

INDUÇÃO DE BROTAÇÕES EM GEMA APICAL E AXILAR DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA 'EM-9' CULTIVADAS *IN VITRO*¹

MÁRCIA WULFF SCHUCH², ALAN CRISTIANO ERIG³, LUCIANE COUTO DA SILVA⁴

RESUMO - O trabalho objetivou comparar dois tipos de explantes (gema apical e gema axilar) do porta-enxerto de macieira 'EM-9' e o tempo de permanência destes explantes no meio de cultura de indução (20, 30 e 40 dias), na capacidade de regeneração *in vitro* de brotações. O meio de cultura de indução de regeneração constituiu-se dos sais de MS, suplementado com mio-inositol (100 mg.L⁻¹), sacarose (30 g.L⁻¹), ágar (6,0 g.L⁻¹), BAP (4,44 µM) e ANA (0,54 µM). Transcorrido o tempo de permanência no meio de cultura de indução de regeneração, os explantes foram transferidos para meio de cultura de multiplicação, de constituição semelhante ao meio de indução, porém sem a presença de auxina. A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que as gemas apicais e axilares do porta-enxerto de macieira 'EM-9', não diferem quanto à capacidade de regeneração *in vitro* de brotações e, o tempo de permanência das gemas no meio de indução de regeneração, apenas mostrou diferenças para o comprimento médio das brotações, obtendo-se o maior valor com 30 dias.

Termos para indexação: cultura de tecidos, organogênese, *Malus* sp.

SHOOTS INDUCTION IN APICAL AND AXILLARY BUDS OF THE APPLE ROOTSTOCK 'EM-9' CULTIVATED *IN VITRO*

ABSTRACT - The aim of this study was to compare two explants types (apical and axillary buds) of apple rootstock 'EM-9' and, their incubation period on induction medium (20, 30 and 40 days), in the capacity of *in vitro* regeneration of shoots. The induction medium was MS, supplemented with myo-inositol (100 mg.L⁻¹), sucrose (30 g.L⁻¹), agar (6.0 g.L⁻¹), BAP (4.44 µM) and NAA (0.54 µM). Elapsed the time of permanence in the induction medium, the explants were transferred to multiplication medium without auxin. It was concluded that apical and axillary buds of the rootstock 'EM-9', did not differ in *in vitro* regeneration of shoots and, the incubation period of buds on regeneration induction medium, only shown differences for the average length of shoots, the highest value was obtained in 30 days.

Index terms: tissue culture; organogenesis, *Malus* sp.

A série 'EM' de porta-enxertos de macieira foi desenvolvida pela 'East Malling Research Station', Inglaterra, onde se inclui, entre os anos, o 'EM-9' (Wilkins & Dodds, 1983). A utilização de porta-enxerto de macieira tem sido a principal técnica de cultivo utilizada para o controle do crescimento da planta (Ferree, 1987).

Em relação à utilização de porta-enxertos clonais da série 'EM', projetos de melhoramento genético são realizados, buscando a imunidade ao pulgão lanígero, ausência de rebrotamento do colo, facilidade de propagação, resistência a doenças, adaptação a solos ácidos ou alcalinos, boa capacidade de absorção de nutrientes, entre outros (Denardi, 1986; 1998).

A disponibilidade de um protocolo eficiente para a regeneração de plantas pela formação de brotações é um pré-requisito para a aplicação da engenharia genética (Horsch et al., 1985), que permite a alteração de poucas características nas cultivares superiores, e acelera consideravelmente a obtenção de genótipos melhorados em espécies frutíferas lenhosas (Caboni et al., 2000).

A transformação de plantas depende de dois requerimentos essenciais, a habilidade para introduzir um gene desejável de forma estável dentro do genoma da planta e a habilidade para regenerar uma planta fértil a partir das células transformadas (De Bondt et al., 1994).

A regeneração *in vitro* está fundamentada na totipotência das células das plantas. Isto significa que as células são autônomas e têm a potencialidade de regenerar plantas, desde que submetidas a tratamentos adequados (Kerbaudy, 1999). Mesmo aceitando-se em princípio este dogma, é bem conhecido o fato de certos tecidos serem mais favoráveis à regeneração do que outros. A regeneração *in vitro* a partir de explantes maduros foi conseguida em diversas espécies frutíferas (Leblay et al., 1991). Meristemas também têm sido utilizados para a transformação e regeneração em espécies frutíferas lenhosas (Druart et al., 1998).

O trabalho objetivou comparar dois tipos de explantes e o tempo de permanência destes no meio de cultura de indução, na capacidade de

regeneração *in vitro* de brotações do porta-enxerto de macieira 'EM-9'.

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos de Plantas, Departamento de Botânica, do Instituto de Biologia da UFPel, RS. Gemas apicais e axilares do porta-enxerto de macieira 'EM-9', excisadas isoladamente de brotações de plantas cultivadas *in vitro* durante 30 dias, foram utilizadas como explantes.

Os tratamentos consistiram de uma combinação bifatorial completa (2x3), representado por dois tipos de explantes (gema apical e axilar) e três tempos de permanência dos explantes no meio de cultura de indução de regeneração (20, 30 e 40 dias).

O meio de cultura de indução constituiu-se de sais de Murashige & Skoog (1962) - MS, suplementado com mio-inositol (100 mg.L⁻¹), sacarose (30 g.L⁻¹), ágar (6,0 g.L⁻¹), BAP (4,44 µM) e ANA (0,54 µM). Transcorrido o tempo de permanência no meio de cultura de indução, de acordo com o tratamento, os explantes foram transferidos para o meio de multiplicação, de constituição semelhante ao meio de indução, porém sem a presença da auxina.

Foram utilizadas placas de Petri (90X15 mm), estéreis e descartáveis, para o meio de cultura de indução, com 30 ml de meio. Para o meio de cultura de multiplicação, foram utilizados frascos de 250 ml com 30 ml de meio de cultura. O pH de ambos os meios foi ajustado para 5,9, antes da inclusão do ágar, autoclavado a 121°C e 1,5 atm, por 15 minutos.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos no escuro, durante duas semanas, à temperatura de 25±2°C. Em seguida foram transferidos para a sala de crescimento, com 16 horas de fotoperíodo, à temperatura de 25±2°C, com densidade de fluxo de fótons do período de luz de 42 µmol.m⁻².s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes branca-frias.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento, e cinco explantes por placa. Trinta dias após a transferência dos explantes para o meio de multiplicação avaliou-se a percentagem de explantes regenerados, o

¹ (Trabalho 039/2003). Recebido: 04/01/2003. Aceito para publicação: 04/07/2003.

² Engenheira Agrônoma, Dr^a., Professora do Departamento de Fitotecnia. FAEM/UFPel. Cx. P.354, Cep 96.010-900, Pelotas, RS. E-mail: marciaaws@ufpel.tche.br.

³ Engenheiro Agrônomo, M.Sc., Aluno do Programa de Pós - Graduação em Agronomia, área de concentração em Fruticultura de Clima Temperado. FAEM/UFPel. Pelotas, RS. E-mail: acerig@ufpel.tche.br.

⁴ Acadêmica do curso de Agronomia, FAEM/UFPel. Pelotas, RS. Bolsista I.C. FAPERGS.

número médio de brotações por explante e o comprimento médio das brotações. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan, através do pacote estatístico SANEST (Zonta & Machado, 1987). Os dados expressos em percentagem foram transformados segundo arco seno raiz quadrada de %, antes da análise da variância.

Para a variável percentagem de explantes regenerados, não houve diferença significativa entre as gemas apicais e axilares, bem como para os tempos de permanência destas no meio de cultura de indução de regeneração. Observou-se uma percentagem média de explantes regenerados de 63,19%. Liu et al. (1994) utilizaram calos globulares derivados de cotilédones de macieira cv. Fuji e, observaram que, 60% dos explantes regeneraram brotações quando cultivados em meio com CPPU (N-[2-Cloro-4-Pyridyl]-N-Phenylureia) e transferidos em intervalo de duas semanas para um novo meio de cultura, durante seis semanas. Caboni et al. (2000), utilizando ápices de brotações de macieira (Jork-9, M-26, Gala e McIntosh), observaram que em todos os genótipos, 5% dos explantes tornaram-se necróticos e morreram poucos dias após a excisão, porém todos aqueles que sobreviveram regeneraram brotações.

Para o número médio de brotações por explante, também não houve diferença significativa entre as gemas apicais e axilares, bem como para os tempos de permanência destas no meio de cultura de indução de regeneração. A média de brotações por explante foi de 2,14. Keulemans & Dewitte (1994), trabalhando com macieira cv. Gloster, obtiveram uma média de 1,8 e 2,3 brotações por explante, em ápices cotiledonares e cotilédones feridos, respectivamente. Já Caboni et al. (2000) obtiveram uma média de 2,8 brotações por explante no porta-enxerto de macieira Jork-9, utilizando ápices de brotações ou gemas axilares, aos 60 dias após o início do experimento.

O comprimento médio das brotações diferiu significativamente para os tempos de permanência dos explantes no meio de cultura de indução de regeneração, independentemente do tipo de gema utilizado. O maior comprimento médio das brotações (0,99 cm) foi obtido com o tempo de indução de 30 dias (Figura 1). Caboni et al. (2000), trabalhando com o porta-enxerto de macieira Jork-9 e, utilizando ápices de brotações, observaram que um período de indução de 30 dias não foi tão eficiente como o de 20 dias e, prolongando a fase de indução para 90 dias, houve maior formação de calos no explante.

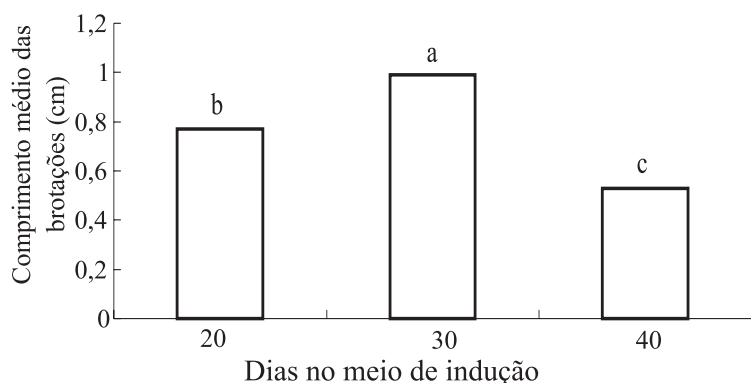


FIGURA 1 - Comprimento médio das brotações regeneradas de gemas do porta-enxerto de macieira 'EM-9', mantidos durante 20, 30 e 40 dias no meio de cultura de indução, e posteriormente, transferidos para meio de cultura de multiplicação. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem pelo teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos no experimento permitem concluir que, as gemas apicais e axilares do porta-enxerto de macieira 'EM-9' não diferem quanto à capacidade de regeneração *in vitro* de brotações; o tempo de permanência das gemas no meio de cultura de indução de regeneração, apenas mostrou diferença para o comprimento médio das brotações, obtendo-se o maior valor com 30 dias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CABONI, E.; LAURI, P.; D'ANGELI, S. *In vitro* plant regeneration from callus of shoot apices in apple shoot culture. **Plant Cell Reports**, New York, v.19, p.755-760, 2000.
- DE BONDT, A.; EGGERMONT, K.; DRUART, P.; DE VIL, M.; GODERIS, I.; VANDERLEYDEN, J.; BROEKAERT, W.F. *Agrobacterium* mediated transformation of apple (*Malus domestica* Borkh): na assesment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps. **Plant Cell Reports**, New York, v.13, p.587-593, 1994.
- DENARDI, F. Porta-enxertos. In: **Manual da cultura da macieira**. Florianópolis: EMPASC, 1986. p.92-132.
- DENARDI, F. Porta-enxertos para macieira tendências e perspectivas. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 1., 1998, Fraiburgo. **Resumos...** Fraiburgo: EPAGRI, 1998.
- DRUART, P.; DELPORTE, F.; BRAZDA, M.; UGARTE-BALLON, C.; MACHADO, A.C.; MACHADO, M.L.C.; JACQUEMIN, J.; WATILLON, B. Genetic transformation of cherry trees. **Acta Horticulturae**, The Hague, n.468, p.71-76, 1998.
- FERREE, D.C. Role of rootstocks and spur type scions for controlling vegetative growth of apple and peach trees. **HortScience**, Alexandria, v.23, n.3, p.464-467, 1987.
- HORSCH, R.B.; FRY, J.E.; HOFFMAN, N.L.; EICHOLTZ, D.A.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T. A simple and general method for transferring genes into plants. **Science**, Washington, v.227, p.1229-1231, 1985.
- KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/Embrapa-CNPq, 1999. v. 2, p. 519-531.
- KEULEMANS, J.; DEWITTE, K. Plant - regeneration from cotyledons and embryonic axes in apple - sites of reaction and effect of pre - culture in the light. **Euphytica**, Wageningen, n.77, v.1-2, p.135-139, 1994.
- LEBLAY, C.; CHEVREAU, E.; RABOIN, L.M. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaves of several pear cultivars (*Pyrus communis* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v.25, p.99-105, 1991.
- LIU, M.G.; OGIWARA, I.; HAKODA, N.; SHIMURA, I. Effects of BA, TDZ, and CPPU on formation of adventitious shoots from callus derived from apple cotyledon. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Tokio, n.63, v.3, p.505-514, 1994.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- WILKINS, P.; DODDS, J.H. Tissue culture propagation of temperate fruit trees. In: DODDS, J.H. (Ed.) **Tissue culture of trees**. Sydney: AVI Publishing Company, 1983. p.56-79.
- ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. **SANEST - Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Pelotas: DMEC/IFM/UFPel, 1987. 138p.