

# MULTIPLICAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO DA MACIEIRA INFLUENCIADA PELO TIPO DE EXPLANTE E PELO TEMPO DE PERMANÊNCIA EM MEIO DE CULTURA DE ENRAIZAMENTO<sup>1</sup>

JONNY EVERSON SCHERWINSKI PEREIRA<sup>2</sup>, GERSON RENAN DE LUCES FORTES<sup>3</sup>

**RESUMO** - O objetivo do trabalho foi verificar a influência do uso de segmentos de origem basal ou apical na multiplicação *in vitro* da macieira e do tempo de permanência das brotações em meio de enraizamento na sobrevivência das plantas na aclimatização. Explantes de macieira dos porta-enxertos 'M.111' e 'Marubakaido' de origem basal e apical, com uma gema axilar, foram inoculados em meio de cultura MS, suplementado com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Após seis semanas, avaliaram-se o número e tamanho de brotações, bem como a formação de gemas. Em seguida, brotações da cv. Marubakaido foram separadas em explantes de 2 a 2,5 cm de comprimento e inoculadas em meio de enraizamento, constituído por ½ MS suplementado com 0,2 mg.L<sup>-1</sup> de AIB, onde permaneceram por: 12; 15; 21 e 30 dias. Ao final de cada tratamento, as plântulas foram transplantadas para casa de vegetação onde, após um mês, avaliaram-se a sobrevivência e o peso da matéria seca das raízes e a parte aérea das plantas. Observou-se a formação de brotações em maior número e tamanho quando se utilizaram explantes basais para a cultivar Marubakaido e maior formação de gemas nos explantes da cultivar M.111. Na aclimatização, as plantas apresentaram taxas de sobrevivência superiores a 90%, independentemente do tempo de permanência em meio de enraizamento. Os maiores períodos de permanência das brotações em meio de enraizamento proporcionaram maior peso de matéria seca das raízes e parte-aérea das plantas em casa de vegetação.

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

## APPLE MULTIPLICATION AND ACCLIMATIZATION INFLUENCED BY THE EXPLANT TYPE AND TIME OF EXPOSITION IN ROOT CULTURE MEDIA

**ABSTRACT** - This work aimed to verify the influence of basal and apical segments on the *in vitro* apple multiplication and the exposition time of explants in root media on plant survival during the acclimatization. Basal and apical explants of apple, cvs. 'M.111' and 'Marubakaido', with an axillary bud were inoculated in a MS media, added of 1.0 mg.L<sup>-1</sup> BAP. After six weeks the number of shoots and buds and shoots length were evaluated. After that shoots of cv. Marubakaido were separated in explants of 2 to 2,5 cm length and inoculated in a root media, formed by MS ½ and 0.2 mg.L<sup>-1</sup> IBA, where they remained for: 12, 15, 21 and 30 days. At the end of each treatment, the plantlets were transplanted to the greenhouse where they were evaluated for survival and dry matter weight of the roots and aerial parts of the plants after one month. Higher shoot number and shoot length were observed when basal explants were used to the cv. Marubakaido and higher bud formation in the explants of M.111 cultivar. In the acclimatization, the plants presented survival rates up to 90%, independently of the remained time in the media. The longer periods that the shoots remained in the roots media provided the higher dry matter weight of roots and aerial parts of the plants at longer greenhouse.

**Index terms:** *Malus* sp., micropropagation, tissue culture.

Diferentes espécies e cultivares possuem características genéticas próprias que as fazem responder diferentemente ao cultivo *in vitro*. As diferenças na capacidade de regeneração e multiplicação podem ser explicadas pelo tipo de explante utilizado. De acordo com Pierik (1990), são comuns os efeitos da posição e idade dos explantes sobre a regeneração e multiplicação. San-José *et al.* (1998) verificaram que explantes de segmentos nodais produziram mais parte aérea do que explantes apicais em diversos clones de *Quercus robus*. A homogeneidade dos explantes é de fundamental importância na precisão da estimativa de multiplicação.

Na aclimatização, etapa compreendida entre a transferência das plântulas das condições assépticas da cultura de tecidos para casa de vegetação, apesar de fatores como substrato e umidade influenciarem na sobrevivência, o tipo e a qualidade do sistema radicular obtidos são importantes para se obter sucesso na sobrevivência. Raízes curtas, em geral, são mais desejáveis, pois, além de facilitarem seu manuseio no momento do plantio, normalmente estão numa fase de crescimento ativo, o que facilita o pegamento da planta (Grattapaglia & Machado, 1990). Por este motivo, discutem-se também os efeitos do tempo de permanência das brotações em meio de enraizamento

<sup>1</sup> Trabalho nº 113/2000. Recebido: 28/06/2000. Aceito para publicação: 13/06/2001.

<sup>2</sup> Eng. Agrº, Doutorando em Produção Vegetal, Depto de Fitotecnia, FAEM/UFPEL, Cx. Postal 354, 96001-970, Pelotas, RS.  
e-mail: jscherwi@ufpel.tche.br

<sup>3</sup> Eng. Agrº, Dr., Pesquisador da Embrapa Clima Temperado, Cx. Postal 403, 96001-970, Pelotas, RS e-mail: gerson@cpect.embrapa.br

sobre a percentagem de sobrevivência das plantas durante a aclimatização. Sugere-se que o aumento do tempo de permanência das raízes em meio de cultura pode proporcionar um rápido envelhecimento nas mesmas, tornando-as menos funcionais, e prejudicando a sobrevivência das plantas em casa de vegetação.

Este trabalho foi realizado na Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS e teve como objetivo avaliar a influência do uso de segmentos de origem basal e apical na multiplicação *in vitro* dos porta-enxertos de macieira 'M.111' e 'Marubakaido' e o tempo de permanência dos explantes da cultivar Marubakaido em meio de enraizamento sobre a sobrevivência das plantas na aclimatização.

Explante de macieira dos porta-enxertos Marubakaido e M.111 de origem basal e apical, oriundos de brotações em multiplicação *in vitro*, com 1 gema axilar, foi inoculado em meio de cultura de MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg.L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de benzilaminopurina (BAP) e 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar e mantidos em sala de crescimento por seis semanas. As variáveis avaliadas foram: número e tamanho de brotações, bem como a formação de gemas. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, sendo que cada tratamento foi repetido 5 vezes e cada repetição correspondeu a um frasco com 8 explantes.

Após a avaliação, brotações da cv. Marubakaido foram separadas em explantes de 2 a 2,5 cm de comprimento e inoculadas em meio de enraizamento onde permaneceram por 4 períodos distintos: 12; 15; 21 e 30 dias. Para o enraizamento dos explantes, utilizou-se ½ da concentração do meio de cultura MS, suplementado com 100 mg.L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,2 mg.L<sup>-1</sup> do ácido indolbutírico (AIB) e 6,0 g.L<sup>-1</sup> de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8±0,1 antes da adição do ágar, sendo este posteriormente autoclavado durante 15 minutos a 121°C, sob pressão de 1,5 atm. Neste experimento, o delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados. Cada tratamento foi repetido 6 vezes e cada repetição correspondeu a um frasco com 10 explantes.

Ao final de cada período de tratamento em meio de enraizamento, as brotações foram transplantadas para condições de casa de vegetação, em bandejas de semeadura, com substrato composto de terra de mato, casca de arroz carbonizada e esterco bovino na proporção de 3:1:1 (v/v), previamente esterilizados com brometo de metila. Durante as duas primeiras semanas, as plantas foram mantidas sob uma folha de sombrite e plástico transparente e irrigadas diariamente, procurando-se manter as folhas sempre úmidas. A aclimatização das plântulas foi realizada entre os meses de julho e agosto de 1998. Após um mês de permanência das plantas em casa de vegetação, avaliaram-se a percentagem de sobrevivência e o peso seco das raízes e parte aérea das mesmas.

Para ambos os experimentos realizados sob condições *in vitro* (multiplicação e enraizamento), utilizaram-se frascos de 250 ml com 40 ml de meio de cultura. As condições de cultivo foram: fotoperíodo de 16 horas, radiação luminosa de 19μE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias, e temperatura de 25±2°C.

Os resultados foram analisados estatisticamente com o auxílio do Sistema de Análise Estatística para microcomputadores (SANEST) (Zonta & Machado, 1984). A comparação entre médias foi realizada pelo teste de Duncan, em nível de 5% de

probabilidade. Os dados referentes a número de brotações e gemas formadas foram transformados segundo  $\sqrt{x+0,5}$ . Os dados sobre a percentagem de sobrevivência das plantas foram transformados para  $\arcsin \sqrt{x/100}$ .

Verificou-se que para a cv. Marubakaido, o uso de explantes de origem basal proporcionou a formação de um maior número de brotações com 12,04 brotos por explante, em relação ao uso de explantes de origem apical com 7,37 brotos por explante. A cv. Marubakaido mostrou-se significativamente superior à cultivar M.111 para o número de brotações formadas, independentemente da origem do explante (Tabela 1). Na cultivar M. 111, não foram verificadas diferenças significativas quanto ao número de brotações formadas, com o uso de explantes basais ou apicais (Tabela 1).

Quando se avaliou o tamanho das brotações formadas, verificou-se que, para a cv. Marubakaido, as brotações originadas de explantes basais foram as que apresentaram maior tamanho, mesmo quando comparadas com a cv. M.111, a qual não apresentou diferenças de tamanho nas brotações formadas com o uso de um ou outro explante (Tabela 1).

Houve um número significativamente maior de gemas formadas na cv. M. 111 do que na cv Marubakaido (Tabela 1). De acordo com Pierik (1990) e Grattapaglia & Machado (1990), são comuns os efeitos da posição dos explantes sobre a multiplicação *in vitro*. O uso de segmentos de origem basal e apical pode causar uma fonte de variação na resposta final e, desta forma, provocar erros na estimativa da multiplicação. Isto confirma os resultados desse trabalho e salienta a importância de se trabalhar com material vegetal homogêneo para maior precisão na estimativa da multiplicação.

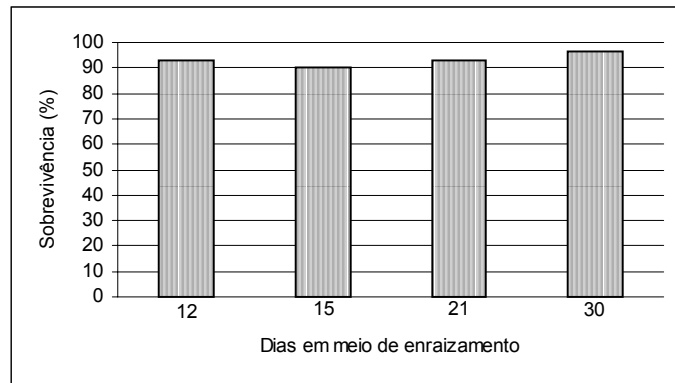
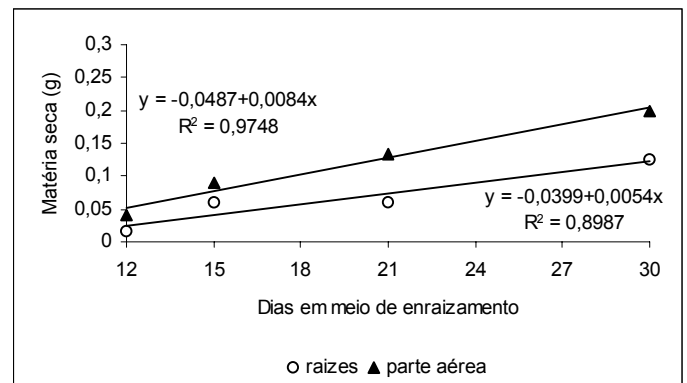
Após um mês de permanência das plantas da cv. Marubakaido em casa de vegetação, não foram verificadas diferenças significativas em relação à percentagem de sobrevivência das plantas. O transplante das brotações, após 12; 15; 21 e 30 dias de permanência em meio de enraizamento, permitiu uma taxa média de sobrevivência acima de 90% (Figura 1). Resultados semelhantes foram obtidos por Ribas (1991), trabalhando com a cultivar de macieira Gala, clone FZ, que observou que períodos de 12; 15 e 20 dias também não apresentavam diferenças significativas na taxa de sobrevivência nas plantas, variando entre 92,19 e 100%. Grattapaglia & Machado (1990) sugerem que, após os primeiros sinais de emergência das raízes *in vitro*, as plantas devem ser imediatamente transplantadas. Isso confirma os resultados desse trabalho, visto que, após 12 dias de permanência das brotações em meio de enraizamento, se observou o surgimento das primeiras raízes. Porém, é necessário lembrar que outros fatores devem ser observados nesse processo. Assim, além da manutenção da alta umidade durante os primeiros dias de aclimatização, o tipo de substrato, bem como a época do ano, parece influenciar esta variável. Pereira et al. (1998), trabalhando com a mesma cultivar, observaram uma taxa média de sobrevivência menor (71,2%), quando as plântulas foram aclimatadas durante os meses mais quentes do ano (dezembro e janeiro), confirmando os resultados obtidos por Werner & Boe (1980) que obtiveram os melhores resultados quando as plântulas foram aclimatizadas no outono e inverno.

Apesar de não haver diferença significativa na percentagem de sobrevivência das plantas, esta ocorreu com

**TABELA 1** - Influência do uso de segmentos basais e apicais no número e tamanho de brotações e número de gemas formadas nas cultivares de macieira Marubakaido e M.111, após seis semanas de cultivo *in vitro*. Pelotas, RS, 1998.

Cultivar	Número de Brotações		Tamanho das Brotações (cm)		Número de Gemas	
	Basal	Apical	Basal	Apical	Basal	Apical
Marubakaido	12,04 aA	7,37 aB	2,04 aA	1,68 aB	4,77 bB	5,97 bA
M.111	4,10 bA	4,04 bA	1,64 bA	1,67 aA	9,41 aA	9,84 aA

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, diferem entre si pelo teste de Duncan ( $\alpha \leq 0,05$ ).

**FIGURA 1** - Tempo de permanência das brotações de macieira da cultivar Marubakaido em meio de enraizamento e sobrevivência das plantas na aclimatização. Pelotas - RS, 1998.**FIGURA 2** - Peso da matéria seca das raízes e parte aérea das plantas de macieira da cultivar Marubakaido aclimatizadas em função do tempo de permanência das brotações em meio de enraizamento. Pelotas - RS, 1998.

respeito ao peso da matéria seca das raízes e parte aérea (Figura 2). Observou-se um comportamento linear no peso da matéria seca, tanto da parte aérea como das raízes, com o aumento do tempo de permanência das brotações em meio de enraizamento. Assim, quanto menor o tempo de permanência das brotações em contato com o meio, menor foi o tamanho do sistema radicular e da parte aérea destas plantas em casa de vegetação e, desta forma, originou plantas de menor vigor. Resultados obtidos anteriormente (dados não publicados) demonstraram que uma permanência mais prolongada das brotações em meio de cultura de enraizamento produziu plântulas com parte aérea bastante desenvolvida. Por terem uma alta razão entre parte aérea e raiz, estas plantas tendem a apresentar problemas de sobrevivência, devido à elevada transpiração, com maiores possibilidades de as plantas sofrerem desidratação durante a aclimatização, principalmente se esta ocorrer nos meses mais quentes do ano.

Conclui-se que o uso de explantes basais na multiplicação *in vitro* da cv. Marubakaido proporciona aumento no número e tamanho das brotações formadas quando comparado com explantes apicais. A cv. M. 111 só mostra diferenças significativas no número de gemas formadas, sendo superior quando se usam explantes apicais. A aclimatização da cv. Marubakaido pode ser feita após 12 dias de permanência das brotações em meio de cultura de enraizamento com sobrevivência superior a 90% das plantas, verificado o período do ano, embora estas apresentem menor vigor (peso seco das raízes e parte aérea) até 30 dias de aclimatização, quando comparadas com plantas originadas de brotações que permaneceram maior período de tempo em meio de cultura de enraizamento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A.. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa CNPH, 1990. p.99-169.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, Wageningen, v.15, p.473-497, 1962.
- PEREIRA, J.E.S.; FORTES, G.R.L.; DA SILVA, J.B. Efeito das baixas temperaturas sobre o crescimento do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia* Borkh.) durante a aclimatização. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 15., 1998, Poços de Caldas. **Anais...** p. 461.
- PIERIK, R.L.M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 326p.
- RIBAS, L.L.F. **Micropropagação e estudo da parada de crescimento durante a aclimatização de mudas de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cv. Gala, clone FZ**. 1991. 142 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1991.
- SAN-JOSÉ, M.C.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A.M. Factors affecting '*in vitro*' propagation of *Quercus robur* L.. **Tree Physiology**, Palo Alto, v.4, p.281-290, 1988.

WERNER, E. M.; BOE, A. A. *In Vitro* Propagation of Mulling 7 Apple Rootstock. **HortScience**, Alexandria, v.15, n.4, p. 509-510, 1980.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. **SANEST**- Sistema de Análise Estatística para microcomputadores. Pelotas: UFPel – SEI, 1984.