

USO DO ÁCIDO INDOLBUTÍRICO E DO ESCURO NO ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA 'MARUBAKAIDO'

USING OF INDOLILBUTYRIC ACID AND OF DARKNESS IN *IN VITRO* ROOTING OF THE APPLE ROOTSTOCK 'MARUBAKAIDO'

Geni Carmen Zanol¹ Gerson Renan de Luces Fortes² João Baptista da Silva³
Janine Taveres Camargo Faria¹ Rosete Aparecida Gottinari¹ Alberto Quesada Centellas¹

RESUMO

O trabalho teve por objetivo estudar o enraizamento *in vitro* do porta-enxerto 'Marubakaido' (*Malus prunifolia* Borkh), visando a diminuir os efeitos prejudiciais causados pelo excesso de auxina. Foram utilizadas brotações do porta-enxerto 'Marubakaido' com três pares foliares (2,5 a 3cm), oriundas do processo de multiplicação *in vitro*. O meio utilizado foi o MS/2 acrescido de 100mg/l de mio-inositol, 30g/l de sacarose e 6g/l de ágar. O pH foi ajustado para 5,9, antes da colocação do ágar. Avaliou-se três períodos (2, 4 e 6 dias) de permanência dos explantes no escuro e três concentrações (0,0; 1,0 e 3,0µM) de ácido indolbutírico (AIB). Após a permanência dos explantes nos devidos períodos de escuro, estes foram transferidos para meio sem reguladores e acondicionados em sala de crescimento, sob condições de 16h de fotoperíodo, 25 ± 2°C e 2000 lux. A ausência e a menor concentração de AIB reduziram a percentagem de enraizamento de acordo com os aumentos nos períodos de escuro, mostrando um efeito linear negativo. Para o nível mais elevado da auxina não se observou diferenças no enraizamento para todos os períodos de escuro, apresentando índices superiores a 80%. Na presença da auxina houve um incremento no número de raízes para os aumentos do período de escuro. Houve formação de raízes bem desenvolvidas com formação de calo somente na cicatrização do corte. As plântulas apresentaram um incremento gradual da área foliar com o aumento da concentração de AIB e do período de permanência no escuro. Maiores percentagens de sobrevivência foram obtidas com aumentos na concentração de AIB e períodos de escuro. Melhor qualidade das plântulas foi observada com um período de seis dias de escuro e 3,0µM de AIB.

Palavras chave: AIB, enraizamento *in vitro*, escuro, *Malus*.

SUMMARY

The this work was improve *in vitro* rooting percent-age and quality of the apple rootstock 'Marubakaido' (*Malus*

prunifolia Borkh.) through reduction of the damaging effects caused by excess auxin during rooting period. Shoots with three pair leaves (2.5 - 3.0 cm) derived from the *in vitro* multiplication process were utilized. The medium used had MS vitamins and salts MS/2, 100mg/l¹ myo-inositol, 30 g/l¹ sucrose and 6 g/l¹ agar. The pH was adjusted to 5.9 before adding the agar. The shoots remained 2, 4 and 6 days in the dark under three IBA concentrations as follows: 0; 1.0 and 3.0 µM. After that period they transferred to a medium without growth regulator and displayed in a growth chamber at 25 ± 2 ° C, 16 hour photoperiod and 2000 lux. The lack of IBA or its lowest concentration reduced the rooting as the darkening period increased showing a negative linear effect. For the highest auxin level it was not observed any difference in the rooting for all the darkening periods witch presented over 80 % rooting. Shoots treated witch IBA showed a higher number of roots as the darkening periods increased. It was observed that roots formed mainly in the base shoots soars. Plantlets showed gradual increase in leaf area witch the increase and IBA concentration and the period remained in the dark. The highest survival percentage occurred with higher IBA treated explants. The highest plantlet quality were obtained with 6 days darkening period under 3.0 µM IBA. Although the system IBA/darkness seems to improve quality it requires further manipulation of the individual explants and a renewed medium is also required.

Key words: darkness, IBA, *in vitro* rooting, *Malus*.

INTRODUÇÃO

A expansão e os avanços tecnológicos na cultura da macieira levaram a um aumento da demanda de mudas e uma conseqüente produção de mudas com menor controle de qualidade. O aprimoramento da técnica de micropropagação visando a

¹Engenheiro Agrônomo, Aluno de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

²Engenheiro Agrônomo, Doutor, Pesquisador da EMBRAPA/CPACT, C.P 403, 96001-970, Pelotas, RS. Autor para correspondência.

³Engenheiro Agrônomo, Professor Doutor Livre Docente do Instituto de Física e Matemática/UFPel.

aumentos na velocidade de proliferação e da capacidade de enraizamento, assim como o aumento da sobrevivência durante a aclimação, é de suma importância para a viabilização econômica na produção de mudas. O porta-enxerto 'Marubakaido', espécie selvagem de origem japonesa, vem despertando grande interesse entre os produtores e pesquisadores devido a sua alta adaptabilidade e resistência à *Phytophthora*. Entretanto, apesar de mostrar um bom índice de enraizamento *in vitro*, apresenta suas raízes de baixa qualidade, prejudicando o seu desempenho durante a aclimação.

A rizogênese depende das interações entre os fatores endógenos, como fitohormônios, cofatores, nutrientes, fase de desenvolvimento da planta mãe, e os fatores ambientais, como a temperatura, luz e umidade, entre outros (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

Auxinas e citocininas são exigidas em proporções adequadas para a formação de brotos ou raízes adventícias, as quais variam com as diversas espécies vegetais. Os tipos e as concentrações de auxinas são as variáveis que, em geral, mais influenciam o enraizamento (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990). Para o enraizamento *in vitro* da macieira, a auxina mais utilizada é o ácido indolbutírico (AIB). Concentrações de AIB, variando de 1 a 3mg/l, são freqüentemente utilizadas, conforme relataram diversos autores (WERNER & BOE, 1980; SRISKANDARAJAH *et al.*, 1982).

ZIMMERMAN (1984) afirma que a melhor concentração de auxina é a mínima necessária para proporcionar uma iniciação radicular satisfatória, desde que esta possibilite o maior crescimento e desenvolvimento das raízes sem a formação de calo. No entanto, mesmo em baixas concentrações, a presença da auxina durante todo o período de enraizamento pode tornar-se prejudicial ao desenvolvimento das mesmas.

A luz geralmente tem um efeito negativo sobre a formação de raízes. As plantas mantidas no escuro (estioladas) enraízam com maior facilidade que as crescidas diretamente na luz (HARTMANN *et al.*, 1990). Este comportamento também é observado sob condições de cultivo *in vitro*. O estiolamento causa uma série de modificações anatômicas e fisiológicas, como a redução das fibras do floema, promoção do alongamento da parede celular e aumento dos tecidos indiferenciados do parênquima. Alterações bioquímicas também são induzidas pelo escuro, como o aumento do nível de auxinas e cofatores na zona de estiolamento, sendo consideradas favoráveis ao enraizamento. Entretanto, existem dúvidas sobre a ligação direta entre estruturas histológicas e rizogênese (PIERIK, 1990).

Segundo QUOIRIN & LEPROIVE (1977) houve um aumento na porcentagem do enraizamento quando as brotações de *Prunus cerasus* foram mantidas no escuro durante os primeiros nove dias da fase de enraizamento. WELANDER (1983), trabalhando com o porta-enxerto de macieira M26, obteve maior enraizamento quando os explantes foram mantidos no escuro durante os primeiros cinco dias do período de enraizamento. No entanto, resultados discrepantes foram observados por DAMIANO *et al.*, (1991) ao trabalharem com a cultivar de amendoeira 'Fascionello', que enraizou somente quando foi submetida ao escuro durante todo o processo de enraizamento.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do escuro e do contato das brotações com auxina por um período reduzido, com a finalidade de melhorar a qualidade do enraizamento *in vitro* do porta-enxerto 'Marubakaido', visando-se, assim, a obtenção de maior número de mudas deste porta-enxerto.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos da EMBRAPA-CPACT, Pelotas, RS. Utilizaram-se brotações com 1,5 a 2,0cm de comprimento do porta-enxerto 'Marubakaido' oriundas do processo de multiplicação *in vitro*. O meio utilizado continha as vitaminas e sais de MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) reduzidos pela metade, acrescidos de 100mg/l de mio-inositol, 30g/l de sacarose e 6g/l de ágar. O pH foi ajustado para 5,9 antes da autoclavagem. Avaliou-se três períodos (2, 4 e 6 dias) de permanência dos explantes no escuro e três concentrações (0,0; 1,0 e 3,0 μ M) de AIB. Aproximadamente, 40ml de meio foram distribuídos em frascos de 250ml. Ao se fazer a transferência dos explantes do escuro para a luz, os tratamentos foram colocados em novo meio, sem a presença de AIB, sendo acondicionados em sala de crescimento sob condições de 25 \pm 2 °C, 16 horas de fotoperíodo e luminescência em torno de 2.000 lux, permanecendo 21 dias em meio de cultura. As variáveis analisadas foram: porcentagem de enraizamento, número e comprimento de raízes, intensidade de formação de calo (foram atribuídas notas de 0 a 3, sendo 0 a ausência de calo e 3 a intensidade máxima de formação) e área foliar. Os dados referentes a porcentagem foram transformados em arcoseno; as variáveis numéricas foram transformadas para raiz quadrada; as notas referentes ao calo foram transformadas para logaritmo. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com seis repetições. Cada repetição constou de um frasco com 10

brotações. As variáveis foram analisadas através da análise de regressão linear, complementando a análise da variação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração mais baixa de AIB, bem como a sua ausência, reduziram a percentagem de enraizamento de acordo com os aumentos nos períodos de escuro. Para o nível mais elevado de AIB não foram observadas diferenças no enraizamento para todos os períodos de escuro, apresentando um índice de enraizamento superior a 80% (Figura 1).

Em todos os tratamentos houve um incremento no número de raízes por explante, para os aumentos do período de escuro (Figura 2).

Não foram observadas diferenças significativas para o comprimento das raízes e formação de calo (Tabela 1). Porém, houve formação de raízes bem desenvolvidas, com formação de calo somente na cicatrização do corte, o que proporcionou um ótimo padrão das plântulas. GRATTAPAGLIA & MACHADO (1990) citam que a toxidez da auxina,

durante o enraizamento, pode manifestar-se na fase de alongamento das raízes, o que impede o crescimento das mesmas. Este efeito foi demonstrado, utilizando-se este mesmo porta-enxerto, no qual as brotações permaneceram em contato com o AIB (1 a 3µM) durante todo o período de enraizamento *in vitro*, havendo intensa formação de calo na base dos explantes, prejudicando o desenvolvimento das raízes e o alongamento da parte aérea (ZANOL, 1996). Observou-se, neste experimento, que a transferência das brotações para meio, sem a presença de auxina, pode reverter estes efeitos prejudiciais. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por ZIMMERMAN & BROOME (1981) e WELANDER (1983) e, mais recentemente por LOPES *et al.* (1992). Entretanto, esta metodologia não pode ser generalizada, pois ZIMMERMAN (1984), trabalhando com várias cultivares de macieira, verificou diferenças significativas no enraizamento entre estas cultivares.

Outros importantes efeitos da transferência para meio, sem a presença de auxina e dos períodos de exposição ao escuro, foram observados na área foliar média por explante e na percentagem de sobrevivência. Houve um incremento gradual da área foliar com o aumento da concentração de AIB e dos períodos de escuro, mostrando um efeito linear positivo. A concentração mais elevada desta auxina promoveu o aumento mais significativo da área foliar, independente dos períodos de escuro (Figura 3). Maiores percentagens de sobrevivência também foram obtidas com aumentos na concentração de AIB e períodos de escuro (Figura 4).

Verificou-se que, apesar do escuro, na ausência e menor concentração de AIB, promover uma leve diminuição do enraizamento, mostrou-se favo-

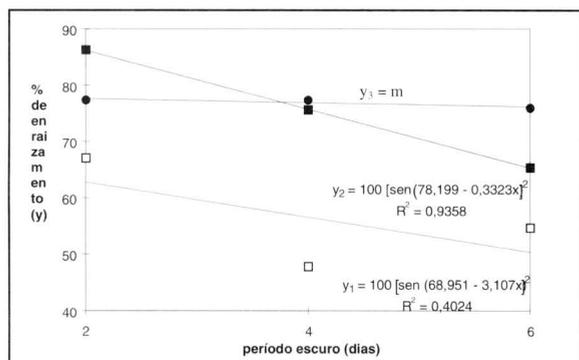


Figura 1 - Percentagem de enraizamento final do porta-enxerto 'Marubakaido' em função dos períodos de escuro e as concentrações □ 0, ■ 1,0 e ● 3,0 µM de AIB. EMBRAPA-CPACT, Pelotas, RS, 1996.

Tabela 1 - Médias para o comprimento de raízes e intensidade de formação de calo na base de brotações do porta-enxerto 'Marubakaido', para os níveis de AIB. EMBRAPA-CPACT, Pelotas, RS, 1996.

Concentrações de AIB (µM)	Compr. das raízes (cm)	Int. de formação de calo
0,0	2,73 a *	0,0 a
1,0	3,08 a	0,28 a
3,0	3,41 a	0,35 a
CV (%)	11,30	9,20

* Médias não seguidas por letras iguais diferem pelo teste de Duncan a nível de 1% de probabilidade.

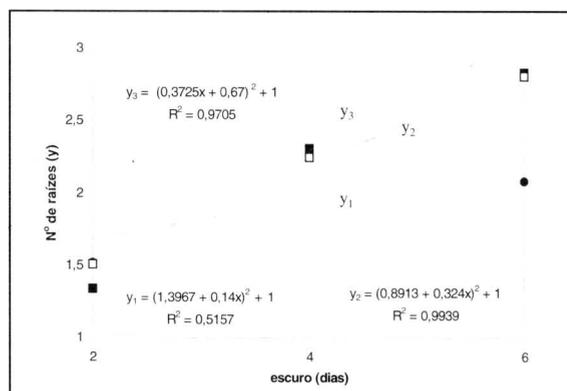


Figura 2 - Número de raízes de brotações do porta-enxerto 'Marubakaido' para os períodos de escuro e as concentrações de AIB □ 0,0; ■ 1,0; ● 3,0 µM. EMBRAPA-CPACT, Pelotas, RS, 1996.

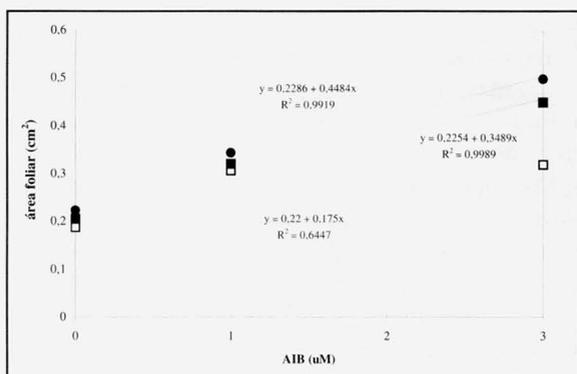


Figura 3 - Área foliar das brotações do porta-enxerto 'Marubakaido' para □ 2, ■ 4 e ● 6 dias de escuro para os níveis de AIB, após 21 dias de inoculação. EMBRAPA-CPACT, Pelotas, RS, 1996.

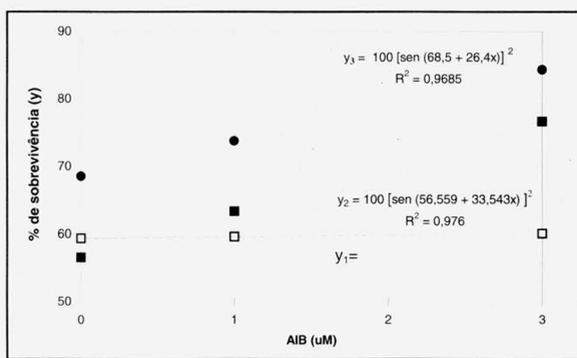


Figura 4 - Percentagem de sobrevivência das plântulas do porta-enxerto 'Marubakaido' para □ 2, ■ 4 e ● 6 dias de escuro para os níveis de AIB, após 45 dias em casa de vegetação. EMBRAPA-CPACT, Pelotas, RS, 1996.

rável, devido ao significativo aumento da área foliar e, conseqüentemente, maior percentagem de sobrevivência das plântulas em casa de vegetação. Resultados semelhantes foram obtidos por RUGINI *et al.* (1988) ao produzirem plântulas de pessegueiro e amendoeira com melhor qualidade, através do acondicionamento das brotações por um breve período de escuro. Trabalho recente, conduzido por YEO & REED (1995), demonstrou que o enraizamento de brotações, oriundas de três espécies de porta-enxerto de *Pyrus*, consideradas difíceis de enraizar, foi favorecido quando submetidas a uma semana de exposição ao escuro. Porém, a transferência das brotações para meio sem fitoreguladores possui uma desvantagem, pois aumenta o trabalho em laboratório, visto que, além de uma etapa adicional, esta operação requer a manipulação individual dos explantes (MAENE & DEBERGH, 1987). No entanto, pode apresentar como vantagem, a redução no tempo para o estabelecimento da plântula em casa de vegetação devido às plântulas apresentarem melhor qualidade.

CONCLUSÕES

A exposição das brotações do porta-enxerto 'Marubakaido' ao escuro e ácido indolbutírico, com posterior transferência destas para meio sem reguladores de crescimento, aumenta a qualidade do enraizamento *in vitro*. Melhor qualidade das plântulas produzidas é obtida através da exposição das brotações a 3µM de ácido indolbutírico e um período de seis dias de exposição ao escuro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DAMIANO, C., CHIAROTI, A., CABONI, E. *et al.* Some factors affecting the induction and expression of rooting in different fruit species *in vitro*. *Acta Horticulturae*, The Hague, v. 300, p. 211-225, 1991.
- GRATTAPAGLIA, D., MACHADO, M. Micropropagação. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S. (eds). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ABCTP/ EMBRAPA/ CNPH. 1990, p. 99-169.
- HARTMANN, H.T., KESTER, D.E., DAVIES, F.T. *Plant propagation*. Singapore: Prentice-Hall. 1990, 647 p.
- LOPES, L., RIBAS, F., ZANETTE, F. Propagação da cultivar Gala por cultura de meristema. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Brasília, v. 4, n. 1, p. 39-43, 1992.
- MAENE, L.J., DEBERGH, P.C. Optimization of the transfer of tissue cultures shoots to *in vitro* condition. *Acta Horticulturae*, The Hague, v. 12, p. 335-342, 1987.
- MURASHIGE, T.L., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- PIERIK, R.L.M. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*, Madrid, Espanha: Ed. Mundialense, 1990, 295 p.
- QUOIRIN, M., LEPROIVE, P. Improved media for *in vitro* culture of *Prunus sp.* *Acta Horticulturae*, The Hague, v. 78, p. 437-442, 1977.
- RUGINI, E., BAZZOFFIA, A., JACOBINI, A. A simple *in vitro* method to avoid the initial dark period and to increase rooting in fruit trees. *Acta Horticulturae*, The Hague, v.227, p. 438-440, 1988.
- SRISKANDARAJAH, S., MULLINS, M.G., NAIR, Y. Induction of adventitious rooting *in vitro* in difficult-to-propagate cultivars of apple. *Plant Science Letters*, Amsterdam, v. 24, p. 1-9, 1982.
- WELANDER, M. *In vitro* rooting of the apple rootstock M26 in adult and juvenile growth phases and acclimatization of the plantlets. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 58, p. 231-238, 1983.
- WERNER, E.M., BOE, A.A. *In vitro* propagation of Malling 7 apple rootstock. *HortiScience*, Alexandria, v. 15, n. 4, p. 509-510, 1980.
- YEO, D.Y., REED, B.M. Micropropagation of three *Pyrus* rootstock. *HortiScience*, Alexandria, v. 30, n. 3, p. 620-23, 1995.

ZANOL, G.C. Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto 'Marubakaido' (*Malus prunifolia*) influenciado pela exposição de períodos de escuro, ácido indolbutírico e floriglucinol. Pelotas, 1996, 101 p. (Dissertação Mestrado-Faculdade de Agronomia Eliseu-UFPEL).

ZIMMERMAN, R.H., BROOME, O.C. Phloroglucinol and *in vitro* apple cultivars cuttings. **Journal of American Society**

for Horticultural Science, Alexandria, v. 106, n. 5, p. 648-652, 1981.

ZIMMERMAN, R.H. Rooting apple cultivars *in vitro*: Interactions among light, temperature, phloroglucinol and auxin. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, The Netherlands, v. 3, p. 301-311, 1984.

Ciência Rural, v. 28, n. 3, 1998.