

# MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE BROTAÇÕES DE MACIEIRA CULTIVARES MARUBAKAIDO (*MALUS PRUNIFOLIA*, WILLD, BORKH) E MEGUMI (*MALUS DOMESTICA*, BORKH)<sup>1</sup>

MÁRCIA WULFF SCHUCH<sup>2</sup>, JOSÉ ANTONIO PETERS<sup>3</sup>

RESUMO – Brotações de macieira, porta-enxerto Marubakaido (*Malus prunifolia* Willd, Borkh), também conhecido como Maruba, e cultivar Megumi (*Malus domestica*, Borkh), oriundas do cultivo de meristema, foram multiplicadas "*in vitro*" em seis diferentes meios de cultura, onde se utilizaram diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP) e a adição de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>). O objetivo deste trabalho foi determinar o melhor meio de multiplicação para estas duas cultivares. Os parâmetros analisados foram o número de brotações formadas a partir de uma única brotação e o comprimento destas brotações. Os melhores resultados foram obtidos com 2,0 mg/l de BAP para o porta-enxerto Maruba e 3,5 mg/l para a cultivar copa Megumi. A taxa de multiplicação e o crescimento das brotações mostrou-se variável de acordo com o genótipo.

Termos para indexação: cultura de tecidos, micropropagação, maçã.

## MULTIPLICATION *IN VITRO* OF APPLE SHOOTS MARUBAKAIDO (*Malus prunifolia* Willd, Borkh) AND MEGUMI (*Malus domestica* Borkh) CULTIVARS

ABSTRACT – Apple shoots, Marubakaido (*Malus prunifolia* Willd, Borkh) rootstocks, also known as Maruba and Megumi (*Malus domestica*, Borkh) cultivars, from meristem culture, were multiplied "*in vitro*" from six different culture media, added benzylaminopurine to BAP (2.0; 3.5 and 5.0) mg/l and GA<sub>3</sub> (0.0 and 1.0) mg/l. The objective of the experiment was to verify the best culture media for both cultivars. The parameters used were: shoot number, that came from an initial explant, and also the length of those shoots. The best results were obtained with 2.0 mg/l of BAP, for the rootstock Maruba, and 3.5 mg/l for the cultivar Megumi. The rate of multiplication and the growing of the shoots varied according to the genotype used.

Index terms: tissue culture, micropropagation.

## INTRODUÇÃO

O crescente interesse apresentado nos últimos anos pela cultura da macieira fez com que houvesse maior necessidade de produção de mudas sadias. Através do uso da micropropagação "*in vitro*" pode-se obter uma grande quantidade de mudas livres de doenças, em um espaço mais curto de tempo, em comparação com o método tradicionalmente utilizado na propagação da macieira.

O processo tradicional de produção de mudas de macieira é a enxertia de cultivares comerciais sobre um porta-enxerto, e a obtenção deste é feita através de mergulhia de cepa (Driessen & Souza Filho, 1986), que é um processo demorado, resultando em, aproximadamente, quatro porta-enxertos/ano planta/matriz a partir do segundo ano de plantio, requerendo áreas relativamente grandes para viveiros, o que faz aumentar o custo da muda (Fachinello et al. 1988). Além disso, através da enxertia a planta pode sofrer contaminação.

Por esta razão, a micropropagação apresenta uma contribuição efetiva na cultura da macieira, pois através desta técnica pode-se produzir grande quantidade de porta-enxertos e também cultivares comerciais já enraizadas, superando, desta forma,

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 5 de outubro de 1992.

Extraído da Dissertação da autora para a obtenção do grau de Mestre em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

<sup>2</sup> Eng<sup>a</sup>-Agr<sup>a</sup>, M.Sc., Prof<sup>a</sup>-Assist. Dep. de Fitot., UFPel.

<sup>3</sup> Eng. Agr., Dr., Prof.-Adj., Dep. de Botânica, UFPel.

o problema da incompatibilidade da enxertia e a invasão de doenças durante a propagação (Lane 1978, Debergh 1988).

Um dos porta-enxertos mais promissores introduzido no Brasil é o Marubakaido (*Malus prunifolia*, Willd, Borkh), de origem japonesa, também conhecido como Maruba, já existindo pomares comerciais originados dele, em Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Este porta-enxerto apresenta-se resistente à podridão-do-colo e com relativa resistência à *Rosellinia* spp. (Denardi 1986). Também de origem japonesa, a cultivar Megumi (*Malus domestica*, Borkh) adapta-se bem às regiões mais frias do sul do Brasil, com boas produções (Ribeiro 1986), além de possuir alta taxa de auto-compatibilidade: 61% (Lessa 1985).

As diferentes espécies e cultivares possuem características genéticas próprias, que as fazem responder diferentemente à micropropagação. Zimmerman (1983) afirma que há uma variação no comportamento das espécies lenhosas em relação às condições a que são submetidas na micropropagação, e por esta razão é necessário que esta técnica seja adaptada às necessidades dos diferentes genótipos.

O meio de cultura utilizado nas diversas fases da micropropagação deve proporcionar à planta os nutrientes necessários ao metabolismo das células e os fatores de crescimento responsáveis pela diferenciação de brotos e raízes, e, de acordo com Elliot (1971), a adição de reguladores de crescimento no meio de cultura induz um desenvolvimento normal de brotações na micropropagação da macieira. Na fase de multiplicação, é necessário que se tenha um meio rico em citocinina para haver a produção de um grande número de brotações através do crescimento de meristemas laterais (Sriskandarajah et al. 1982). Fiorino & Leva (1983), trabalhando com diferentes cultivares de macieira, concluíram que o BAP é a citocinina mais ativa para a multiplicação de brotações.

Outro grupo de reguladores de crescimento utilizado na fase de multiplicação são as giberelinas, que estimulam o crescimento, pois provocam expansão celular (Weaver 1976) e são efetivas no alongamento de brotações de macieira (Reeves et al. 1985).

O objetivo deste trabalho foi determinar o me-

lhor meio de multiplicação, na micropropagação "in vitro", para o porta-enxerto Maruba e para a cultivar copa Megumi.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Centro Nacional de Fruteiras de Clima Temperado, da EMBRAPA, em Pelotas, RS, no ano de 1988.

Foram utilizadas brotações de macieira porta-enxerto Marubakaido (*Malus prunifolia* Willd, Borkh) e cultivar copa Megumi (*Malus domestica*, Borkh).

O material botânico encontrava-se em meio de multiplicação, sendo que a cultivar Megumi em dez subculturas, e o porta-enxerto Maruba em doze subculturas contendo todos os sais de Murashige & Skoog (1962), 30 g/l de sacarose, 100 mg/l de mio-inositol, 6 g/l de bacto-ágar e 2 mg/l de BAP, sob uma intensidade luminosa de 4.000 lux, conseguida pela combinação alternada de lâmpadas gro-lux e branca fria, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 1°C, durante o período claro e 23 ± 1°C no escuro.

Cinco brotações com aproximadamente 1,0 cm de altura foram colocadas dentro de frascos contendo 50 ml de meio de multiplicação. A inoculação foi feita em câmaras de fluxo laminar, de maneira asséptica, e após, os frascos foram transferidos para a sala de crescimento sob condições especificadas anteriormente, onde permaneceram 30 dias.

**Composição dos meios de cultura** - Em todos os experimentos utilizou-se o meio mineral MS Murashige & Skoog (1962). Para a preparação dos meios de multiplicação acrescentou-se ao meio mineral o açúcar cristal (30 g/l), mio-inositol (100 mg/l), uma citocinina, a 6-benzilaminopurina (BAP) e uma giberelina, o ácido giberélico (AG<sub>3</sub>), em concentrações e combinações diferentes. O pH foi ajustado para 6,2 e logo após adicionou-se bacto-ágar (6 g/l) para solidificar o meio. Os meios foram distribuídos nos frascos, e estes, tampados com folha de alumínio, a seguir foram autoclavados a 120°C, sob 1,5 atm de pressão, durante 15 a 17 minutos, para serem esterilizados. A composição dos meios utilizados foi a seguinte:

Meio MS adicionado de (mg/l)

- (1) 2,0 BAP
- (2) 2,0 BAP + 1,0 AG<sub>3</sub>
- (3) 3,5 BAP
- (4) 3,5 BAP + 1,0 AG<sub>3</sub>
- (5) 5,0 BAP
- (6) 5,0 BAP + 1,0 AG<sub>3</sub>

As avaliações foram realizadas pela contagem do número de brotações formadas a partir de um explante e pela medição do comprimento individual de cada brotação, com a utilização de uma escala em milímetros. O número de repetições utilizado foi de cinco por tratamento, inoculando-se a solução do meio em cinco explantes por repetição.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Número de brotações** - Quanto ao porta-enxerto Maruba, sua taxa de multiplicação foi maior no tratamento contendo menor concentração de BAP. Com a utilização de 2 mg/l de BAP no meio de cultura, obtiveram-se, em média, 19,13 brotações, enquanto que com 3,5 mg/l a taxa de multiplicação foi de 9,59 brotos, e com 5,0 mg/l de BAP, foram obtidas 3,68 brotações (Tabela 1).

Já para a cultivar Megumi, maior número de brotações foi obtido com 3,5 mg/l de BAP no meio de cultura, sendo que concentrações menores e maiores afetaram negativamente a multiplicação (Tabela 2).

Estes resultados estão de acordo com Lane & McDougald (1982), que, trabalhando com cinco diferentes cultivares de macieira, encontraram diferentes requerimentos em relação à concentração de BAP no meio de cultura para a multiplicação

**TABELA 1. Efeito dos diferentes meios de cultura no número de brotações do porta-enxerto Marubakaido.**

BAP (mg/l)	0,0	AG <sub>3</sub>	1,0	Média
2,0	19,13a		18,66a	18,90
3,5	9,59b		13,62a	11,60
5,0	3,68c		4,71c	4,19

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância.

C.V. (%) = 16,544

**TABELA 2. Efeito dos diferentes meios de cultura no número de brotações da cultivar Megumi.**

BAP (mg/l)	0,0	AG <sub>3</sub>	1,0	Média
2,0	6,53b		7,34b	6,93
3,5	16,07a		5,06b	10,56
5,0	7,08b		6,32b	6,7

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância.

C.V. (%) = 19,334

de brotações, e afirmam que a necessidade de fornecimento de BAP de forma exógena está relacionada com a quantidade de citocinina endógena que a cultivar possui. A citocinina endógena, segundo estes autores, interagiria com a BAP do meio de cultura, influenciando a multiplicação de brotações, e que isto depende do meio, da eficiência de transporte da BAP e do metabolismo desta, podendo criar requerimentos menores ou maiores de BAP exógena.

Em relação ao AG<sub>3</sub>, a presença deste regulador de crescimento no meio de cultura afetou negativamente a formação de brotações na cultivar Megumi quando se utilizou BAP a 3,5 mg/l; já para o porta-enxerto Maruba, o efeito foi contrário, nesta concentração (Tabelas 1 e 2).

Lane (1978) afirma que as cultivares que apresentam uma boa taxa de multiplicação possuem giberelina endógena suficiente, sendo que a aplicação de forma externa deste regulador de crescimento pode prejudicar a proliferação de brotações. Segundo Pua et al. (1983), o efeito do AG<sub>3</sub> na proliferação de brotações de macieira varia de acordo com a interação existente com outros reguladores de crescimento e depende também da cultivar que está sendo multiplicada.

**Comprimento das brotações** - Quanto ao porta-enxerto Maruba, o comprimento médio das suas brotações foi maior quando se utilizou no meio de cultura uma menor concentração de BAP, ou seja: com 2 mg/l, o comprimento foi de 2,04 cm, e com 5,0 mg/l, as brotações mediram, em média, 1,08 cm. A adição de giberelina ao meio, com concentrações de 2,0 e 3,5 mg/l de

BAP, causou um aumento no comprimento médio das brotações (Tabela 3).

Segundo Reeves et al. (1985), com a adição de giberelina no meio de cultura as brotações ficam com maior comprimento, pois este regulador de crescimento provoca a expansão celular (Weaver 1976), aumentando o alongamento das brotações.

Quanto à cultivar Megumi, o comprimento das suas brotações também foi afetado pelas diferentes concentrações de BAP. A medida que se aumentou a concentração de BAP no meio de multiplicação, houve uma diminuição no comprimento destas. A adição de AG<sub>3</sub> no meio de cultura aumentou o comprimento dos brotos em concentrações de BAP de 3,5 e 5,0 mg/l (Tabela 4).

**TABELA 3. Efeito dos diferentes meios de cultura no comprimento médio de brotações de macieira, porta-enxerto Maruba.**

BAP (mg/l)	0,0	AG <sub>3</sub>	1,0	Média (cm)
2,0	1,89a		2,19a	2,04
3,5	1,65a		2,09a	1,87
5,0	1,15a		1,02b	1,08

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância.

C.V. (%) = 13,908

**TABELA 4. Efeito dos diferentes meios de cultura no comprimento médio de brotações de macieira, cultivar Megumi.**

BAP (mg/l)	0,0	AG <sub>3</sub>	1,0	Média (cm)
2,0	2,12a		1,92a	2,02
3,5	1,69a		2,07a	1,88
5,0	1,50a		1,58a	1,54

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância.

C.V. (%) = 17,261

## CONCLUSÕES

1. A benziladamina nas concentrações de 2,0 e 3,5 mg/l favorece a multiplicação das cultivares

Marubakaido e Megumi, respectivamente.

2. Na concentração de 3,5 mg/l de BAP, a adição de 1,0 mg/l de AG<sub>3</sub> afeta o número de brotações formadas.

3. A taxa de multiplicação e o crescimento das brotações é variável de acordo com o genótipo utilizado.

## REFERÊNCIAS

- DEBERGH, P.C. Micropropagation of woody species state of the art on in vitro aspects. *Acta Horticulturae*, v.227, p.287-295, 1988.
- DENARDI, F. Porta-enxertos. In: EMPASC. *Manual da cultura da macieira* Florianópolis, 1986. p.92-132.
- DRIESSEN, A.C., SOUZA FILHO, J.J.C. de. Produção de mudas. In: EMPASC. *Manual da cultura da macieira*. Florianópolis, 1986. 562p.
- ELLIOT, R.F. Axenic culture of shoot apices of apple. *New Zealand Journal of Botany*, v.10, p.254-258, 1971.
- 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.
- FIORINO, P.; LEVA, A.R. Propagation of apple cultivars. *Acta Horticulturae*, v.131, p.95-99, 1983.
- LANE, W.D.; McDOUGALD, J.M. Shoot tissue culture of apple: comparative response of five cultivars do cytokinin and auxin. *Canadian Journal of Plant Science*, v.62, p.689-694, 1982.
- LANE, W.D. Regeneration of apple plants from shoot meristem tips. *Plant Science Letters*, v.13, p.281-285, 1978.
- LESSA, A.O. *A cultura da macieira no Japão*. Florianópolis: ACARESC, 1985. 48p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*. v.15, p.473-497, 1962.
- PUA, E.C.; CHONG, C.; ROUSSELE, G.L. In vitro propagation of Ottawa-3 apple rootstock. *Canadian Journal of Plant Science*, v.63, p.183-188, 1983.

- REEVES, D.W.; COUVILLON, G.A.; HORTON, B.D. Effect of giberellic acid ( $AG_3$ ) on elongation and rooting of "St. Julien A" rootstock in vitro. **Scientia Horticulturae**, v.26, p.253-259, 1985.
- RIBEIRO, P. de A. Descrição e comportamento de algumas cultivares de macieira no sul do Brasil. In: EMPASC. **Manual da cultura da macieira**. Florianópolis, 1986, p.59-91.
- SRISKANDARAJAH, S.; MULLINS, M.G.; NAIR, Y. Induction of adventitious rooting in vitro in difficult-to-propagate cultivars of apple. **Plant Science Letters**, v.24, p.1-9, 1982.
- WEAVER, R.J. **Reguladores del crecimiento de las plantas em agricultura**. México: Ed. Trilhas, 1976. 621p.
- ZIMMERMAN, R.H. Factors affecting in vitro propagation of apple cultivars. **Acta Horticulturae**, v.131, p.171-178, 1983.