

EFEITO DE AUXINAS SINTÉTICAS NO ENRAIZAMENTO IN VITRO DA MACIEIRA¹

ALBERTO QUEZADA CENTELLAS², GERSON RENAN DE LUCES FORTES³, NILVANE TEREZINHA GHELLAR MÜLLER⁴,
GENI CARMEN ZANOL², REJANE FLORES⁴ e ROSETE APARECIDA GOTTINARI²

RESUMO - Brotações de macieira (*Malus domestica*, Borkh), cv. Fred Hough, oriundas do processo de multiplicação *in vitro*, foram inoculadas em meio MS e MS/2, testando-se os reguladores de crescimento: ácido indol-3-acético (AIA); ácido indolbutírico (AIB) e ácido naftaleno acético (ANA), nas concentrações de 0, 1, 3 e 5 μM com o objetivo de observar o efeito dessas auxinas sobre o enraizamento da cultivar. Foram acrescentadas aos meios as vitaminas MS mio-inositol (100 mg/L) e sacarose (30 g/L) em meio de ágar (6 g/L). O pH do meio foi ajustado para 5,8 e a cultura foi incubada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e 16 horas de fotoperíodo a 2.000 lux, permanecendo por 30 dias. Os tratamentos foram repetidos cinco vezes e cada repetição constou de cinco explantes inoculados em frasco de 250 mL contendo 40 mL do meio. O meio MS/2 em todas as concentrações testadas foi melhor que o MS. O ANA e o AIB, ambos na concentração de 3 μM , em meio MS/2, tiveram comportamento semelhante na porcentagem de enraizamento e no número de raízes produzidas; no entanto, o ANA provocou efeitos indesejáveis na qualidade destas, havendo formação de calo na base das brotações e raízes grossas. O AIA obteve melhor resposta nas altas concentrações, mas não foi melhor que o AIB e ANA.

Termos para indexação: micropropagação, reguladores de crescimento, ácido indol-3-acético, ácido indolbutírico, ácido naftaleno acético, *Malus domestica*.

EFFECTS OF SYNTHETIC AUXINS ON THE *IN VITRO* ROOTING OF APPLE TREE

ABSTRACT - Apple shoots (*Malus domestica*, Borkh), cv. Fred Hough derived from *in vitro* multiplication process were inoculated in MS and MS/2 basal media added by growth substances indol acetic acid (IAA); indol butiric acid (IBA) and naphtalene acetic acid (NAA) at 0, 1, 3 and 5 μM . The media also included: MS vitamins, myo-inositol (100.0 mg/L); sucrose (30.0 g/L); agar (6.0 g/L). The pH was adjusted to 5.8 before autoclaving. The treatments were incubated in a growth room at $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 16 hours photoperiod under light intensity of 2,000 lux during 30 days. The treatments were replicated five times. Each replicate was composed by a 250 mL flask containing 40 mL medium with five explants. The medium MS/2 in all the tested concentrations was better than MS. The NAA and IBA, both at 3.0 μM on MS/2 showed similar effects as percentage of rooting and number of roots are concerned. However, NAA treated explants presented a higher callus incidence at the base of shoots along with thicker roots. IAA had a better response when used in higher concentrations but it did not achieve the performance of IBA ou NAA.

Index terms: micropropagation, growth substances, indol acetic acid, indol butiric acid, naphtalene acetic acid, *Malus domestica*.

¹ Aceito para publicação em 3 de junho de 1998.

² Eng. Agr., M.Sc., UFPEL, Caixa Postal 354, CEP 96001-970 Pelotas, RS. E-mail: quezadas@ufpel.tche.br

³ Eng. Agr., Dr., Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (CPACT), Caixa Postal 403, CEP 96001-970 Pelotas, RS. E-mail: gerson@cpact.embrapa.br

⁴ Bióloga, M.Sc., UFPEL.

INTRODUÇÃO

A cultura da macieira (*Malus domestica*, Borkh), no sul do Brasil atinge uma área cultivada de 30 mil hectares. Sua produção vem se ampliando a cada ano, alcançando na safra 95/96 544 mil toneladas (Associação Brasileira de Produtores de Maças,

1997). Mesmo assim esse volume não é suficiente para atender à demanda interna, fazendo-se necessária a importação de maçã, principalmente da Argentina e do Chile.

A cv. Fred Hough foi lançada em 1994 no Brasil, pela EPAGRI - Estação Experimental de Caçador, e caracteriza-se por apresentar produtividade maior que a cv. Gala, com frutas maiores; requer menos frio hibernar; é imune à sarna; e a maturação dos frutos ocorre entre três a quatro semanas após a cv. Gala (Denardi & Camilo, 1994). A sarna (*Venturia inaequalis*) é considerada a mais freqüente doença da macieira no mundo (Westwood, 1982). No Brasil, ela ocorre em todos os Estados produtores, mas nas regiões mais altas e frias suas conseqüências são mais prejudiciais (Bleicher, 1986).

Para atender às demandas por material vegetativo de uma nova cultivar de macieira é requerida grande quantidade de material propagativo, cujas técnicas convencionais de propagação não possibilitariam alcançar tal objetivo em curto prazo. As possibilidades aumentam com o uso da técnica da micropropagação (Margara, 1988; Zimmerman, 1988).

O propósito da rizogênese é a formação de raízes adventícias nas partes aéreas obtidas no estágio de multiplicação, que permite a constituição de plantas completas, para posterior aclimação às condições *ex-vitro*. No caso da maioria das espécies lenhosas, o enraizamento é a etapa mais difícil, principalmente quando se usa material na fase adulta (Hu & Wang, 1983).

Auxinas são substâncias quimicamente relacionadas com o ácido indol-3-acético (AIA), que é a auxina principal de várias plantas. Essas substâncias têm em comum a capacidade de atuar na expansão e no alongamento celular, ajudando também na divisão celular em cultura de tecidos, principalmente no enraizamento (Krikorian, 1991). Entre outras substâncias usadas para o enraizamento *in vitro* estão o ácido naftaleno acético (ANA), o ácido 2-4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e o ácido indolbutírico (AIB) (Ross, 1992).

Na maioria das vezes, os explantes não iniciam o processo de enraizamento em meios com concentrações altas de sais, apesar das auxinas presentes. Altas concentrações de sais tendem a inibir todas as fases do enraizamento, particularmente o crescimento de

raízes. Concentrações de sais no meio diminuídas para 1/2, 1/3 ou 1/4, possibilitam melhor enraizamento (Hu & Wang, 1983).

Os componentes que, quando em excesso, inibem o enraizamento são os macronutrientes. Os micronutrientes, em virtude de sua baixa concentração original, não requerem diluição. No entanto, as diluições excessivas dos macronutrientes podem levar a deficiências minerais da parte aérea enraizada (Grattapaglia & Machado, 1990).

Com este trabalho objetivou-se avaliar a influência das auxinas AIA, AIB e ANA, no enraizamento *in vitro* da macieira (*Malus domestica*, Borkh), cv. Fred Hough, utilizando-se duas concentrações de meios MS (Murashige & Skoog, 1962).

MATERIALE E MÉTODOS

Brotações oriundas do processo de multiplicação *in vitro* foram inoculadas em meio básico de sais de MS completo e diluído à metade com os reguladores de crescimento ácido indol-3-acético (AIA), ácido indolbutírico (AIB) e ácido naftaleno-acético (ANA), nas concentrações de 0, 1, 3 e 5 μ M. Foram colocadas também vitaminas MS acrescidas de 100 mg/L de mio-inositol, 30 g/L de sacarose e 6 g/L de ágar. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Após a inoculação, os frascos de 250 mL contendo 40 mL de meio foram levados para sala de crescimento sob temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e 16 horas de fotoperíodo a 2.000 lux, onde permaneceram por 30 dias.

O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso, em esquema fatorial ($2 \times 3 \times 4$), com cinco repetições. Cada repetição constou de um frasco (unidade experimental) contendo cinco explantes (unidade de observação). As variáveis observadas foram: percentagem de enraizamento, número de raízes, comprimento de raízes e intensidade de formação de calo na base das brotações. Esta última foi avaliada visualmente, atribuindo-se notas de 0 a 3, sendo 0 = ausência, 1 = pouca, 2 = média e 3 = alta intensidade de formação de calo.

Os resultados foram submetidos à análise de variância. A comparação entre médias dos tratamentos foi realizada pelos testes de Duncan e teste de F ($\alpha = 0,05$). Os dados de número de raízes foram transformados segundo $\sqrt{x+1}$, os dados de percentagem segundo arco seno $\sqrt{\%}$, e os dados de formação de calo (notas) segundo a transformação logarítmica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os resultados obtidos com os diferentes reguladores apresentaram diferença significativa nos meios MS e MS/2. No entanto, de maneira geral, o meio MS/2 foi melhor que o MS para quaisquer dos reguladores testados. O AIB e o ANA não apresentaram diferença significativa nos dois meios. O AIA, porém, apresentou a menor percentagem de enraizamento, principalmente no meio MS (Tabela 1). Os meios das formulações básicas diluídas para 50%, têm possibilitado melhor enraizamento na cultura da macieira e também em outras culturas (Skrisandarajah & Mullins, 1981; Zimmerman & Broome, 1981; Zimmerman & Fordham, 1985; Damiano et al., 1991).

Nas diferentes concentrações testadas, a resposta dos reguladores na percentagem de enraizamento foi similar no ANA e no AIB, e a melhor concentração foi de 3 μ M, obtendo-se perto de 90% de enraizamento. O AIA obteve resposta crescente de acordo com a concentração, mas só atingiu 66% de enraizamento com 5 μ M. Na ausência dos reguladores de crescimento, houve cerca de 5% de formação de raízes (Fig. 1), provavelmente em virtude do acúmulo de auxinas endógenas provenientes das folhas ou gemas. Tal acúmulo resulta em aumento da atividade metabólica do tecido e, conseqüentemente, na formação de raízes (Wareing & Phillips, 1981).

No caso das concentrações do AIB, diversos autores conseguiram bons resultados utilizando entre 1 e 3 mg/L (5 a 15 μ M) para o enraizamento da

macieira (Jones et al., 1977; Snir & Erez, 1980; Skrisandarajah & Mullins, 1981; Mattos, 1982).

Embora o ANA tenha induzido a formação de raízes em porcentagens similares ao AIB, provocou efeitos indesejáveis na qualidade destas, principalmente no aumento da formação de calo e na produção de raízes grossas. O AIA, por ser uma auxina instável, degradando-se facilmente pela ação da luz ou pela atividade microbiana, é considerada fraca, comparada às demais auxinas sintéticas (Caldas et al., 1990). O que vem explicar, em parte, as melhores respostas de concentrações mais altas da auxina.

Houve maior formação de raízes quando se empregou o meio MS/2, com 3 μ M de auxina, independentemente dos reguladores de crescimento utilizados, atingindo a média de 5,9 raízes por explante (Fig. 2).

Mattos (1982) conseguiu resposta similar no enraizamento *in vitro* das cvs. de macieira Golden Delicious e Gala, utilizando o meio MS/2 com adição de 1 mg/L (5 μ M) de AIB.

Na Tabela 2 tem-se o efeito da interação meio x regulador de crescimento sobre o comprimento de raízes. O meio MS/2 foi melhor em relação ao MS. No meio MS/2, o AIA e o AIB não mostraram diferença, porém o ANA apresentou menor comprimento de raízes.

Na Fig. 3 tem-se a interação do tipo x concentração do regulador de crescimento para comprimento

TABELA 1. Interação entre meios de cultura e reguladores de crescimento (AIA, AIB e ANA) no enraizamento de explantes da cv. de macieira Fred Hough em cultura de tecidos¹.

Meios	Reguladores		
	AIA	AIB	ANA
MS	5,7bB	45,6bA	56,9bA
MS/2	60,7aB	83,2aA	77,8aA
CV (%)	38,25		

¹ Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p > 0,05$).

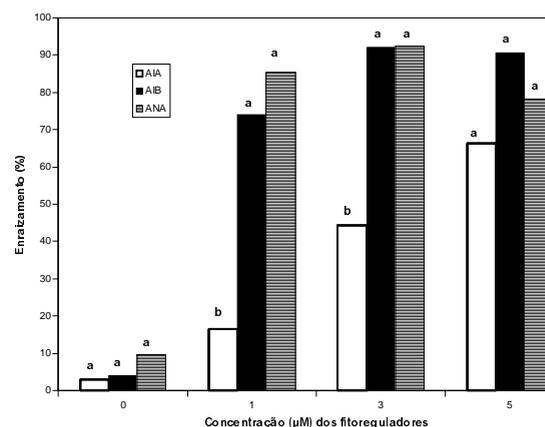


FIG. 1. Porcentagem média de enraizamento das brotações da cv. de macieira Fred Hough sob diferentes concentrações das auxinas AIA, AIB e ANA.

das raízes. Na concentração de 1 µM, o AIB foi superior ao ANA e AIA, produzindo um comprimento de raízes médio de 23 mm. Já nas concentrações de 3 e 5 µM, o AIB e o AIA não mostraram diferenças, e o comprimento foi menor. Nas concentrações mais elevadas, o ANA produziu raízes menores. O crescimento de raízes é afetado por altas concentrações de sais, que inibem o desenvolvimento das brotações (Caldas et al., 1990).

Não houve formação de calo na ausência de reguladores de crescimento. Porém, à medida que se

aumentou a concentração de reguladores de crescimento, houve também um aumento na intensidade de formação de calo. No entanto, a quantidade de calo formado foi menor na presença de AIA e maior na presença de ANA; o AIB ocupou uma posição intermediária (Fig. 4). Segundo Welander (1983), a composição dos elementos minerais afeta a formação de calo no processo de enraizamento. Para Fachinello et al. (1994), o aumento da concentração de auxinas aplicadas nos brotos provoca efeito estimulador de raízes até um certo valor, a partir do

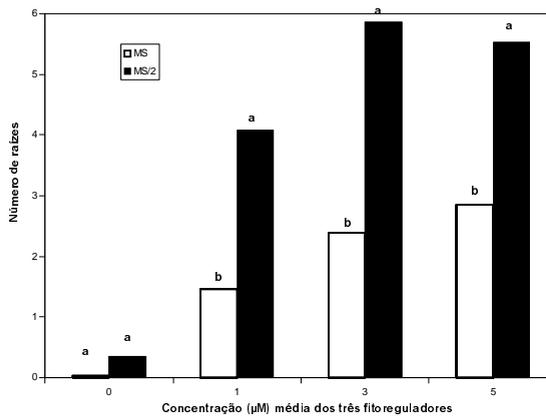


FIG. 2. Número médio de raízes nas brotações da cv. de macieira Fred Hough nos meios de cultivo MS e MS/2 sob diferentes concentrações da média das três auxinas.

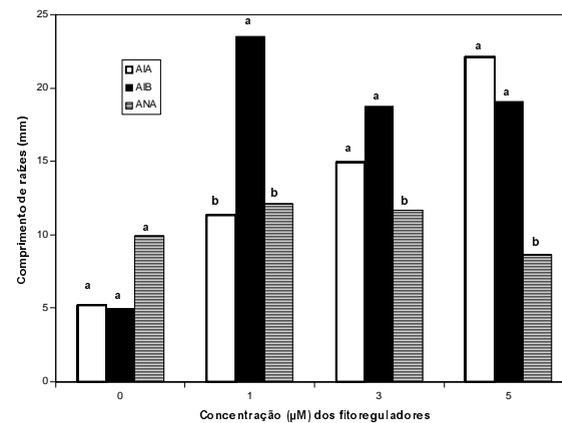


FIG. 3. Comprimento médio das raízes nas brotações da cv. de macieira Fred Hough sob diferentes concentrações das auxinas AIA, AIB e ANA.

TABELA 2. Interação entre tipo de meios de cultura e reguladores de crescimento (AIA, AIB e ANA) no comprimento de raízes de explantes da cv. de macieira Fred Hough em cultura de tecidos¹.

Meios	Reguladores		
	AIA	AIB	ANA
MS	4,9bB	12,8bA	6,77bB
MS/2	21,8aA	20,3aA	14,4aB
C.V. (%)	47,70		

¹ Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Duncan (p > 0,05).

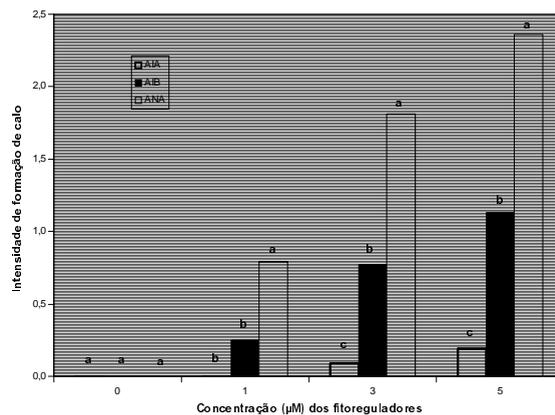


FIG. 4. Intensidade média de formação de calo nas brotações da cv. de macieira Fred Hough sob diferentes concentrações das auxinas AIA, AIB e ANA.

qual acréscimos maiores têm efeito inibitório. A concentração adequada depende da espécie e do teor da auxina existente nela.

Grattapaglia & Machado (1990) salientam que quantidades excessivas de auxina estimulam a produção de calo. Embora o ANA possa induzir a formação de raízes, em algumas espécies por vezes até melhor que o AIB, pode também provocar efeitos indesejáveis por ser mais tóxico aos tecidos vegetais (Weaver, 1976).

CONCLUSÃO

O meio de cultura MS com a concentração de sais reduzida para 50% e com a adição de 3 μ M de AIB proporciona melhor enraizamento *in vitro* da macieira cv. Fred Hough.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE MAÇÃS. Radiografia da maçã no Brasil. **Journal da fruta**, Lages, v.5, n.38, p.1. mar. 1997.
- BLEICHER, J. Doenças da macieira. In: EMPASC. **Manual da cultura da macieira**. Florianópolis, 1986, p.381-391.
- CALDAS, L.S.; HARIDISAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa-CNPq, 1990, p.37-70.
- DAMIANO, C.; CHIAROTTI, A.; CABONI, E.; QUARTA, R.; BOUMIS, G. Some factors affecting the induction and the expression of rooting in different fruits species *in vitro*. **Acta Horticulturae**, n.300, p.211-225, 1991.
- DENARDI, F.; CAMILO, A.P. Fred Hough nova cultivar de macieira com imunidade à sarna. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.16, n.1, p.1-6, 1994.
- FACHINELLO, J.C.; HOFFMAN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; FORTES, G.R. de L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Pelotas: UFPel, 1994. 179p.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa-CNPq, 1990, p.99-169.
- HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (Eds.). **Handbook of plant cell cultures**. New York: Macmillan, 1983. v.1, p.177-227.
- JONES, O.P.; HOPGOOD, M.E.; O'FARRELL, D. Propagation *in vitro* of M-26 apple rootstocks. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.52, n.2, p.235-238, 1977.
- KRIKORIAN, A.D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W.M.; MROGINSKY, L.A. (Eds.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. p.41-77.
- MARGARA, J. **Multiplificación vegetativa y cultivo in vitro**. Madrid: Mundi-Prensa, 1988. p.171-197.
- MATTOS, E.B. **Enraizamento in vitro de brotações de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. Golden Delicious e Gala, e porta-enxerto MM106**. Pelotas: UFPel, 1982. 45p. Dissertação de Mestrado.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- ROSS, C.W. Hormones and growth regulators: auxins and gibberellins. In: SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. (Eds.). **Plant physiology**. 4.ed. Belmont: Wadsworth, 1992. p.357- 377.
- SNIR, I.; EREZ, A. *In vitro* propagation of Malling Merton apple rootstocks. **HortScience**, v.15, n.5, p.597-598, 1980.
- SRISKANDARAJAH, S.; MULLINS, M.S. Micropropagation of Granny Smith apple: factors affecting root formation *in vitro*. **Journal of Horticultural Science**, v.56, n.1, p.71-76, 1981.
- WAREING, P.F.; PHILLIPS, I.D.J. **Growth and differentiation in plants**. 3.ed. Oxford, England: Pergamon Press, 1981. 343p.
- WEAVER, R.J. **Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura**. Mexico, DF: Trillas, 1976. 622p.
- WELANDER, M. *In vitro* rooting of the apple rootstock M-26 in adult and juvenile growth phases and

- acclimatization of the plantlets. **Physiologia Plantarum**, v.58, n.3, p.231-238, 1983.
- WESTWOOD, M.N. Plagas y enfermedades. In: WESTWOOD, M.N. **Fruticultura de zonas templadas**. Madrid: Mundi Prensa, 1982. p.367-397.
- ZIMMERMAN, R.H. Cultivo de tejidos. In: MOORE, N.J.; JANICK, J. (Eds.). **Métodos genotécnicos en frutales**. Mexico, DF: AGT, 1988. p.167-182.
- ZIMMERMAN, R.H.; BROOME, O.C. Phloroglucinol and *in vitro* rooting of the apple cultivar cuttings. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.106, n.5, p.648-652. 1981.
- ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I. Simplified method for rooting apple cultivars *in vitro*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.110, p.34-38. 1985.