, usou-se o teste de Duncan ( $\alpha = 0,05$ ), e a regressão polinomial para verificar o comportamento das variáveis em relação às concentrações testadas. Os dados de percentagem de enraizamento foram transformados em arco-seno, os dados de número de raízes e comprimento de raízes em  $\sqrt{x + 1}$  e, os dados da intensidade de calo, em logaritmo. As equações relacionam-se com os dados transformados, porém, todas as discussões foram feitas em função dos dados originais.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

As concentrações de AIB influenciaram as variáveis número de raízes, percentagem de enraizamento, comprimento das raízes e intensidade de calo. Entretanto, os agentes solidificantes (AS<sub>1</sub> e AS<sub>2</sub>) influenciaram as variáveis número de raízes, comprimento de raízes e intensidade de calo. As interações de AS com AIB foram significativas para todas as variáveis, exceto na intensidade de calo.

O número de raízes foi influenciado pelo tipo de AS e pelas concentrações de AIB. As curvas de regressão polinomial para esta variável encontram-se na Figura 1. O número de raízes apresentou

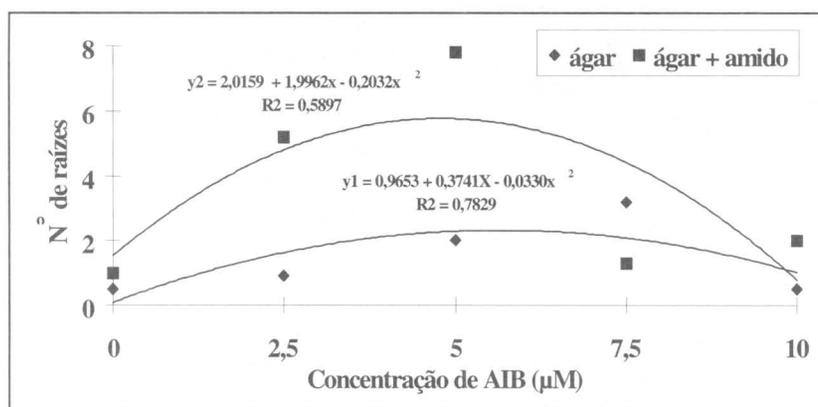


Figura 1 - Comportamento do número de raízes em função das concentrações do ácido indolbutírico, do porta-enxerto de macieira MM 111, para ágar (y1) e para ágar mais amido (y2).

um comportamento quadrático, em ambos os AS, atingindo os pontos de máximo (6 raízes/explante) nas combinações de AS<sub>2</sub> com 5,7µM de AIB e, AS<sub>1</sub> com 4,9µM de AIB (3,5 raízes/explante). Segundo DEBERGH (1987), estes resultados podem ser atribuídos às condições do meio, resultantes da interação entre material vegetal, recipiente de cultivo e condições da sala de cultivo, que proporcionam grande influência sobre o sistema de cultivo de tecido.

A resposta das concentrações de AIB, em relação à percentagem de enraizamento, encontra-se na Figura 2. O ponto de máximo enraizamento (89%) ocorreu na concentração de 5,7µM de AIB, no AS<sub>2</sub> e, 5,1µM de AIB (80%), no AS<sub>1</sub>. Estes resultados são bastante próximos aos encontrados por CORRÊA (1990), que ao utilizar 1,0mg/l de AIB obteve aproximadamente 100% e 84% de enraizamento para os porta-enxertos M 7 e M 793, respecti-

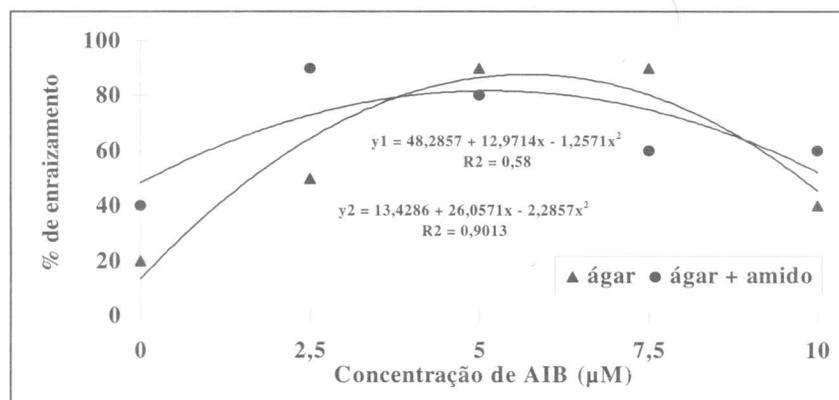


Figura 2 - Comportamento da percentagem de enraizamento em função das concentrações do ácido indolbutírico, para o porta-enxerto de macieira MM111, para ágar (y1) e para ágar mais amido (y2).

vamente. Já WERNER & BOE (1980), para obterem um enraizamento satisfatório no porta-enxerto M 7 (88%), necessitaram utilizar concentrações superiores a 1,0mg/l de AIB, demonstrando haver diferenças de sensibilidade à auxina entre genótipos, pois ocorreram resultados significativos na ausência de AIB.

Os resultados obtidos são concordantes com os relatos de ZIMMERMAN & BROOME, (1981) que, na ausência ou em baixas concentrações de AIB (0,1mg/l), a promoção do enraizamento de muitas cultivares de macieira foi ineficaz. No entanto, com o incremento de AIB,

houve uma melhora no desenvolvimento do sistema radicular. OCHATT & CASO (1983) conseguiram o enraizamento de diferentes cultivares de macieira usando de 1 a 3mg/l de AIB, não obtendo respostas positivas na ausência deste regulador.

O comprimento das raízes também foi afetado pelas concentrações do AIB, sendo que em ambos os AS esta variável apresentou uma curva ascendente com um ponto de máximo para o AS<sub>1</sub> (8,7mm), na concentração de 5,0µM de AIB. O AS<sub>2</sub> estabeleceu seu ponto de máximo rendimento (14,8mm) na presença de 4,7µM de AIB (Figura 3). Segundo MARGARA (1988), a auxina possui papel central no desencadeamento hormonal da rizogênese, sendo considerada um fator primordial no processo de enraizamento de estacas de plantas lenhosas, que contêm nas próprias células do caule, os locais potenciais para a formação de raízes adventícias.

O comportamento do AIB sobre a intensidade de calo, foi semelhante nos dois AS testados (Figura 4). Segundo WELANDER (1983), a composição dos elementos minerais afeta a formação de calo no enraizamento.

Para FACHINELLO *et al.* (1994), o aumento da concentração de auxinas provoca um efeito estimulador de raízes até um certo valor, a partir do qual esta tem efeito inibitório; a concentração adequada depende da espécie e do teor da auxina. GRATTAPAGLIA & MACHADO (1990) salientam que quan-

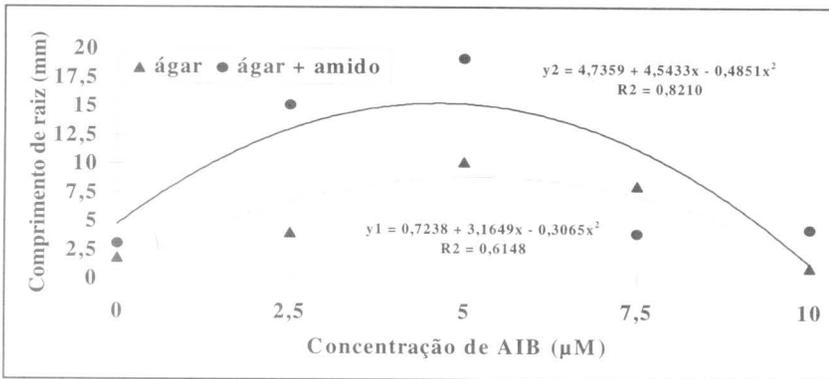


Figura 3 - Comportamento do comprimento de raízes em função das concentrações do ácido indolbutírico, para o porta-enxerto de macieira MM111, para ágar (y1) e para ágar mais amido (y2).

tidades excessivas de auxina estimulam a produção de calo.

O uso de AS<sub>2</sub> não diferiu na consistência do meio em relação ao AS<sub>1</sub>. A diferença se fez apenas pela transparência, que foi menor no AS<sub>2</sub>, porém, isto não impediu a indução dos explantes e o subsequente desenvolvimento radicular. Além disso, este permaneceu bastante consistente, levando-se a deduzir que o porta-enxerto MM 111 não tenha liberado amilase, um composto que degradaria o amido. Os resultados obtidos sinalizam para futuros trabalhos com estes agentes solidificantes de meio de cultivo *in vitro*.

## CONCLUSÕES

No processo de enraizamento *in vitro* de microestacas do porta-enxerto de macieiras MM 111, o uso de agente solidificante composto por ágar

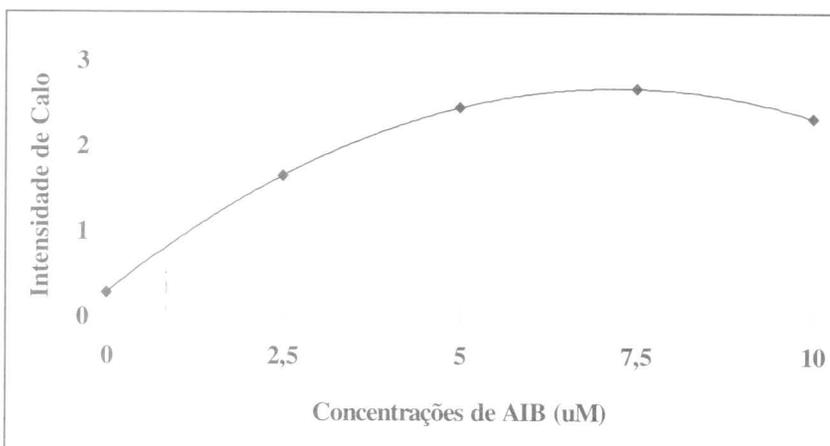


Figura 4 - Comportamento da intensidade de calo na base dos explantes do porta-enxerto de macieira MM111, nas diversas concentrações de ácido indolbutírico (Notas de intensidade de calo: 0 = ausência, 1 = pouca, 2 = média e 3 = alta).

mais amido apresenta maior número de raízes por microestacas, maior comprimento de raízes, maior intensidade de calo; e antecipa em cerca de 10 dias o surgimento das raízes. A concentração de 5,0µM de ácido indolbutírico é a mais eficiente no enraizamento dessas microestacas.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos a EMBRAPA/CPACT, Pelotas-RS, em especial aos funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos, pelo apoio prestado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPM - Associação brasileira de produtores de maçã. *Jornal da fruta*, Vacaria, abril, 1997. p. 5.
- CALDAS, L.S., PADMAJA, H., FERREIRA, M.E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S. ed. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ABCTP-EMBRAPA/CNPq, 1990. p. 37-70.
- CORRÊA, D.M. Enraizamento *in vitro* de porta-enxerto de macieira (*Malus domestica*, Borkh.): Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1990, 50 p. (Tese de Mestrado do Curso de Pós-graduação em Agronomia).
- DEBERGH, P.C. Improving mass of *in vitro* plantlets. In: ORGANIZING COMMITTEE OF INTERNATIONAL SYMPOSIUM HIGH TECHNOLOGY IN PROTECTED CULTIVATION, 1987, Tokio. Horticulture in *Anais* Tokio: High Technological Era Special Lectures, Tokio, 1987. p. 47-57.
- DENARDI, F. *Manual da cultura da macieira: porta-enxertos*. Florianópolis: EMPASC, 1996. p. 92-132.

FACHINELLO, J.C., HOFFMANN, A., NACHTIGAL, J.C., *et al.* *Propagação de plantas frutíferas de clima temperado*. Pelotas: UFPel, 1994, 179 p.

FACHINELLO, J.C., LUCCHESI, A.A., GUTIERREZ, L.E. Influência do anelamento na nutrição e no enraizamento de estacas lenhosas do porta-enxerto 'Malling-Merton 106'. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 23, n. 9, p. 1025-1031, 1988.

FERRI, V.C., NACHTIGALL, G.R. Influência da sacarose e do ágar na cultura *in vitro* do clone de pereira Decaisne-6. In: *VIII CONGRESSO LATINOAMERICANO DE HORTICULTURA*, Associação Latinoamericana de Horticultura, Montevideo. p. 6, 1996.

- FORTES, G.R.de L., CONCEIÇÃO, A.M., ZANOL, G. Uso do amido comercial como meio solidificante para enraizamento "in vitro" de morangueiro (*Fragaria x ananassa*). In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 13, Associação Brasileira de Fruticultura, Salvador. p. 1113-1114, 1994.
- 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, 1990. p. 99-169.
- HU, C.Y., WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D.A. *et al.* **Handbook of Plant Cell Cultures**. New York: Macmillan, 1983, v. 1, p. 177-227.
- MARGARA, J. **Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro**. Madrid: Mundi-Prensa, 1988. p. 171-197.
- MULLINS, M. Regulation of adventitious root formation in microcuttings. **Acta Hort**, New York, 166: 53-61, 1985.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- OCHATT, S.J., CASO, O.M. *In vitro* meristem of M4 apple (*Malus pumila* Mill.) I. Optimal nutrient medium. **Plant Cell Organ Culture**, New York, v. 2. p. 39-48, 1983.
- WELANDER, M. *In vitro* rooting of the apple rootstock M-26 in adult and juvenile growth phases and acclimatization of the plantlets. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 58, n. 3, p. 231-238, 1983.
- WERNER, E.M., BOE, A.A. *In vitro* propagation of Malling 7 apple rootstock. **Hort.Science**, Alexandria, v. 15, n. 4, p. 509-510, 1980.
- ZIMMERMAN, R.H., BROOME, O.C. Phloroglucinol and *in vitro* apple cultivars cuttings. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 106, n. 5, p. 648-652, 1981.