

CALOGÊNESE DE TECIDO FOLIAR DE PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA M.7 (*MALUS* sp.) INDUZIDA POR BAP E CPPU¹

CARLOS ROBERTO MARTINS², PAULO H. G. SCZEPANSKI², PAULA SIQUEIRA BACHETTINI³, ROSILENE BARBOSA DE FRANÇA⁴, GERSON RENAN DE LEVES FORTES⁵

RESUMO - O trabalho foi conduzido com o objetivo de estudar a organogênese de macieira (*Malus* sp), após a obtenção de calo por meio de explantes de folhas do porta-enxerto M.7 multiplicado *in vitro*. O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado, utilizando folhas com a superfície abaxial e adaxial em contato com o meio, com ou sem escarificação; associados às citocininas Benzilaminopurina (BAP) e Forchlorfenuron (CPPU) na concentração de 5mM. Utilizou-se o meio básico MS acrescido de sacarose (30 g.L⁻¹), mio-inositol (100 mg.L⁻¹) e ágar (6 g.L⁻¹), além do regulador de crescimento Ácido Naftalenoacético (ANA 0,5mM). Os tratamentos permaneceram por três semanas no escuro sob temperatura ambiente, o que propiciou 100% de formação de calos, sendo em seguida submetidos a fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 20 mE.m⁻².s⁻¹ e temperatura de 25 ± 2°C. Os explantes escarificados proporcionaram maior intensidade de calo do que a utilização de explantes intatos. Explantes escarificados com a superfície abaxial em contato com o meio proporcionaram maior intensidade de calo, independentemente de o meio conter BAP ou CPPU. O uso da escarificação, associado ao CPPU, promoveu uma maior intensidade de calo, independentemente da superfície do disco foliar. A superior regeneração de calos foi alcançada em condição de superfície abaxial do disco foliar associado ao CPPU. Portanto, o uso de explantes escarificados com a superfície abaxial em contato com o meio proporcionou aumento da intensidade de calo. O uso do explante escarificado em meio contendo CPPU proporcionou maior intensidade de calo, independentemente da superfície do disco foliar em contato com o meio.

Termos de Indexação: *In Vitro*, Cultura de Tecidos, Explante.

LEAF TISSUE CALLOGENESIS OF APPLE (*Malus* sp.) ROOTSTOCK CV. M.7 INDUCED BY BAP AND CPPU

ABSTRACT – This work was carried out in order to study the apple (*Malus* sp.) organogenesis after callus formation in M.7 apple rootstock leaf explants multiplied *in vitro*. The experiment was carried out in the Tissue Culture Laboratory at Embrapa Temperate Climate by using abaxial and adaxial leaves touching the culture media, with or without scarification associated with benzylaminopurine (BAP) and forchlorphenuron (CPPU) at 5mM. The MS basal medium used was added to sucrose (30 gL⁻¹), myo-inositol (100mgL⁻¹) and agar (6gL⁻¹). It was also added naphthalene acetic acid (NAA) at 0.5 mM. The treatments remained in darkness for three weeks under room temperature and this led to 100% callus formation and then the material was subjected to 16 hour photoperiod with light intensity of 20 mE.m⁻².s⁻¹ and temperature of 25 ± 2°C. The use of scarification associated with CPPU promoted the highest callus intensity independently of the leaf disc surface. Higher callus regeneration was achieved under abaxial surface leaf disks associated with CPPU. So, the use of scarifical explants with the abaxial surface touching the medium led to an increase in callus intensity. The use of scarification and medium containing CPPU, led to the formation of higher callus intensity independently of the leaf disk surface touching the medis.

Index terms: *In vitro*, Culture tissue, explant.

A calogênese em macieira já foi estudada, utilizando-se de diferentes reguladores de crescimento no meio de cultura como 2,4-D, BAP (Quorin e Peters, 1990) e TDZ (Faria, 1996). Para a cultura *in vitro* da macieira, a organogênese depende da origem do explante (Collet & Lê, 1987), podendo ser oriundo de pecíolo, lâmina foliar, entre outros (Arena & Pastur, 1995). Ferradini *et al.* (1996) utilizaram a superfície abaxial de folhas

escarificadas, em contato com o meio de cultura, e obtiveram bons resultados de calogênese com uso de BAP. Nieuwkerk *et al.* (1986) relatam o uso de forchlorfenuron (CPPU) na multiplicação de brotos de macieira, em concentrações bem inferiores ao BAP, sendo que Liu *et al.* (1994), cultivando calos de macieira cv. Fuji em meio contendo CPPU, obtiveram 60 % de regeneração.

1 (Trabalho 103/2000). Recebido: 19/06/2000. Aceito para publicação: 20/09/2001.

2 Engº Agrº Mestrando em Fruticultura de Clima Temperado, Pós graduação em Agronomia, FAEM, UFPel, Pelotas, RS, e-mail marticar@ufpel.tche.br.

3 Bióloga mestranda em Fisiologia Vegetal, UFPel

4 Engª Agrª mestranda em Fisiologia Vegetal, UFPel

5 Engº Agrº Dr. Pesquisador Embrapa Clima Temperado cx postal 403, 96001-970, Pelotas rs e-mail gerson@cpcact.embrapa.br

O presente trabalho tem o objetivo de verificar o desempenho de discos foliares sob ação de CPPU e BAP, em função da superfície da lâmina foliar (abaxial e adaxial), assim como a utilização da folha intata e escarificada, na calogênese e posterior organogênese do porta-enxerto de macieira M.7.

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS. Utilizaram-se frascos de 250 ml com 40 ml de meio, composto por sais e vitaminas de MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 0,5 mM de ácido naftaleno acético (ANA), 5 mM de BAP ou CPPU (conforme o tratamento) e 6 g.L⁻¹ de ágar, adicionado após a correção do pH a 5,9. Foram utilizados discos foliares da região apical do porta-enxerto de macieira M.7, provenientes de cultivo *in vitro*. O explantes intatos ou escarificados foram inoculados no meio de cultura com as superfícies abaxial ou adaxial em contato com estes. O material inoculado permaneceu por três semanas no escuro, sendo após mantido em sala de crescimento com intensidade luminosa de 20 mME.m⁻².s⁻¹, à temperatura de 25 ± 2°C, com fotoperíodo de 16 horas. Ao final do período de cultivo (60 dias), avaliaram-se a percentagem e a intensidade do calo formado, onde se atribuíram notas de 1 a 4 (1 - não formou calo; 2 - calo pequeno; 3 - calo médio; e 4 - calo grande), número de brotações e gemas adventícias.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com oito repetições, seguindo um esquema fatorial 2x2x2 (folha x escarificação x citocinina). Antes de realizar a análise estatística, os dados dos parâmetros avaliados sofreram as seguintes transformações: arco-seno raiz de x/100, onde x é o valor percentual e log (x+1), sendo o x nota atribuída aos calos. Houve 100 % de formação de calo para todos os tratamentos após três semanas de escuro. Ao contrário do citado por Faria (1996), que concluiu em seu trabalho que explantes de macieira cv. Marubakaido não foram influenciados pelo período de escuro. Sriskanparajah et al. (1994) somente conseguiram induzir calogênese, para posterior organogênese, quando explantes foram submetidos a um período de escuro. Durhan et al. (1994) alcançaram 92% de regeneração no porta-enxerto M.7A, quando os explantes foram cultivados por quatro semanas no escuro.

Observou-se que o uso da escarificação promoveu um aumento significativo da intensidade de calo em relação ao disco foliar intato (Figura 1). Este resultado está de acordo com a citação de Pierik (1990) e de Faria (1996), os quais observaram que a intensidade de calo foi maior utilizando folhas escarificadas. Segundo Pierik (1990), a superfície lesionada aumenta a possibilidade de absorção de nutrientes e reguladores, permitindo a obtenção de bons resultados na organogênese. Quando os explantes foram escarificados, a utilização do CPPU promoveu uma maior intensidade de calo (3,09) em relação ao BAP (2,28), sendo utilizada a superfície adaxial do disco foliar. Hedtrich & Hedtrich (1990), trabalhando com o mesmo tipo de explante com a superfície adaxial, verificaram que o TDZ, na concentração de 0,2 mg.L⁻¹ (pertencente ao grupo das feniluréias, o mesmo do CPPU), e o BAP (5 mg.L⁻¹) tiveram efeitos semelhantes na regeneração. Na superfície abaxial, entretanto, não foi verificada diferença significativa (Figura 2).

Este resultado demonstra que, quando se utilizam explantes escarificados na superfície abaxial, a intensidade de calo independe da citocinina utilizada (BAP e CPPU). Rusik et al.

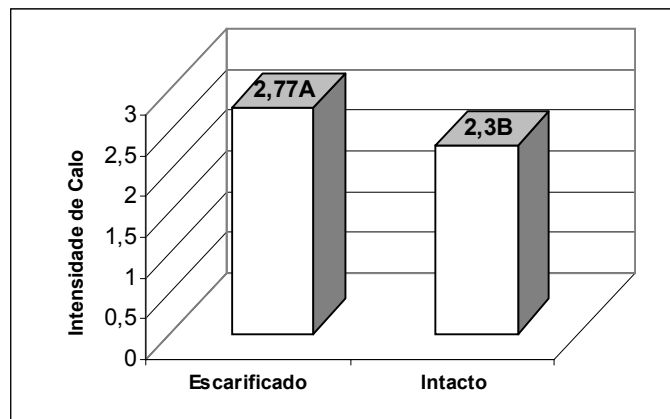


FIGURA 1 - Intensidade de calo formado em explantes escarificados e intatos do porta-enxerto de macieira M.7. Embrapa de Clima Temperado, Pelotas-RS, 1999. (Letras iguais não diferem pelo Teste de Duncan para $\alpha = 0,05$).

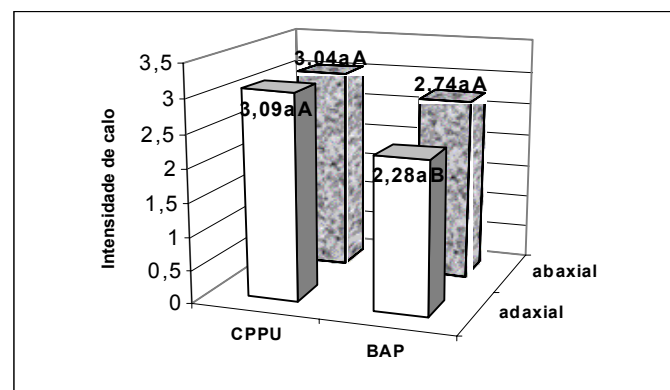


FIGURA 2 - Intensidade de calo formado em superfícies adaxial e abaxial de explante foliar escarificado com a utilização de BAP e CPPU. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS 1999. (Letras iguais não diferem pelo Teste de Duncan para $\alpha = 0,05$, sendo as comparações entre as letras minúsculas feitas para as superfícies foliares e maiúscula feitas entre as citocininas)

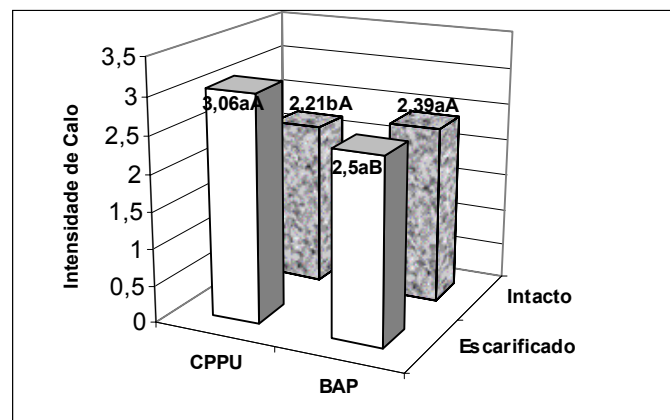


FIGURA 3 - Intensidade de calo formado em explantes foliares escarificados ou intatos com a utilização de BAP e CPPU. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 1999. (Letras iguais não diferem pelo Teste de Duncan para $\alpha = 0,05$, sendo as comparações entre as letras minúsculas feitas para as explantes escarificados ou intatos e maiúscula feitas entre as citocininas).

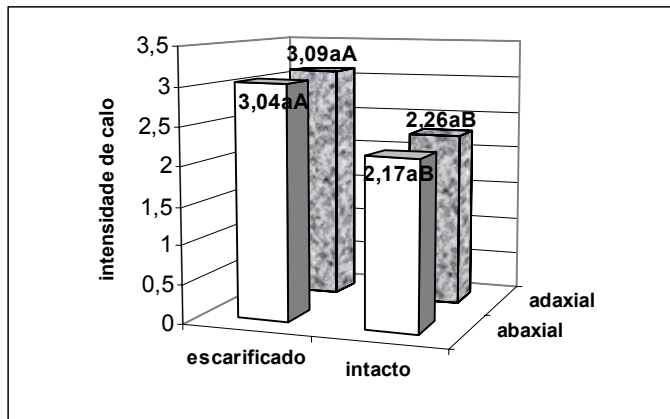


FIGURA 4 – Intensidade de calo formado com CPPU em superfícies adaxial e abaxial, utilizando explante foliar escarificado ou intato. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 1999. (Letras iguais não diferem pelo Teste de Duncan para $\alpha = 0,05$, sendo as comparações entre as letras minúsculas feitas para as superfícies foliáreas e maiúsculas feitas entre escarificado e intato).

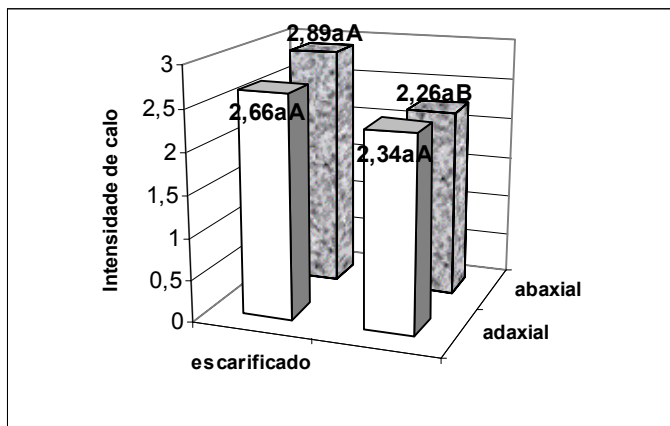


FIGURA 5 – Intensidade de calo formado em superfícies adaxial e abaxial com utilização de explante foliar escarificado ou intato. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 1999. (Letras iguais não diferem pelo Teste de Duncan para $\alpha = 0,05$, sendo as comparações entre as letras minúsculas feitas para as superfícies foliáreas e maiúscula feitas entre a escarificação ou não)

(1991), expondo explantes foliáres com a superfície adaxial em contato com o meio, por um período de cinco dias de escuro, obtiveram bons resultados na formação de calos em cerejeira cv. Sumadinka.

O CPPU é mais responsivo para intensidade de calo do que o BAP quando se escarificam os explantes, não ocorrendo o mesmo com folhas intatas (Figura 3). Nezi et al. (1999) observaram que, durante o período de escuro, tanto o BAP como o CPPU induziram as maiores percentagens de formação de calos grandes na concentração de 13mM. Quando se utilizou CPPU, independentemente da superfície do disco foliar em contato com o meio de cultura, houve diferença significativa quanto à intensidade de calo quando realizada a escarificação (Figura 4).

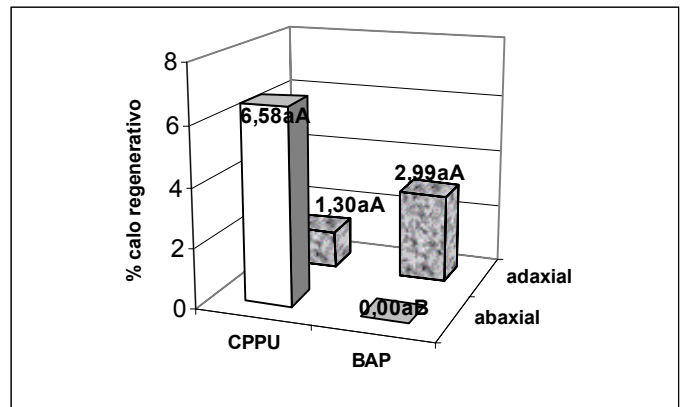


FIGURA 6 – Percentagem de calo regenerativo em superfícies adaxial e abaxial de explante foliar com a utilização de BAP e CPPU. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 1999. (Letras iguais não diferem pelo Teste de Duncan para $\alpha = 0,05$, sendo as comparações entre as letras minúsculas feitas para as superfícies foliáreas e maiúsculas feitas entre as citocininas).

Segundo Ohya & Oka (1982), em hipocótilo de amoreira (*Morus* sp.), o CPPU estimulou maior regeneração quando comparado com BA. Para Caboni et al. (1996), somente explantes com a superfície adaxial em contato com o meio mostraram regeneração.

A intensidade de calo é maior quando utilizada a superfície abaxial do disco foliar com a escarificação das folhas, o que não ocorre com a utilização da superfície adaxial (Figura 5). Ferradini et al. (1996) utilizaram o mesmo tipo de explantes e obtiveram bons resultados na calogênese. Segundo Bartish & Korkoroi (1997), utilizando a superfície abaxial em contato com o meio, foi mais efetiva na formação de brotos. Ao contrário de Caboni et al. (1996), em que somente explantes com a superfície adaxial em contato com o meio mostraram regeneração.

A maior percentagem de calo regenerativo foi obtido com CPPU para a superfície abaxial, quando comparado com BAP. Dantas (1999) obteve o mesmo resultado em porta-enxerto de macieira M.7, utilizando disco foliar escarificado com a superfície abaxial em contato com o meio.

Não houve resposta do BAP para esta superfície, não havendo formação de calo regenerativo. O mesmo resultado não se verificou quando a superfície adaxial do disco foliar estava em contato com o meio (Figura 6). Entretanto, com a utilização de CPPU, não apresentou diferença significativa entre ambas as superfícies do disco foliar, devido ao alto coeficiente de variação encontrado. Para as variáveis número de brotação e gemas adventícias, não se verificou diferença significativa entre os tratamentos.

O período em que transcorreu o desenvolvimento deste trabalho, não foi suficiente para ocorrer a regeneração do material.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARENA, M.E.; PASTUR, G.J.M. Regeneracion de brotes adventiuos de Ribes Magellanicum a partir de explantos floriáres cultivados *in vitro*. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 2., 1995, Puerto Iguazu: **Resumos...** 1995. p.A-6.

- BARTISH, V.I.; KORKHOROI, V.I. The composition of nutrient medium and the efficiency of shoot induction *in vitro* from apple leaf explants. Russian. **Journal of Plant Physiology**. Stuttgart, v. 44, n. 3, p. 381-385, 1997.
- CABONI, E.; TONELLI, M.; FALASCA, G.; DAMIANO, C. Factors affecting adventitious shoot regeneration *in vitro* in the apple rootstock "Jork 9". **Advances Horticultural Science**, Calcutta, v.10, n. 3, p.146-150, 1996.
- COLLET, G.F.; LÊ, L.C. Micropropagation de porte-graffes de pommier et de poirier. I Établissement et multiplication *in vitro* de *Pyrus malus* L. (M.25, M.26, M.27, M.116, M.9 type York) et de *Cydonia oblonga* Mill (A.). **Review Suisse de Viticulture d'Arboriculture et d'Horticulture**, v. 19, n. 4, p. 252-259, 1987.
- DANTAS, A.C.M. **Regeneração e obtenção de porta-enxertos de macieira (*Malus sp.*) tolerantes ao alumínio através da variação somaclonal *in vitro***. 1999. 105 f. Dissertação (Mestrado Fruticultura de Clima Temperado) FAEM/UFPel, Pelotas, 1999.
- DURHAM, R.E.; KORBAN, S.S.; SCHMIDT, H.; KELLERHALS, M. Effects of explant size, pretreatment and light intensity on shoot regeneration from *in vitro*-grown apple leaves. Progress in Temperate Fruit Breeding. In: EUCARPIA FRUIT BREEDING SECTION MEETING, 1993, Switserland. **Proceedings...** Switserland: wadenswil-Einsiedeln, v. 1. p. 355-359, 1994.
- FARIA, J.T.C. **Calogênese e organogênese *in vitro* de porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido (*Malus prunifolia* Willd, Borkh.)**. 1996. Dissertação(Mestrado em Fruticultura de Clima Temperado) – Universidade Federal de Viçosa, Pelotas, 1996.
- FERRADINI, N.; FAMIANIE, F.; PROIETTI, P.; STANICA, F. Influence of growth regulators and light on *in vitro* shoot regeneration in M.26 apple roostock. **Journal of Horticultural Science**. Ashford, v. 71, n. 6, p. 859-865, 1996.
- HEDTRICH, C.T.; HEDTRICH, R.T. Influence of TDZ and BA on adventitious shoot regeneration from apple leaves. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 280, p.195-199, 1990.
- LIU, M.G.; OGIWARA, I.; HAKODA, N.; SHIMURA, I. Effect of BA, TDZ and CPPU on formation of adventitious shoot from callus derived from apple cotyledon. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Sakyo-Ku, v. 63, n. 3, p. 505-514, 1994.
- MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v 15, p. 473-457, 1962
- NEZI, A.N.; FORTES, G.R.deL.; DANTAS, A.C.M.; SILVA, J.B. Efeito do BAP, TDZ e CPPU sobre a calogênese dos porta-enxertos de macieira M.7 e M.111 após período de escuro. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. Brasília, v. 11, n. 7, 1999. Suplemento.
- NIEUWKERK, J.P.; ZIMMERMAN, R.H; FORDHAM, I. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v. 21, n. 3, p. 516-518. 1986.
- OHYAMA, K.; OKA, S. Multiple shoot formation from mulberry (*Malus alba* L.) hypocotyls by N-(2-chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea. In: **Congress Plant Tissue Cell Cult**, 5., Proceedings... p. 149-150.
- PIERIK, R.L.M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madri: Mundi-Prensa, 1990. 326p.
- QUOIRIN, M.; PETERS, J.A. Plantlet regeneration from callus of apple tree rootstock cv. Marubakaido. **International congress on plant tissue and cell culture**, Amsterdam, n.7, p. 127, 1990.
- RUSIK, D.; CEROVIC, R.; BOSKOVIC, R. The assessment of somaclonal variation in sour cherry cv. Sumadinka regenerated from leaf explants. **Fruit Science Reports**, Skiemiewice, v. 18, n. 4, p. 155-162, 1991.
- SRISKANDARAJAH, S.; GOODWIN, P.B.; SPEIRS, J. Transformação genética do enxerto de maçã, cultivar "Delicious" via "Agrobacterium tumefaciens". **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Dordiecht, v. 36, n. 3, p. 317-329, 1994.