

CONCENTRAÇÕES DE 6-BENZYLAMINOPURINA (BAP) NA TAXA DE PROLIFERAÇÃO *IN VITRO* DA MACIEIRA 'GALA'¹

WILSON BARBOSA², FERNANDO ANTONIO CAMPO-DALL'ORTO³,
MÁRIO OJIMA⁴ e TOSHIO IGUE⁵

RESUMO - Objetivando maximizar a proliferação *in vitro* de explantes da macieira 'Gala', testaram-se sete concentrações do regulador de crescimento, 6-benzylaminopurina (BAP). O meio básico de cultura consistiu dos sais minerais de Murashige & Skoog; tiamina, 10,0 mg/litro; ácido nicotínico, 1,8 mg/litro; piridoxina, 2,5 mg/litro; inositol, 100 mg/litro; cisteína, 80 mg/litro; ágar, 6,5 g/litro e sacarose, 30 g/litro, suplementado com BAP a 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 11,0 e 12,0 μ M. Uma taxa significativamente maior de brotos axilares basais foi obtida na concentração de 10,0 μ M de BAP, cerca de 16,1 por explante. O nível de "vitrificação" aumentou de 5% de 10 μ M de BAP para mais de 40% em 12,0 μ M, reduzindo consideravelmente os propágulos úteis para a fase de enraizamento. O ajuste de uma função quadrática foi da ordem de 83%, ocorrendo o máximo de brotação na concentração de 9,3 μ M de BAP.

Termos para indexação: regulador de crescimento, *Malus* spp.; micropropagação, explante, propágulo, vitroplanta e vitrificação.

6-BENZYLAMINOPURINE (BAP) CONCENTRATION ON SHOOT PROLIFERATION OF 'GALA' APPLE *IN VITRO*

ABSTRACT - Seven different concentrations of BAP (6-benzylaminopurine) growth regulator were tested to maximize *in vitro* proliferation of 'Gala' apple tree explants. The basic culture medium consisted of the Murashige & Skoog saline solution, 10.0 mg/liter of thiamine, 1.8 mg/liter of nicotinic acid, 2.5 mg/liter of pyridoxine, 100 mg/liter of inositol, 80 mg/liter of cysteine, 6.5 g/liter of agar-agar, 30 g/liter of sucrose, supplemented with BAP at 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 and 12 mm concentrations. Significant increase in the number of viable shoots was obtained in the 10.0 mm of BAP concentration, ca. 16.1 propagules per explant. The "vitrification" level had an increase of 5% for 10 mm and up to 40% for 12.0 mm of BAP, reducing considerably the propagules useful for the rooting phase. The quadratic function fitting was of 83%, showing a maximum of sprouting at the 9.3 mm of BAP concentration.

Index terms: growth regulator, *Malus* spp.; micropropagation, explants, propagule, vitrification, vitroplant.

INTRODUÇÃO

A propagação vegetativa *in vitro* de plantas vem, aos poucos, se consolidando como uma técnica agrônômica de interesse mundial. Esse fato pode ser comprovado pela maior disponibilidade de trabalhos mais recentes encontrados na literatura pertinente, abrangendo diversas espécies vegetais, com ênfase nas hortaliças, ornamentais, florestais, frutíferas e medicinais.

¹ Aceito para publicação em 7 de dezembro de 1989
Trabalho de pesquisa ligado ao projeto "Melhoramento genético da macieira, *Malus* spp.". Convênio: SAA(IAC)-EMBRAPA.

² Biólogo, M.Sc., Seção de Frutic. de Clima Temperado, Div. de Hortic., Inst. Agron. (IAC), Caixa Postal 28, CEP 13001 Campinas, SP. Com bolsa do CNPq.

³ Eng.-Agr., M.Sc., Seção de Frutic. de Clima Temperado, Div. de Hortic., IAC. Com bolsa do CNPq.

⁴ Eng.-Agr., Dr., Seção de Frutic. de Clima Temperado, Div. de Hortic., IAC.

⁵ Eng.-Agr., Dr., Seção de Técnica Experimental e Cálculo, IAC.

Essa técnica, pela maior possibilidade de lucros imediatos, tem estimulado organizações mais tecnificadas e de grande poderio econômico a ingressarem em atividade de produção de mudas com fins comerciais. Na Europa, mais especificamente na Itália, nos últimos anos, milhões de macieiras e pessegueiros porta-enxertos foram produzidos, através da micropropagação, o que reverteu a sua situação de principal importador no mercado europeu (Fiorino & Loreti 1983). No que se refere à multiplicação *in vitro* de espécies frutíferas, máxime das lenhosas, certas dificuldades têm ainda de ser superadas, no sentido de se maximizar a obtenção de propágulos e sua rápida disponibilidade ao cultivo agrônomico. Na micropropagação da macieira, por exemplo, não se dispõe, ainda, de uma metodologia totalmente desenvolvida para a obtenção do máximo rendimento *versus* custos compatíveis.

Diversos centros de pesquisas vêm aprimorando as técnicas da cultura *in vitro* da macieira, desde o final da década de 60. Com a utilização de metodologias distintas, esses centros contribuíram decisivamente para a introdução do sistema de produção de mudas em laboratório. Dentre os vários trabalhos, destacam-se os de: Jones (1967, 1976), Walkey (1972), Abbott & Whiteley (1976), Jones et al. (1977, 1979), Morini (1980), Loreti et al. (1981), James & Thurbon (1981), Welander (1983), Zimmerman & Fordham (1985), Barbosa et al. (1986), Yae et al. (1987), além de outros, mencionados por Fiorino & Loreti (1983) e Zimmerman (1984), numa coletânea bibliográfica. Nesses trabalhos, as principais cultivares empregadas foram: porta-enxertos MM 106, MM 111, M.7, M.9, M.25, M.26, M.27, Mac 9 e EMLA 27, e copas Golden Delicious, Delicious, Granny Smith, McIntosh, Starkrimson, Gala e Rainha.

Em continuidade às pesquisas micropropagativas com essa cultura, afigura-se como essencial a definição das exigências nutricionais e hormonais *in vitro* das diversas cultivares de interesse local, para que a técnica possa se estabelecer como uma ferramenta agrônomicamente realmente eficaz. Dentro dessas exigências,

ênfase especial ainda deve ser dada às concentrações ideais dos reguladores de crescimento para proliferação do explante e seu efetivo enraizamento.

Assim sendo, o presente trabalho foi conduzido com o principal objetivo de determinar uma ideal concentração de BAP à cultivar Gala, de modo a aumentar a taxa de proliferação dos explantes, em sua primeira fase de multiplicação *in vitro*. Utilizou-se 'Gala', por se tratar de uma excelente opção varietal, de maior adaptação à região sul do País, onde é cultivada em larga escala comercial.

MATERIAL E MÉTODOS

Os explantes da cultivar Gala utilizados no experimento são provenientes de propágulos mantidos *in vitro* sob a forma de "culturas estoques" no laboratório da Seção de Fruticultura de Clima Temperado, do Instituto Agrônomico, Campinas, SP.

O meio básico de cultura para a proliferação foi composto da solução salina de Murashige & Skoog (1962); tiamina, 10,0 mg/litro; ácido nicotínico, 1,8 mg/litro; piridoxina, 2,5 mg/litro, inositol, 100 mg/litro; cisteína, 80 mg/litro, ágar-ágar, 6,5 g/litro, e sacarose, 30 g/litro. A esse meio foi adicionado o regulador de crescimento, 6-benzylaminopurina (BAP), nas concentrações de: 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 11,0 e 12,0 μ M. O pH foi ajustado a 6,0 com KOH a 0,1 N, considerando uma acidificação da ordem de 0,3, após a autoclavagem do meio por 15 minutos a 121°C e 1,1 kg/cm² de pressão. Foram utilizados 12 ml do meio por frasco de cultura (9,0 x 4,0 cm).

Para cada concentração de BAP utilizaram-se ao acaso 40 explantes, em parcelas de dez, com quatro repetições. Os explantes, que mediam cerca de 2,0 cm de altura e 1,5 mm de diâmetro, receberam o inóculo em posição vertical, com "reculturas" quinzenais.

Durante 60 dias, a cultura foi desenvolvida em fotoperíodo de 16 horas, com uma amplitude de temperatura variável entre 24 a 28°C. Os protocolos para verificação do crescimento e brotação das vitroplantas foram realizados semanalmente, considerando-se para análise os dados mensais. Foi efetuada análise de variância para o número de brotação por explante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes às taxas de proliferação dos explantes de 'Gala', em resposta às concentrações de BAP, avaliados em dois períodos, encontram-se na Tabela 1, bem como as equações respostas da proliferação em função de BAP e os respectivos coeficientes de determinação.

Conforme previsto, a presença de BAP promoveu intensa brotação na parte mais basal dos explantes. Este efeito é demonstrado na maioria dos trabalhos envolvendo a micropropagação vegetativa da macieira e de outras espécies frutíferas lenhosas da família das rosáceas (Angisboust, 1980, Hammerschlag, 1982, Murrithi et al. 1982, Zimmerman 1984, Rosati et al. 1985, Passos et al. 1985, Sugiura et al. 1986, Maarri et al. 1986, Hirabayashi 1987). Além disso, BAP possibilita diferenciação e desenvolvimento dos explantes em curto espaço de tempo, dado o alto grau de atividade biológica que induz às células.

No presente experimento, observou-se o aparecimento de brotações basais já nos primeiros dez dias de cultura, sendo que, após duas semanas, elas se multiplicavam à proporção de três a quatro vezes. As brotações basais foram facilmente emitidas graças à presença

de meristemas axilares, principalmente nos explantes mais vigorosos, com internódios curtos e sem dominância apical.

Como se pode observar na Tabela 1, nas concentrações experimentadas de 6,0 a 12,0 μM de BAP, o número de brotos visíveis após 60 dias de cultivo variou na faixa de 8,9 e 16,1 brotações por explante; o melhor resultado alcançado na concentração foi de 10,0 μM . Nas concentrações superiores de 11,0 e 12,0 μM houve redução da taxa de proliferação aos níveis de 12,8 e 9,9 brotações visíveis, respectivamente. A concentração de 10,0 μM de BAP, dentro da amplitude estudada, foi a melhor logo nas primeiras semanas de cultivo. A função quadrática ajustada, com coeficiente de determinação da ordem de 83%, tem ponto de máxima brotação na concentração de 9,3 μM de BAP. Na avaliação dos 30 dias, verificaram-se cerca de 10 vigorosos propágulos no feixe de brotações. Neste período, na qualidade, os propágulos já se destacavam entre si, sendo as concentrações de 6,0 a 10,0 μM as mais adequadas. Nas dosagens de 6,0 e 7,0 μM , não obstante a menor produção de brotos, estes se apresentavam bem mais vigorosos, com folhas verdes escuras e nenhuma anomalia, em decorrência talvez da menor taxa de competição dentro do

TABELA 1. Efeito de diversas concentrações de 6-benzylaminopurina (BAP) na taxa de proliferação *in vitro* da macieira 'Gala'. Número de brotos por explante e por concentração; médias de quatro repetições. Avaliações após 30 e 60 dias de cultura. Coeficiente de variação, CV, e valores de F. Equação resposta da proliferação em função de BAP. Seção de Fruticultura de Clima Temperado, Instituto Agrônomo, 1987.

Avaliação (dias)	BAP (μM)							CV	F
	6	7	8	9	10	11	12		
30 ¹	7,3	8,5	8,9	9,5	10,3	9,8	8,5	% 9,97	(trat.) 9,19**
60 ²	8,9	10,9	12,4	13,7	16,1	12,8	9,9	8,24	23,11**

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

¹ $Y = -9,73 + 4,030x - 0,2071x^2$ R^2 (Coef. Det.) = 80%.

² $Y = -31,11 + 10,1777x - 0,5455x^2$ R^2 (Coef. Det.) = 83%.

próprio feixe de brotações. Em contraposição, apesar da boa taxa de proliferação obtida nas concentrações de 11,0 e 12,0 μM , as pequenas folhas exibiram os diversos sintomas de "vitricificação" (Jones 1967, Zimmerman 1984, Pasqualetto et al. 1986). Esses sintomas reduziram drasticamente a quantidade dos propágulos úteis para a fase de enraizamento, de acordo com o método adotado de multiplicação em três etapas: proliferação, indução de raiz e enraizamento efetivo (Barbosa et al. 1986). A "vitricificação" foi da ordem de 5, 25 e 40% para as concentrações de 10,0, 11,0 e 12,0 μM , respectivamente. Nas concentrações inferiores de 10,0 μM , não se verificaram tão tipicamente os sintomas de "vitricificação". Apesar do nível de 5% da "vitricificação" em 10,0 μM , essa concentração ainda proporcionou melhor comportamento que as demais, pois mais de 90% dos propágulos apresentaram-se adequados às etapas seguintes da multiplicação *in vitro*. Na avaliação efetuada aos 30 dias, a função quadrática ajustada, com coeficiente de determinação de 88%, tem como ponto de máxima brotação na concentração de 9,7 μM de BAP.

Assim, nas condições do presente experimento, define-se para 'Gala', a concentração ideal de BAP na faixa de 10,0 μM , a qual proporcionou a quantidade expressiva de 16,1 novas *in vitro*-plantas, em apenas 60 dias, partindo-se de um explante matriz. Esses resultados aperfeiçoam aqueles obtidos por Barbosa et al. (1986), que obtiveram, para a mesma cultivar, cerca de 13 brotações por explante na concentração de 7,5 μM , em cinco meses de cultivo, com subculturas sucessivas.

Finalmente, cabe ressaltar que esta taxa de 16,1 brotações obtidas para 'Gala', poderia, no mesmo "meio de cultura" utilizado, ser, em parte, alterada, dependendo das seguintes variáveis: tamanho do frasco de cultura e o volume do meio de cultura, número e frequência de "reculturas", posição de inoculação, vigor e origem do explante.

AGRADECIMENTOS

Aos Técnicos de Laboratório: Onivaldo Camargo e Meire C. Silva Ferrari, do IAC, pela colaboração prestada na execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, A.J. & WHITELEY, E. Culture of *Malus* tissues *in vitro*. I. Multiplication of apple plants from isolated shoot apices. *Sci. Hortic.*, 4:183-9, 1976.
- ANGISBOUST, A. La multiplication végétative *in vitro* une nouvelle technique de pointe au service de L'arboriculture. *Arboric. Frut.*, 322:29-46, 1980.
- BARBOSA, W.; CAMPO-DALL'ORTO, F.A.; OJIMA, M.; CAMPOS, S.A.F.; TOMBOLATO, A.F.C. Propagação vegetativa *in vitro* de cultivares de macieira, *Bragantia*, Campinas, 45(1):143-154, 1986.
- FIORINO, P. & LORETI, F. La micropropagazione delle principali specie legnose da frutto. *Agric. Ital.*, 3(4):107-53, 1983.
- HAMMERSCHLAG, F. Factors affecting establishment and growth of peach shoots *in vitro*. *HortScience*, 17:85-86, 1982.
- HIRABAYASHI, T.; MORIGUCHI, T.; KOZAKI, I.; YAMAMOTO, Y.; MATSUZAKI, S. *In vitro* propagation of *Pyrus* shoot tips. *Bull. Fruit Tree Res. Stn.*, 14:9-16, 1987.
- JAMES, D.J. & THURBON, I.J. Shoot and root initiation *in vitro* in the apple rootstock M.9 and promotive effects of phloroglucinol. *J. Hortic. Sci.*, 56:16-20, 1981.
- JONES, O.P. Effect of benzyladenine on isolated apple shoots. *Nature*, 215:1514-15, 1967.
- JONES, O.P. Effect of phloridzin and phloroglucinol on apple shoots. *Nature*, 262:392-3, 1976.
- JONES, O.P.; HOPGOOD, M.E.; O'FARRELL, D. Propagation *in vitro* of M.26 apple rootstocks. *J. Hortic. Sci.*, 52:235-8, 1977.
- JONES, O.P.; PONTIKIS, C.A.; HOPGGOD, M.E. Propagation *in vitro* of five apple scion cultivars. *J. Hortic. Sci.*, 54:155-58, 1979.

- LORETI, R.; MORINI, S.; CARROZZA, G. Observations on micropropagation of M.27 apple rootstock. *Plant Propagator*, **27**(2):4-6, 1981.
- MAARRI, K.-AL.; ARNAUD, Y.; MIGINIAC, E. *In vitro* micropropagation of quince (*Cydonia oblonga* Mill.). *Sci. Hortic.*, **28**:315-21, 1986.
- MORINI, S. Indagini preliminari sulla micropropagazione del melo. *Riv. Ortoflorofruttic. Ital.*, **65**:41-51, 1980.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**:473-87, 1962.
- MURRITHI, L.M.; RANGAN, T.S.; WAITE, B.H. *In vitro* propagation of fig through shoot tip culture. *HortScience*, **17**:96-97, 1982.
- PASQUALETTO, P.L.; ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I. Gelling agent and growth regulator effects on shoot vitrification of 'Gala' apple *in vitro*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **111**:976-80, 1986.
- PASSOS, I.R.S.; SONDAHL, M.R.; RIBEIRO, I.J.A.; TERRA, M.M.; PIRES, E.J.P. Cultura *in vitro* de meristemas de videira. I. Concentrações do hormônio 6-ba em meio primário, *Bragantia*, Campinas, **44**(1):473-79, 1985.
- ROSATI, P.; MARINO, G.S.; SWIEREZEWSKI, C. *In vitro* propagation of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl. cv. Calita). *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **105**:126-9, 1985.
- SUGIURA, A.; TAO, R.; MURAYAMA, H.; TOMANA, T. *In vitro* propagation of Japanese persimmon. *HortScience*, **21**:1205-7, 1986.
- WALKEY, D.G. Production of apple plantlets from axillary-bud meristems. *Can. J. Sci.*, **52**:1085-7, 1972.
- WELANDER, M. *In vitro* rooting of the apple rootstocks M.26 in adult and juvenile growth phases and acclimatization of the plantlets. *Physiol. Plant.*, **58**:231-8, 1983.
- YAE, B.W.; ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I. Influence of photoperiod, apical meristem, and explant orientation on axillary shoot proliferation of apple cultivars *in vitro*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **112**:588-92, 1987.
- ZIMMERMAN, R.H. Apple. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y., eds. *Handbook of plant cell culture*; Crop Species. New York, Macmillan, 1984. p.369-95.
- ZIMMERMAN, R.H. & FORDHAM, I. Simplified method for rooting apple cultivars *in vitro*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **110**:34-38, 1985.