

INFLUÊNCIA DE REGULADORES DE CRESCIMENTO NA PROLIFERAÇÃO *IN VITRO* DE BROTO DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA M-7¹

EDSON YUI², MOACIR PASQUAL³, JOSÉ DARLAN RAMOS⁴,
NILTON NAGIG, JORGE CHALFUN⁵, JORGE SUSUMU ISHIDA⁶

RESUMO - Verificou-se o efeito de várias concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido giberélico (GA₃) na multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira M-7. Foram testadas diversas combinações entre BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; e 4,0 mg/l) e GA₃ (0,0; 0,01; 0,1 e 1,0 mg/l); BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/l) e ANA (0,0; 0,001; 0,01 e 0,1 mg/l); GA₃ (0,0; 0,01; 0,1 e 1,0 mg/l) e ANA (0,0; 0,001; 0,01 e 0,1 mg/l). Os explantes consistiram de segmentos de brotos com aproximadamente 1,0 cm de comprimento, e foram incubados em sala de crescimento sob temperatura de 27 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 3000 lux. Avaliou-se o experimento após 28 dias de cultivo, registrando-se o número total de brotos e o número de brotos superiores a 1,0 cm. A multiplicação *in vitro* pode ser realizada com sucesso utilizando-se, tanto para proliferação total de brotos, quanto para brotos superiores 1,0 cm, o BAP em concentrações entre 0,5 a 2,0 mg/l. A adição de ANA e GA₃ é dispensável.

Termos para indexação: cultura de tecidos, micropropagação.

IN VITRO EFFECTS OF GROWTH REGULATORS ON PROLIFERATION OF SHOOTS OF M-7 APPLE ROOTSTOCK

ABSTRACT - The objective of this work was to research the effect of different concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP), naphthalene acetic acid (ANA) and gibberellic acid (GA₃) on the *in vitro* multiplication of apple tree rootstock M-7. In this experiments, all possible combinations between BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; and 4,0 mg/l) and GA₃ (0,0; 0,01; 0,1 and 1,0 mg/l); between BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 and 4,0 mg/l) and ANA (0,0; 0,001; 0,01 and 0,1 mg/l); and between GA₃ (0,0; 0,01; 0,1 and 1,0 mg/l) and ANA (0,0; 0,001; 0,01 and 0,1 mg/l) were tested. The explants (segments of shoots with 1,0 cm of length) were inoculated (one/tube) and cultured at 27 ± 2°C, 16 hr photoperiods and 3000 lux light intensity. The evaluation was made after 28 days through total number of branches higher than 1,0 cm. The *in vitro* multiplication can be made successfully using 0,5 and 2,0 mg/l of concentration. The ANA and GA₃ are dispensable.

Index terms: tissue culture, micropropagation.

INTRODUÇÃO

A macieira se propaga vegetativamente através da enxertia, e os porta-enxertos são obtidos utilizando-se da "amontoa de cepa". Tal técnica apresenta, porém, um rendimento baixo, e isso tem contribuído para a elevação do custo das mudas.

Os métodos de propagação *in vitro*, de relevante importância para o desenvolvimento da cultura, são bastante eficientes na multiplicação, tanto das matrizes como dos porta-enxertos, oferecendo maior segurança no aspecto fitossanitário das mudas produzidas.

Lane (1978) verificou para a cultivar McIntosh a não-necessidade da aplicação de auxina exógena para proliferação de brotos. Entretanto, alguns autores, como Dunstan et al. (1985), observaram que a aplicação de pequenas doses de AIB (0,2 mg/l) pode estimular a produção de brotações. A adição de ANA ao meio de cultura pode provocar inibição da proliferação de brotações, quando en-

¹ Aceito para publicação em 13 de novembro de 1992.

² Eng.-Agr., em curso de M.Sc. em Agron./Fitot. Esc. Sup. de Agric. de Lavras, Lavras, MG. Bolsista do CNPq e CAPES.

³ Eng.-Agr., Dr., Prof.-Titular, Esc. Sup. de Agric. de Lavras (ESAL), Caixa Postal 37, CEP 37200-000 Lavras, MG. Bolsista do CNPq.

⁴ Eng.-Agr., M.Sc., EPAMIG - Lavras, MG.

⁵ Eng.-Agr., Dr., Prof.-Adj., ESAL. Bolsista do CNPq.

⁶ Em curso de Agronomia na ESAL.

tre as doses de 0,1 e 0,2 mg/l, segundo Abbott & Whiteley (1976) e Lane (1978).

Em outros trabalhos, Jones et al. (1979), Lundergan & Janick (1980) e Dunstan et al. (1985) verificaram que a citocinina mais eficiente à propagação *in vitro* da macieira foi a 6-benzilaminopurina (BAP); mas em concentrações mais elevadas, acima de 3,0 mg/l, pode afetar a qualidade dos brotos, produzindo-os de modo atrofiado.

Pesquisando vários níveis de BAP, Barbosa et al. (1986) verificaram que para as cultivares Rainha, Gala, seleções IAC 1381-22, IAC 3881-8 e IAC 4881-11, as melhores concentrações estão próximas de 1,12 e 1,68 mg/l.

A adição de BAP (1,0 mg/l) ao meio de cultura constituído de sais MS é fundamental para o crescimento e desenvolvimento dos meristemas e também para o desenvolvimento de gemas axilares da cultivar de macieira McIntosh (Lane 1978).

Em cultura nodal, sobre meio MS utilizando explantes do porta-enxerto KSC-3, Hicks & Nair (1986) verificaram que ao aplicar BAP entre 0,1 a 1,0 mg/l houve aumento rápido no tamanho das brotações no peso da matéria fresca e seca.

Vários autores, entre os quais Lane (1978), Lundergan & Janick (1980), Cheema & Sharma (1983) e Ochatt & Caso (1983), verificaram que a adição de giberelina ao meio MS, em doses que variam entre 0,1 e 1,0 mg/l, não apresentam efeitos significativos sobre a proliferação de brotações de macieira para os porta-enxertos EMLA-25 e M-4 e para as cultivares Golden Delicious e McIntosh.

Para o cultivo *in vitro* da macieira, normalmente as giberelinas são aplicadas em concentrações baixas, cerca de 0,1 mg/l. Quando o objetivo da cultura é a obtenção de brotos alongados, apropriados para a fase de enraizamento, torna-se necessária a utilização de concentrações mais elevadas (Snir & Erez 1980).

Objetivou-se, neste trabalho, verificar o efeito de várias concentrações de BAP, ANA e GA₃ na multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira M-7.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Escola Superior de Agricultura de Lavras - ESAL -, em Lavras, MG.

Os explantes do porta-enxerto de macieira M-7 consistiram de brotos com aproximadamente 1,0 cm de comprimento, obtidos anteriormente por cultura de meristemas e inoculados em meio MS (Murashige & Skoog 1962), com pH ajustado para 6 e solidificado com ágar 6,0 g/l.

Pesquisaram-se as seguintes combinações de reguladores de crescimento: a) BAP nas concentrações de: 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/l e GA₃ 0,0; 0,01; 0,1 e 1,0 mg/l, com acréscimo de 0,01 mg/l de ANA; b) BAP 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/l, e ANA 0,0; 0,001; 0,01 e 0,1 mg/l, com acréscimo de 0,1 mg/l de GA₃; e, c) GA₃ 0,0; 0,01; 0,1 e 1,0 mg/l e ANA 0,0; 0,001; 0,01 e 0,1 mg/l com acréscimo de 1,0 mg/l de BAP. Após a inoculação de um broto por tubo, manteve-se o material em sala de crescimento com temperatura variando entre 22 e 26°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa cerca de 3000 lux.

As avaliações foram efetuadas após 28 dias de cultivo, através do número total de brotos e número de brotos superiores a 1,0 cm. O delineamento experimental utilizado para todos os ensaios foi inteiramente casualizado, composto de 20 tratamentos e 20 repetições. A análise estatística foi efetuada em esquema fatorial.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeitos de benzilaminopurina combinada com ácido naftaleno acético

Houve significância estatística para número total de brotos em ambos os fatores e inclusive na interação. No entanto, o número de brotos maiores que 1,0 cm mostrou significância estatística apenas para BAP.

A melhor concentração de BAP utilizada na proliferação total de brotos foi de 1,0 mg/l, independentemente, dos níveis de ANA, com produção em média de 5,58 brotações por explante cultivado. A aplicação de ANA também apresentou efeito significativo, sendo que a melhor dose foi de 0,01 mg/l, produzindo, em média, 4,42 novas brotações por explante. Para proliferação total de brotos, a interação entre BAP e ANA foi significativa estatisticamente, sendo que para a dose de 1,0 mg/l de BAP o melhor nível de ANA foi de 0,01 mg/l, que produziu 6,1 novas brotações por explante (Tabela 1 e Fig. 1 e 2).

Para o número de brotos superiores a 1,0 cm, os melhores níveis de BAP utilizados foram de 0,0; 0,5 e 1,0 mg/l, independentemente do ANA, produzindo, em média, 1,11; 1,00 e 0,92 novas

TABELA 1. Média do número total de brotos por explante do porta-enxerto M-7, nas diferentes concentrações de BAP e ANA (mg/l). ESAL. Lavras, MG, 1990.

ANA (mg/l ¹)	BAP (mg/l ¹)					Média
	0	0,5	1,0	2,0	4,0	
0	2,8	4,4	4,9 abcd	4,3	2,9	3,89 AB
0,001	3,3	4,2	5,5 abc	4,9	3,9	4,38 AB
0,01	3,5	4,1	6,1 a	4,4	4,1	4,42 A
0,1	2,9	4,9	5,8 ab	3,0	2,9	3,89 AB
Média	3,11 C	4,42 B	5,58 A	4,17 B	3,44 C	

As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%. As letras maiúsculas são referentes às comparações entre níveis, e as minúsculas, à interação BAP x ANA.

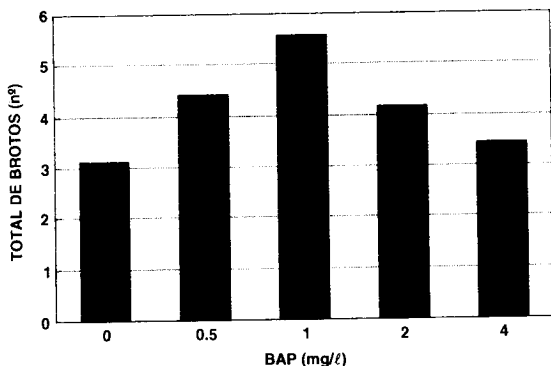


FIG. 1. Média do número total de brotos por explante do porta-enxerto M-7 nas diferentes concentrações de BAP. Lavras, MG, 1990.

brotações por explante. Não foi observado efeito significativo na aplicação de ANA (Tabela 2 e Fig. 3).

Efeitos de benzilaminopurina combinada com ácido giberélico

Houve diferenças significativas a 1%, tanto em número total de brotos como em número de brotos superiores a 1,0 cm apenas para BAP; para GA₃, na interação entre estes dois fatores, não houve significância estatística.

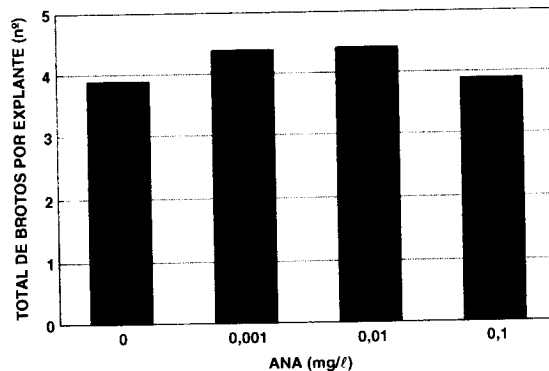


FIG. 2. Média do número total de brotos por explante do porta-enxerto M-7 nas diferentes concentrações de ANA. Lavras, MG, 1990.

TABELA 2. Média do número de brotos superiores a 1,0 cm por explante do porta-enxerto M-7 nas diferentes concentrações de BAP e ANA (mg/l). ESAL. Lavras, MG, 1990.

ANA (mg/l ¹)	BAP (mg/l ¹)					Média
	0	0,5	1,0	2,0	4,0	
0	1,0	0,9	1,1	0,5	0,2	0,74 A
0,001	1,1	1,0	1,0	0,3	0,3	0,74 A
0,01	1,2	1,0	0,8	0,4	0,2	0,72 A
0,1	1,1	1,1	0,8	0,2	0,2	0,68 A
Média	1,11 A	1,00 A	0,92 A	0,39 B	0,25 B	

As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

Com relação ao número total de brotos, os melhores níveis de BAP aplicados foram de 1.0 e 2,0 mg/l (Tabela 3 e Fig. 4).

Para número de brotos superiores a 1 cm o melhor resultado foi conseguido com aplicação de 0,5 mg/l de BAP (Tabela 4 e Fig. 5).

Efeitos de ácido naftaleno acético combinado com ácido giberélico

Houve significância estatística a 1% em GA₃, para o número total de brotos, e a 5% para número de brotos superiores a 1,0 cm. Em ANA, não

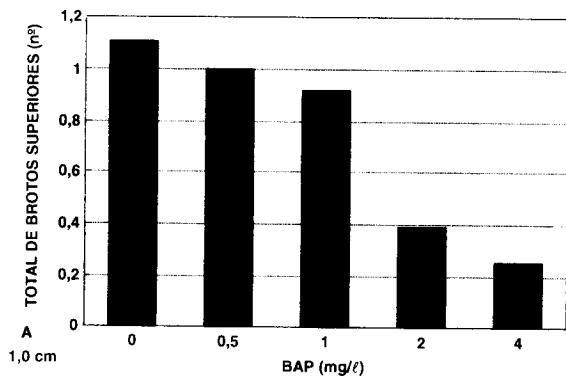


FIG. 3. Média do número de brotos superiores a 1,0 cm de comprimento por explante do porta-enxerto M-7 nas diferentes concentrações de BAP. Lavras, MG, 1990.

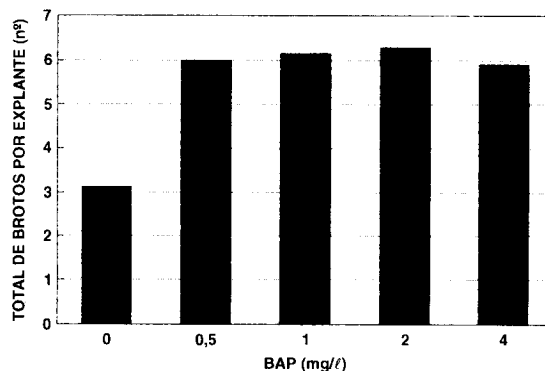


FIG. 4. Média do número total de brotos por explante do porta-enxerto M-7 nas diferentes concentrações de BAP. Lavras, MG, 1990.

TABELA 3. Média do número de brotos superiores a 1,0 cm por explante do porta-enxerto M-7 nas diferentes concentrações de BAP e ANA (mg/l). ESAL. Lavras, MG, 1990.

GA ₃ (mg/l ¹)	BAP (mg/l ¹)					Média
	0	0,5	1,0	2,0	4,0	
0	3,6	5,6	5,6	6,7	5,1	5,32 A
0,01	2,7	6,1	7,2	6,3	6,2	5,70 A
0,1	3,3	6,1	5,5	6,0	4,6	5,10 A
1,0	2,7	6,0	6,1	6,0	4,3	5,02 A
Média	3,13 C	5,97 AB	6,13 A	6,28 A	5,09 B	

As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

houve significância estatística na interação entre GA₃ e ANA.

As melhores taxas de multiplicação foram obtidas na ausência e na presença de 0,1 mg/l de GA₃ (Tabela 5 e Fig. 6).

Em relação ao número de brotos superiores a 1,0 cm, a adição de GA₃ a 0,1 mg/l proporcionou a melhor taxa de multiplicação (Tabela 6 Fig. 7).

De modo geral, o BAP mostrou-se necessário à multiplicação de brotos em concentrações mais elevadas para o número total de brotos do que para número de brotos superiores a 1,0 cm. Esta observação está de acordo com a expectativa de

TABELA 4. Média do número de brotos superiores a 1,0 cm por explante do porta-enxerto M-7 nas diferentes concentrações de BAP e GA₃ (mg/l). ESAL. Lavras, MG, 1990.

GA ₃ (mg/l ¹)	BAP (mg/l ¹)					Média
	0	0,5	1,0	2,0	4,0	
0	1,4	1,2	0,7	0,4	0,4	0,82 A
0,01	0,7	1,2	0,7	0,5	0,4	0,70 A
0,1	0,7	1,5	1,1	0,0	0,2	0,70 A
1,0	1,0	1,5	0,9	0,7	0,2	0,86 A
Média	0,97 B	1,38 A	0,88 A	0,41 C	0,31 C	

As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

que maiores concentrações de BAP promovam a formação de grande número de brotos, em detrimento, porém, de seu desenvolvimento. Desta forma, se o objetivo é produzir brotos maiores para posterior enraizamento, pode-se trabalhar com doses mais baixas de BAP.

Estes dados confirmam citações de Lane (1978), de que a adição de BAP a 1,0 mg/l é fundamental para o crescimento e desenvolvimento de meristemas e gemas de macieira. Corroboram, ainda, com as afirmações de Hicks & Nair (1986) de que há um efeito benéfico de BAP a 0,1 e 1,0 mg/l sobre a proliferação de brotações em diversos porta-enxertos de macieira, e com Barbo-

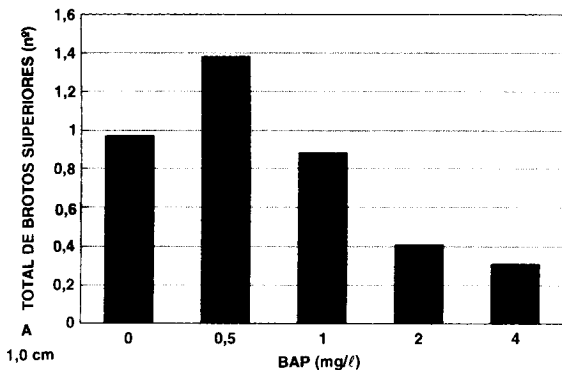


FIG. 5. Média do número de brotos superiores a 1,0 cm de comprimento por explante do porta-enxerto M-7 nas diferentes concentrações de BAP. Lavras, MG, 1990.

TABELA 5. Média do número de brotos superiores a 1,0 cm por explante do porta-enxerto M-7 nas diferentes concentrações de GA₃ e ANA (mg/l). ESAL. Lavras, MG, 1990.

ANA (mg/l ¹)	GA ₃ (mg/l ¹)					Média
	0	0,01	0,1	1,0	10,0	
0	3,4	3,6	3,3	2,6	2,7	3,12 A
0,001	3,0	3,0	3,3	3,0	2,4	2,94 A
0,01	3,3	3,1	3,4	3,0	2,4	3,04 A
0,1	3,8	2,9	3,6	2,7	2,4	3,08 A
Média	3,38 A	3,15 AB	3,40 A	2,83 BC	2,48 C	

As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

sa et al. (1986), que identificaram melhores resultados em algumas cultivares e seleções de macieira quando da aplicação de 5.0 a 7,5 mg/l de BAP.

Os efeitos significativos da citocinina no meio de cultura sobre a multiplicação *in vitro* da macieira podem ser explicados através da ação das citocininas na quebra da dominância apical, que apresenta como consequência a indução de brotações adventícias. Estes efeitos provenientes da aplicação da citocinina sobre a proliferação de brotos pode ocorrer também devido ao baixo nível endógeno em que o BAP se encontra nos explantes.

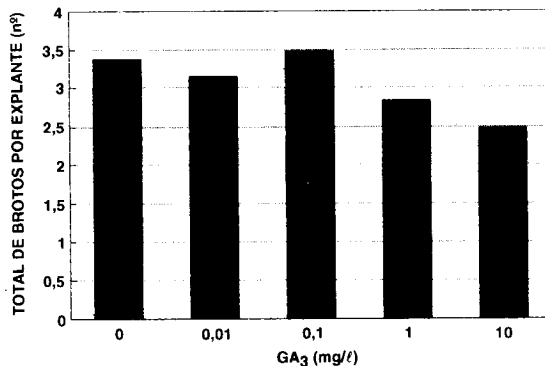


FIG. 6. Média do número total de brotos por explante do porta-enxerto M-7 nas diferentes concentrações de GA₃. Lavras, MG, 1990.

TABELA 6. Média do número de brotos superiores a 1,0 cm por explante do porta-enxerto M-7 nas diferentes concentrações de GA₃ (mg/l). ESAL. Lavras, MG, 1990.

ANA (mg/l ¹)	GA ₃ (mg/l ¹)					Média
	0	0,01	0,1	1,0	10,0	
0	0,6	0,9	1,0	1,0	0,9	0,88 A
0,001	0,9	1,0	1,0	1,0	1,0	0,98 A
0,01	0,9	1,0	1,1	1,0	0,9	0,98 A
0,1	0,9	1,0	1,0	1,0	1,0	0,98 A
Média	0,83 B	0,98 AB	1,03 A	1,00 AB	0,95 AB	

As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

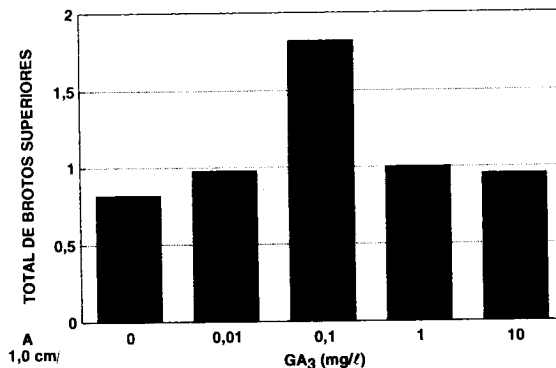


FIG. 7. Média do número de brotos superiores a 1,0 cm de comprimento por explante do porta-enxerto M-7 nas diferentes concentrações de GA₃. Lavras, MG, 1990.

Os resultados obtidos com GA₃ discordam, em parte, das afirmações de Lane (1978), Lundergan & Janick (1980) e Cheema & Charma (1983), de ser o GA₃ dispensável na multiplicação de brotações da macieira, e estão concordantes com Snir & Erez (1983), que afirmam ser o GA₃ indicado para obtenção de brotações alongadas, apropriadas para enraizamento.

Os poucos efeitos observados sobre a proliferação de brotações no porta-enxerto testado, podem também estar relacionados ao fato de que as giberelinas, quando submetidas à autoclavagem, perdem cerca de 90% de sua atividade biológica. Desta forma, haveria necessidade de concentrações mais elevadas, ou então, fazer a esterilização do GA₃ a frio, evitando os danos causados pelo calor, ao qual as giberelinas são altamente sensíveis.

O ANA mostrou efeitos positivos para o M-7 apenas para número total de brotos, o que concorda com vários autores, entre os quais Dunstan et al. (1985), que observaram estímulo à produção de brotações com a aplicação de pequenas doses de AIB.

Apesar das divergências com relação à utilização do ANA na multiplicação, vários trabalhos (Snir & Erez 1980, Cheema & Sharma 1983, entre outros) mostraram que a aplicação de pequenas concentrações de auxina combinadas com BAP induzem a proliferação de brotos, o que confirma os dados obtidos neste trabalho para o porta-enxerto M-7, onde houve interação significativa entre BAP e ANA para número total de brotos.

CONCLUSÕES

1. A citocinina é essencial para a multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira M-7.
2. Melhores resultados foram obtidos tanto para produção total de brotos como para produção de brotos superiores a 1,0 cm, com a utilização de BAP nas concentrações de 0,5 a 2,0 mg/l.
3. Não há necessidade de se adicionar GA₃ ao meio de cultura em associação ao BAP para multiplicação de brotações.

4. O ANA é dispensável durante a fase de multiplicação de brotações.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, A.J.; WHITELEY, E. Culture of malus tissues *in vitro*. I. Multiplication of apple plants from isolated shoot apices. **Scientia Horticulturae**, v.4, p.183-189, 1976.
- BARBOSA, W.; DALL'ORTO, F.A.C.; OJIMA, M.; CAMPOS, S.A.F.; TOMBOLATO, A.F.C. Propagação vegetativa *in vitro* de cultivares de macieira. **Bragantia**, v.45, p.143-154, 1986.
- CHEEMA, G.S.; SHARMA, D.P. *In vitro* propagation of apple rootstock EMLA 25. **Acta Horticulturae**, v.131, p.75-89, 1983.
- DUNSTAN, D.I.; TURNER, K.E.; LAZAROFF, W.R. Propagation *in vitro* of apple rootstock M.4: effect of phytohormones on shoot quality. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.4, p.55-60, 1985.
- HICKS, G.S.; NAIR, A. Growth and morphogenesis in short term nodal cultures of an apple rootstock *in vitro*. **Canadian Journal of Botany**, v.64, p.2299-2304, 1986.
- JONES, O.P.; PONTIKIS, C.A.; HOPGOOD, M.E. Propagation *in vitro* of five scion cultivars. **Journal of Horticultural Science**, v.54, p.15-18, 1979.
- LANE, W.D. Regeneration of apple plants from shoot meristem tips. **Plant Science Letters**, v.13, p.281-285, 1978.
- LUNDERGAN, C.A.; JANICK, J. Regulation of apple shoot proliferation and growth *in vitro*. **Horticultural Research**, v.20, p.19-24, 1980.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- OCHATT, S.J.; CASO, H.C. *In vitro* meristem culture of M.4 apple (*Malus pumila* Mill). I. Optimal nutrient medium. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.2, p.39-48, 1983.
- SNIR, I.; EREZ, A. *In vitro* propagation of malling merton apple rootstocks. **HortScience**, v.15, p.597-598, 1980.