

# MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA 'MARUBAKAIDO' EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO E CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO GIBERÉLICO

## MULTIPLICATION *IN VITRO* OF 'MARUBAKAIDO' APPLE ROOTSTOCK ON DIFFERENTS CULTURE MEDIA AND GIBBERELIC ACID CONCENTRATIONS

Marília Pereira MACHADO<sup>1</sup>  
Dayse Cristina de CARVALHO<sup>2</sup>  
Luiz Antonio BIASI<sup>3</sup>

### RESUMO

O porta-enxerto 'Marubakaido' é muito utilizado para a produção de mudas de macieira e tem sido multiplicado *in vitro* para a produção de plantas matrizes sadias. O protocolo de micropropagação pode ser mais eficiente a medida que seja promovido o aumento do número de brotações mais longas na fase de multiplicação. O objetivo do experimento foi testar o efeito do meio de cultura em dupla-fase e de concentrações de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) na multiplicação dessa cultivar. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados em arranjo fatorial, sendo dois tipos de meios de cultura (semi-sólido e dupla-fase) e três concentrações de GA<sub>3</sub> (0, 1 e 5 µM), com cinco repetições e quatro frascos por parcela com cinco brotações por frasco. Foram avaliados dois subcultivos, com intervalo de quarenta e cinco dias. Os parâmetros analisados foram o número de brotações por explante, altura das brotações e massa fresca dos tufo de brotações. Não ocorreu interação entre os fatores estudados. O meio de cultura dupla-fase apresentou-se superior ao meio de cultura semi-sólido em todos os parâmetros analisados nos dois subcultivos. Os explantes cultivados no meio dupla-fase formaram tufo com brotações mais altas, em maior número e com maior massa fresca. GA<sub>3</sub> não apresentou o efeito esperado de alongamento das brotações. Para a multiplicação do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' recomenda-se a utilização do meio de cultura dupla-fase, não sendo necessária a adição de GA<sub>3</sub>.

**Palavras-chave:** micropropagação, dupla-fase, regulador vegetal, *Malus prunifolia*.

### ABSTRACT

The rootstock 'Marubakaido' is very used for the production of apple plantlet and has been multiplied *in vitro* for the production of elite plants. The micropropagation protocol can be more efficient, with the increase of the number of longer shoots in the multiplication phase. The objective of the experiment was to test the effect of the culture medium double-phase and concentrations of gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) in the multiplication of this cultivar. The experimental design was a randomized complete block in a 2x3 factorial scheme two types of media (medium semisolid and double-phase) and three concentrations of GA<sub>3</sub> (0, 1 and 5 µM), with five replications, with five shoots in each vessels with four vessels in each replication. Two subcultivations had been evaluated, with interval of forty five days. The analyzed parameters had been the number of shoots for explant, height of the shoots and the cool mass of shoots. Interaction between the studied factors did not occur. The culture medium double-phase presented best to the culture medium semisolid in all the parameters analyzed in the two subcultivos. The explants cultivated in the medium double-phase had formed higher shoots, in largest number and with largest cool mass. The GA<sub>3</sub> did not present the waited effect of allonge of the shoots. For the multiplication of the rootstock of apple 'Marubakaido' use of the culture medium double-phase is recommend, not being necessary the GA<sub>3</sub> addition.

**Key-words:** micropropagation, double-phase, plant growth regulators, *Malus prunifolia*.

<sup>1</sup>Engenheira Agrônoma. Aluna do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal. Setor de Ciências Agrárias. UFPR. Rua dos Funcionários, 1540. Caixa Postal 19061, CEP 81531-990. Curitiba-PR. Autora para correspondência.

<sup>2</sup>M. Sc. Aluna do Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/Universidade de São Paulo.

<sup>3</sup>Engenheiro Agrônomo. Dr. Professor Adjunto. Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo. Setor de Ciências Agrárias. UFPR. Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq.

## INTRODUÇÃO

O porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' é muito utilizado na cultura da macieira por apresentar resistência à podridão do colo, fácil propagação por estacas dormientes, ser muito produtivo, não apresentar nódulos radiculares e ser muito vigoroso (DENARDI, 2002).

Comercialmente, os porta-enxertos de macieira são produzidos pelo método da mergulhia de cepa e mergulhia contínua realizada a campo. A micropropagação também tem sido utilizada para a multiplicação inicial de materiais isentos de vírus, proporcionando a obtenção de um elevado número de plantas em um curto espaço de tempo, atendendo de uma forma mais rápida a demanda por plantas matrizes sadias, como já vem ocorrendo em diversas biofábricas no Sul do Brasil.

Diversas pesquisas já foram realizadas com a micropropagação do porta-enxerto 'Marubakaido', obtendo-se altas taxas de multiplicação e enraizamento (NUNES *et al.*, 1999; HOFFMANN *et al.*, 2001; SOUZA, 2004). Isso demonstra que a cultivar apresenta uma excelente resposta morfogênica aos estímulos *in vitro*, principalmente dos reguladores vegetais, o que deve permitir ainda, elevar a eficiência do protocolo de micropropagação, principalmente pelo aumento do número de brotações mais alongadas na fase de multiplicação. Para isso, técnicas como o sistema de cultivo em dupla-fase e a utilização de giberelinas devem ser testadas.

As giberelinas são substâncias promotoras do crescimento, principalmente pelo efeito no alongamento celular (DAVIES, 1995). Esse efeito tem resultados práticos importantes no crescimento das plantas pelo alongamento dos entrenós, como já demonstrado nos porta-enxertos de limoeiro 'Cravo' (MODESTO *et al.*, 1996) e macieira 'Marubakaido' (PEREIRA *et al.*, 2001).

O cultivo em meio dupla-fase já apresentou aumento na eficiência da multiplicação de pereira japonesa 'Hosui', promovendo maior número de brotações por explante e maior massa fresca das brotações que o cultivo em meio semi-sólido (KADOTA *et al.*, 2001).

Esse experimento foi realizado com o objetivo de testar o efeito de diferentes meios de cultura (dupla-fase e semi-sólido) e de concentrações de ácido giberélico ( $GA_3$ ) na multiplicação do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido'.

## METODOLOGIA

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Micropropagação de Plantas do Departamento de Fitotecnica e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba – PR.

Brotações do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' (*Malus prunifolia* Borkh) com 3,0 cm

de altura, obtidas de plantas cultivadas *in vitro*, foram utilizadas como explante.

O meio de cultura utilizado foi o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com a concentração dos nitratos de amônio e de potássio reduzida a 2/3, 100  $mgL^{-1}$  de mio-inositol, 30  $gL^{-1}$  de sacarose e 2,2  $mM$  de BAP (6-benzilaminopurina). O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. No meio de cultura semi-sólido foram adicionadas 6  $gL^{-1}$  de agar (Vetec®).

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados em arranjo fatorial 2 estados físicos do meio de cultura (semi-sólido e dupla-fase) e 3 concentrações de  $GA_3$  (0, 1 e 5  $\mu M$ ), com cinco repetições, quatro frascos por parcela com cinco brotações por frasco. Foram testados dois fatores a saber: estado físico do meio de cultura (meio semi-sólido e dupla-fase) e concentrações de  $GA_3$  (0, 1 e 5  $\mu M$ ).

O  $GA_3$  foi esterilizado por filtragem e adicionado ao meio de cultura após a autoclavagem, em câmara de fluxo laminar. As brotações foram cultivadas em frascos de 250 ml com 40 ml de meio de cultura semi-sólido, e nos tratamentos que consistiram de meio de cultura dupla-fase, adicionou-se 40 ml do mesmo meio de cultura líquido sobre o meio de cultura semi-sólido. Os frascos foram vedados com tampas plásticas translúcidas e mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $25 \pm 1$  °C.

Foram avaliados dois subcultivos com intervalo de quarenta e cinco dias. Os parâmetros analisados foram o número de brotações por explante, altura das brotações e massa fresca dos tufo de brotações.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise de variância, em todos os parâmetros avaliados nos dois subcultivos não ocorreu interação entre os fatores estudados. Desta forma o efeito das concentrações de  $GA_3$  foi independente do tipo de meio de cultura (Tabela 1).

O meio de cultura dupla-fase apresentou-se superior ao meio de cultura semi-sólido em todos os parâmetros analisados nos dois subcultivos. Os explantes cultivados no meio dupla-fase formaram tufo com brotações mais altas e em maior número, ocasionando também uma superioridade na massa fresca (Tabela 1). Esse comportamento pode ter ocorrido pela maior disponibilidade dos nutrientes no meio líquido, pois nutrientes e reguladores vegetais são mais facilmente absorvidos pelas plantas em meio de cultura líquido do que em meio de cultura semi-sólido, propiciando uma maior taxa de crescimento (DE LA VINÁ *et al.*, 2001), assim como pela maior quantidade dos nutrientes, já que no meio dupla-fase havia o dobro do volume de meio de cultura em relação ao semi-sólido. O cultivo de pereira japonesa 'Hosui' em meio de cultura WPM em dupla-fase, sendo 10 ml de meio líquido sobre 30 ml de meio semi-sólido, promoveu maior formação de brotos por explante (4,7) e maior incremento da massa fresca das brotações (1559,4%) em relação ao meio

convencional, que produziu apenas 2,2 brotos por explante e 499,1% de incremento da massa fresca (KADOTA *et al.*, 2001). Apesar de conferir alta proliferação dos explantes, De La Vina *et al.* (2001) ressalta que o meio de cultura dupla-fase reduziu a capacidade de enraizamento das microestacas de *Persea americana*.

GA<sub>3</sub> não apresentou o efeito esperado na altura das brotações, já que são substâncias conhecidas pelo efeito no alongamento celular (DAVIES, 1995), ocasionando até mesmo uma redução da altura das brotações na concentração de 5 µM no segundo subcultivo (Tabela 1). Também no trabalho de Santa Catarina *et al.* (2001), foi observado efeito inibitório no alongamento das brotações na presença de GA<sub>3</sub>. Contudo, Corrêa *et al.* (1991) observaram que, independente das concentrações de BAP, o maior crescimento em altura das plantas de macieira 'Fuji' ocorreu quando adicionou-se concentrações crescentes de GA<sub>3</sub>.

O ácido giberélico tem sido utilizado para

promover o crescimento das plantas pelo alongamento dos entrenós. Entretanto, são necessárias repetidas aplicações em altas concentrações para promover o crescimento. No caso do porta-enxerto 'Marubakaido' já aclimatizado, mas em estado dormente, foram necessárias pelo menos três pulverizações com 800 mgL<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> para obter uma taxa de crescimento de 912% (PEREIRA *et al.*, 2001).

Talvez para uma melhor resposta de crescimento dessa cultivar *in vitro*, seja necessária a utilização de doses mais elevadas do fitorregulador, apesar do seu uso ter prejudicado a multiplicação do porta-enxerto 'Marubakaido', pois reduziu o número de brotações formadas por explante (Tabela 1). Mello-Farias *et al.* (1996) observaram que o GA<sub>3</sub> foi ineficaz ou mesmo inibitório para a taxa de multiplicação do porta-enxerto de pereira 'OH x F9'. O efeito negativo do GA<sub>3</sub> foi demonstrado por Fráguas *et al.* (2004), com a redução da formação e multiplicação dos brotos, clorose e necrose apical das plantas de figueira cultivadas *in vitro*.

TABELA 1 – Número de brotações por explante, altura das brotações e massa fresca dos tufos de brotações do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' em dois subcultivos de 45 dias, em diferentes meios de cultura e concentrações de ácido giberélico.

| Meios de cultura       | Número de brotações por explante <sup>1</sup> |               | Altura das brotações (cm) <sup>1</sup> |               | Massa fresca dos tufos de brotações (mg) <sup>1</sup> |               |
|------------------------|-----------------------------------------------|---------------|----------------------------------------|---------------|-------------------------------------------------------|---------------|
|                        | 1º subcultivo                                 | 2º subcultivo | 1º subcultivo                          | 2º subcultivo | 1º subcultivo                                         | 2º subcultivo |
| Dupla-fase             | 12,3 a                                        | 9,3 a         | 3,5 a                                  | 3,4 a         | 10,2 a                                                | 7,6 a         |
| Semi-sólido            | 5,7 b                                         | 6,0 b         | 2,3 b                                  | 2,3 b         | 3,2 b                                                 | 3,8 b         |
| Ácido giberélico       |                                               |               |                                        |               |                                                       |               |
| 0 µM                   | 10,3 a                                        | 8,8 a         | 2,9 a                                  | 3,0 a         | 8,0 a                                                 | 6,0 a         |
| 1 µM                   | 8,1 b                                         | 8,2 a         | 2,8 a                                  | 2,9 a         | 5,7 b                                                 | 5,9 a         |
| 5 µM                   | 8,5 b                                         | 6,0 b         | 3,0 a                                  | 2,7 b         | 6,4 b                                                 | 5,2 a         |
| C.V. (%)               | 14,6                                          | 18,4          | 7,5                                    | 5,7           | 12,8                                                  | 24,4          |
| Probabilidade          |                                               |               |                                        |               |                                                       |               |
| Meio de cultura        | 0,00001*                                      | 0,00003*      | 0,00001*                               | 0,00001*      | 0,00001*                                              | 0,0001*       |
| GA <sub>3</sub>        | 0,00317*                                      | 0,00097*      | 0,23491ns                              | 0,00046*      | 0,00008*                                              | 0,33399ns     |
| Meio x GA <sub>3</sub> | 0,50426ns                                     | 0,02652ns     | 0,87659ns                              | 0,06316ns     | 0,05254ns                                             | 0,62666ns     |
| Bloco                  | 0,25608ns                                     | 0,31248ns     | 0,57209ns                              | 0,12492ns     | 0,72104ns                                             | 0,70317ns     |

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.

\*significativo a 1%; ns – não significativo a 1%.

## CONCLUSÕES

Para a multiplicação do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' recomenda-se a utilização do

meio de cultura em dupla-fase, não sendo necessária a adição de ácido giberélico, já que esse reduz a proliferação de novas brotações.

## REFERÊNCIAS

- CORRÊA, D.M.; PASQUAL, M.; YUI, E. Concentrações de ácido giberélico e de ácido naftaleno acético na propagação *in vitro* da macieira 'Fuji'. **Ciência e Prática**, Lavras, v.15, n.1, p. 26-31, 1991.
- DAVIES, P.J. **Plant Hormones: physiology, biochemistry and molecular biology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. 833p.
- DE LA VIÑA, G.; BARCELÓ-MUÑOZ, A.; PLIEGO-ALFARO, F. Effect of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea americana* Mill microcuttings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 229-237, 2001.
- DENARDI, F. Porta-enxertos. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2002, p. 169-227.
- FRÁGUAS, C.B.; PASQUAL, M. PEREIRA, A.R. Multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L.: Efeito da cinetina e do ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 1, p. 49-55, 2004.

- HOFFMANN, A.; PASQUAL, M.; CHALFUN, N.N.J.; FRÁGUAS, C.B. Efeito da sacarose e do selamento do frasco no enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas do porta-enxerto de macieira Marubakaido. **Revista Científica Rural**, Bagé, v. 6, n. 1, p. 65-70, 2001.
- KADOTA, M.; IMIZU, K.; HIRANO, T. Double-phase *in vitro* culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear. **Scientia Horticulturae**, v. 89, p. 207-215, 2001.
- MELLO-FARIAS, P.C.; PETERS, J.A.; NAKASU, B.H. Micropropagação de porta-enxerto de pereira "Old Home x Farmingdale". **Revista Brasileira de Agrociência**, v.2, n.2, p. 71-79, 1996.
- MODESTO, J.C.; RODRIGUES, J.D.; PINHO, S.Z. Efeito do ácido giberélico sobre o comprimento e diâmetro do caule de plantas de limão 'cravo' (*Citrus limonia* Osbeck). **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 53, n. 2/3, p. 332-337, 1996.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NUNES, J.C.O.; BARPP, A.; SILVA, F.C.; PEDROTTI, E.L. Micropropagação do porta-enxerto 'Marubakaido' (*Malus prunifolia*) a partir da cultura de meristemas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 21, n. 2, p. 191-195, 1999.
- PEREIRA, J.E.S.; FORTES, G.R.L.; SILVA, J.B. Crescimento de plantas micropropagadas de macieira em casa de vegetação com aplicações de ácido giberélico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 6, p. 881-886, 2001.
- SANTA CATARINA, C.; MACIEL, S.C.; DENARDI, F.; PEDROTTI, E.L. Micropropagação do porta-enxerto de macieira seleção 69 tolerante a podridão de colo (*Phytophthora cactorum*). **Revista de Ciência Rural**, v. 31, n.5, p. 757-762, 2001.
- SOUZA, L.L. **Enraizamento a aclimação em diferentes substratos do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' (*Malus prunifolia* Borkh) micropropagado**. 2004. 46 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal). Universidade Federal do Paraná.

Recebido em 29/09/2004

Aceito em 10/06/2005