

EFEITOS DA SACAROSE E DO FOTOPERÍODO NA PROPAGAÇÃO IN VITRO DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA “MM.111”

Moacir Pasqual*, Gladyston Rodrigues Carvalho*, Valtemir Gonçalves
Ribeiro*, Marcelo José Scarante* e Guilherme Rodrigues Carvalho*

RESUMO. Objetivou-se, com esse trabalho, estudar os efeitos de várias concentrações de sacarose, combinadas com diferentes fotoperíodos, sobre a taxa de brotações *in vitro* dos segmentos caulinares do porta-enxerto de macieira “MM.111”. Para instalação do experimento, brotações, com aproximadamente 1,5 cm de comprimento, foram inoculadas em tubos de ensaio, contendo 10 ml do meio MS, suplementado com 5 concentrações de sacarose (0,0; 15; 30; 45 e 60 g/L). Posteriormente, esses tubos foram distribuídos em câmaras para B.O.D., com fotoperíodo ajustado para 8/16, 10/14, 14/10, 16/8 horas luz/escuro, com temperatura de 25°C e intensidade luminosa de 1.500 lux. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 5×4. Após o período de 30 dias, foram realizadas as avaliações, registrando-se o número total de brotos e o número de brotos ≥ 1 cm de comprimento. Os resultados foram interpretados estatisticamente por meio de análise de variância e de regressão. A melhor combinação, para o número total de brotos e o número de brotos ≥ 1 cm para o porta-enxerto de macieira “MM.111”, foi de 60 g/L de sacarose com fotoperíodo de 8 horas.

Palavras-chave: macieira, micropropagação, porta-enxerto, sacarose.

EFFECTS OF SUCROSE AND PHOTOPERIOD ON *IN VITRO* PROPAGATION OF “MM.111” APPLE ROOTSTOCK

ABSTRACT. The aim of this work was to investigate the effects of different concentrations of sucrose, combined with different photoperiods, on *in vitro* sprouting rate of “MM.111” apple rootstock. To set up the experiment, sproutings of about 1.5 cm in length were inoculated in test tubes containing 10 ml of “MS” medium and supplied with five concentrations of sucrose (0.0, 15,

* Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, C.P. 37, 37200-000, Lavras-Minas Gerais, Brasil.

Correspondência para Moacir Pasqual.

Data de recebimento: 18/10/96.

Data de aceite: 05/05/97.

30, 45 and 60 g/L). Afterwards, these tubes were allocated to B.O.D. chambers with photoperiods adjusted to 8/16, 10/14, 14/10 and 16/8 light/dark hours, at 25°C temperature and at light intensity of 1500 lux. The experimental design was completely randomized in a 5×4 factorial scheme. At the end of a 30-day period, the experiment was evaluated by registering the total number of sprouts and the number of sprouts ≥ 1.0 cm in length. The results were interpreted through a variance and regression statistical analysis. The best combination for the total number of sprouts and the number of sprouts ≥ 1.0 cm in length for the “MM.111” apple rootstock was 60 g/L with an 8-hour photoperiod.

Key words: apple tree, micropropagation, rootstock, sucrose.

INTRODUÇÃO

O interesse que a fruticultura vem despertando atualmente, como uma alternativa viável de produção, sustentada pela possibilidade de desencadear um processo de desenvolvimento industrial e social, aumento de oferta de frutas, melhoria da dieta alimentar, faz com que novas tecnologias e novas áreas sejam exploradas com esta atividade.

Entretanto, na formação de pomares, têm-se verificado efeitos desastrosos, face à utilização de mudas obtidas a partir de material propagativo não selecionado, de baixa produtividade, com frutos de qualidade inferior e com problemas de doenças, principalmente viroses, que vão se agravando nas sucessivas gerações, através da propagação vegetativa.

Dentro deste contexto, as técnicas de cultura de tecidos vegetais revestem-se de fundamental importância, permitindo selecionar e obter plantas com alta potencialidade qualitativa, com genuínas características varietais, isentas de viroses e em grandes quantidades em curto espaço de tempo.

Em inúmeras espécies de frutíferas, que apresentam dificuldade de multiplicação pelos métodos convencionais, utiliza-se, com sucesso, a micropropagação (Fasolo *et al.*, 1989), permitindo a obtenção de um grande número de plantas, geneticamente idênticas, em curto período de tempo e com possibilidades de obtenção de plantas livres de viroses. Mas, ao iniciar programas de micropropagação e para induzir a morfogênese, devem ser considerados os tipos e o tamanho dos explantes, pois as reações são variadas entre os diversos tecidos utilizados. Além disso, a concentração de sacarose no meio de cultura, a temperatura e o fotoperíodo exercem grande influência sobre a propagação “in vitro”.

Os explantes mais indicados na multiplicação clonal “*in vitro*” são ápices caulinares, gemas axilares e meristemas que normalmente mantêm a fidelidade genotípica da planta matriz. Segundo Otoni (1988), o tamanho, o número médio e o vigor dos novos brotos são influenciados pelo tipo, pela localização e pelo tamanho do explante utilizado na cultura.

O meio de cultura utilizado nas diversas fases da micropropagação deve sustentar as necessidades para um ótimo crescimento e uma diferenciação dos tecidos “*in vitro*” (Caldas *et al*, 1990). O meio Murashige e Skoog (1962) “MS” completo ou com reduções dos sais, suplementado com vitaminas, principalmente tiamina, tem-se mostrado satisfatório para o desenvolvimento de inúmeras culturas; contudo tem-se verificado que os tecidos e os órgãos cultivados *in vitro* apresentam pouca ou nenhuma capacidade fotossintética, devido à proporção de CO₂ absorvido e fixado ser menor do que nas plantas de origem *in vivo* (Kozai e Iwabuchi, 1991). Logo, requerem uma fonte externa de carbono para o fornecimento da energia metabólica e um esqueleto carbônico para a biossíntese dos compostos orgânicos, como celulose, aminoácidos e proteínas, necessários para o crescimento das células (George e Sherrington, 1984).

Como fonte de carboidratos na propagação *in vitro* (Caldas *et al*, 1990), tem-se como padrão a sacarose, que possui alta solubilidade, rápida metabolização, suporta as mais altas taxas de crescimento, além de ser o açúcar mais transportado pela maioria das células.

De acordo com Gamborg (1984), a assimilação do nitrogênio, para o crescimento “*in vitro*” da planta, é dependente da concentração de sacarose, fornecida de forma exógena.

Porém, várias tentativas têm sido realizadas para induzir fotoautotrofismo, ou seja, produção da própria energia pela fotossíntese, com omissão da sacarose no meio de cultura, objetivando aumentar a sobrevivência das plantas na aclimatização, reduzir os custos de produção e contaminações. Entretanto, Drew e Miller (1989) verificaram que, com ausência de sacarose no meio de cultivo, houve uma drástica redução na porcentagem de enraizamento do mamoeiro. Langford e Wainwright (1987) cultivaram brotos de rosas em diferentes concentrações de sacarose (0 a 40 g/L) e observaram que o crescimento não ocorreu em meio sem a sacarose. Segundo esses mesmos autores, em relação à capacidade fotossintética, foi verificado um aumento significativo,

quando a concentração de sacarose foi reduzida para 10 g/L no meio de cultura.

A exigência da sacarose varia com a espécie e o cultivar, e as concentrações de 10 a 30 g/L tem sido utilizadas com sucesso na propagação de macieira (Ochatt e Caso, 1983)

Concentrações de sacarose abaixo desse intervalo, 10 a 30 g/L, têm provocado clorose e morte de explantes em macieiras *Granny smith* (Sriskandarajah e Mullins, 1981).

Chong e Pua (1985), utilizando diferentes fontes de carboidratos no cultivo *in vitro*, conseguiram 100% de enraizamento e maior número de brotos (4,1 brotos) em porta-enxerto de macieira Ottawa 3, com 30-40 g/L de sacarose. No entanto, Zimmerman (1983) não encontrou influência da concentração de sacarose entre 15 e 60 g/L, no enraizamento de brotos micropropagados de macieira.

A temperatura é outro fator que exerce grande influência sobre a propagação *in vitro*, e a faixa ideal para a maioria das espécies situa-se entre 20 e 27°C.

Para o cultivo de brotos de macieira, a melhor temperatura é de aproximadamente 25°C (Abbott e Whiteley, 1976).

Trabalhando com brotos apicais de *Pyrus communis*, Wang (1992) observou que a melhor porcentagem de enraizamento e de número de raízes, ocorreram durante um período de 4 a 7 dias na ausência de luz, com uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, enquanto com a amora preta a propagação foi bem sucedida à temperatura de 27°C (Broome e Zimmerman, 1978).

Juntamente com a temperatura, a luz exerce importante função no processo de regulação fotomorfogênico, embora seu efeito na fotossíntese *in vitro* seja menor que nas plantas *in vivo* (George e Sherrington, 1984).

Yae *et al* (1987) relataram que o fotoperíodo de 16 horas produziu mais brotos em macieira do que o fotoperíodo de 24 horas para as cultivares McIntosh, Empire, Delicious, Triple Red Delicious. Esses mesmos autores registraram a maior proliferação de brotos, para o porta enxerto de macieira M.26, em fotoperíodo de 16 horas do que em 12 horas.

Contudo, Sriskandarajah e Mullins (1982) verificaram que brotos de macieira, com iluminação contínua, enraizaram melhor quando comparados com o cultivo com fotoperíodo de 16 horas.

Korban *et al* (1992) observaram aumento significativo na regeneração de brotos adventícios, através da organogênese de folhas de

importantes genótipos de *Malus*, desenvolvidos em baixa intensidade luminosa. Elliott (1987), citado pelos mesmos autores, relata que a baixa intensidade de luz estimula a organogênese pelo aumento do nível do ácido indolacético (AIA), hormônio que influi na divisão celular e na diferenciação.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de sacarose e o fotoperíodo na taxa de brotação do porta-enxerto de macieira “MM.111”.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG.

Utilizaram-se segmentos nodais do porta-enxerto de macieira “MM.111”, com aproximadamente 1,5 cm de comprimento, obtidos pelo Centro Nacional de Fruteiras de Clima Temperado RS, e mantidos *in vitro*, no laboratório de Cultura de Tecidos da UFLA, por sucessivas repicagens.

O meio de cultura utilizado foi (Murashige e Skoog, 1962) solidificado com 7.0 g/L de ágar, suplementado com sacarose (0, 15, 30, 45 e 60 g/L) e os reguladores de crescimento BAP (0,5 mg/L) e ANA (0,1 mg/L). O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 1$ antes da adição do ágar, utilizando-se NaOH 1,0 N e HCl 1,0 N. Posteriormente, foram distribuídos 15 ml de meio para cada tubo de ensaio (25 x 150 mm) e fechado com tampas de polipropileno.

Em seguida, os tubos foram autoclavados em temperatura de 121°C e pressão 1,05 Kg/cm², durante 20 minutos. Após a inoculação dos brotos (1 por tubo), em câmara de fluxo laminar, os tubos foram distribuídos e mantidos em estufas para B.O.D., com fotoperíodo ajustado para 8/16; 10/14; 14/10 e 16/8 horas de luz/escuro, com temperatura de 25°C e intensidade luminosa de 1500 lux.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 4 (5 concentrações de sacarose e 4 níveis de fotoperíodo), totalizando 20 tratamentos com 3 repetições, sendo cada parcela constituída por 3 tubos de ensaio.

As avaliações foram realizadas aos 30 dias após as inoculações, registrando-se o número total de brotos e o número de brotos $\geq$ a 1,0 cm de comprimento.

Para análise estatística, os dados do número médio estimado do total de brotos e de brotos $\geq$ a 1 cm de comprimento foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$, sendo X = número médio de brotações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nota-se, através da análise de variância (Tabela 1), que para a variável número total de brotos do porta-enxerto de macieira “MM.111”, ocorreu apenas diferença significativa para o fator sacarose e para a interação deste fator com o fotoperíodo.

Pelas análises de regressão representadas na Figura 1, verifica-se que o aumento na concentração de sacarose, proporcionou uma tendência de aumento no número médio estimado do total de brotos produzidos. Esse resultado confirma a importância da sacarose, como fonte de carbono e energia para o aumento na produção de proteínas e aminoácidos necessários às novas brotações, sendo que o mesmo foi observado por Oliveira (1994), que verificou, em crisântemo, uma tendência de aumento no número de gemas brotadas, à medida que se aumentou a concentração de sacarose no meio.

Pela Figura 1, observa-se, na produção de brotos, um comportamento diferente entre os fotoperíodos, para as várias concentrações de sacarose. Para o fotoperíodo de 8 e 14 horas, o número médio estimado do total de brotos aumentou de forma linear. Nesses fotoperíodos, a concentração de 60 g /L de sacarose foi a que apresentou a maior proliferação de brotos, dentro do intervalo estudado. Pelas equações, verificou-se que, ao usar 60 g/L de sacarose, a produção média estimada foi de 23,5 e 24,0 novos brotos para os fotoperíodos de 8 e 14 horas, respectivamente.

Por outro lado, a curva de regressão do fotoperíodo de 10 horas apresentou o ponto máximo na concentração de 45,06 g/L de sacarose quando espera-se uma produção média de 17,95 brotos. Comportamento semelhante foi apresentado pelo fotoperíodo de 16 horas que atingiu o ponto máximo na concentração de 56,7 g/L de sacarose, com uma produção média estimada em 19,5 brotos (Figura 1).

Nota-se ainda que, na ausência de sacarose, o número de brotos induzidos foi baixo para todos os fotoperíodos estudados, com médias variando de 0,2 a 3,9 brotos, demonstrando que para o porta-enxerto de macieira “MM.111” o fotoautotrofismo *in vitro* foi mal sucedido. Esse comportamento foi observado também por Langford e Wainwright

(1987) e por Drew e Miller (1989), que verificaram a falta de brotações em rosas e reduções no enraizamento de mamoeiro, durante o cultivo em meio isento de sacarose.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para o número médio estimado do total de brotos e de brotos $\geq 1,0$ cm de comprimento do porta enxerto de macieira “MM.111”, em diferentes concentrações de sacarose e fotoperíodo, UFLA-Lavras-MG, 1996.

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios	
		Número Total de Brotos ^{1/}	Número de Brotos ≥ 1 cm ^{1/}
Fotoperíodo	3	0,269	0,588*
Sacarose	4	17,696**	11,706**
Fotoperíodo x Sacarose	12	0,583**	0,315*
Resíduo	40		
CV(%)		12,58	18,25

*,** Significativo a nível de 5% e 1% de probabilidade respectivamente pelo teste F

^{1/} Dados transformados para raiz de $X + 0,5$

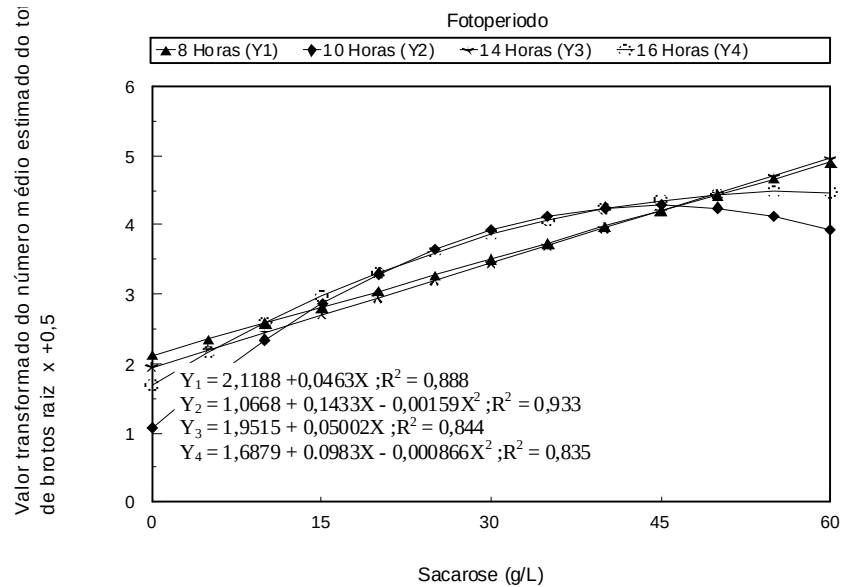


Figura 1. Número médio estimado do total de brotos em função de diferentes concentrações de sacarose dentro de cada nível de fotoperíodo para o porta-enxerto de macieira “MM.111”, UFLA-Lavras-MG, 1996.

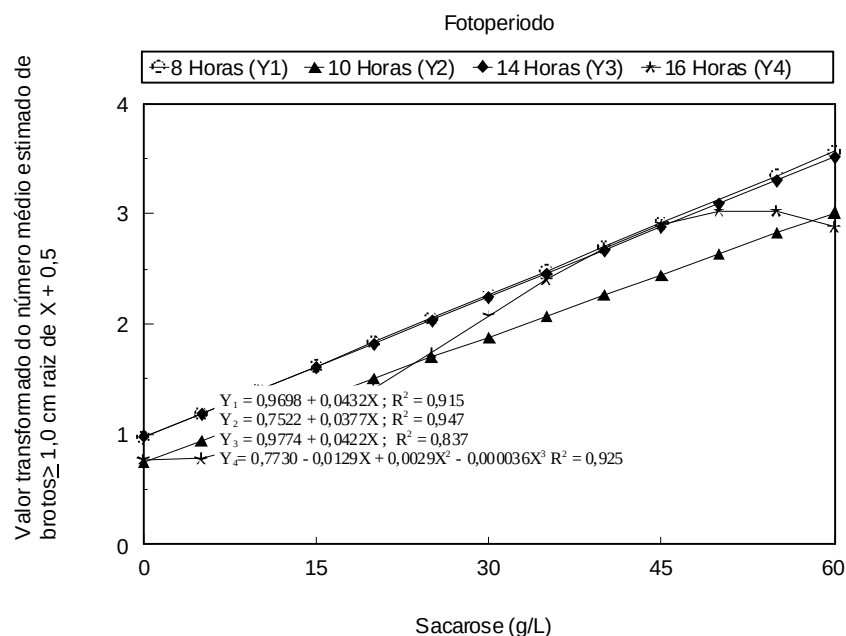


Figura 2. Número médio estimado de brotos $\geq$ a 1 cm em função de diferentes concentrações de sacarose dentro de cada nível de fotoperíodo para o porta-enxerto macieira “MM.111”, UFLA-Lavras-MG, 1996.

Em relação à variável número de brotos $\geq$ a 1,0 cm de comprimento, nota-se, pela Figura 2, que houve tendência de aumento de forma linear no número médio estimado de brotos $\geq$ a 1 cm, para os fotoperíodos de 8, 10 e 14 horas à medida que se aumentou a concentração de sacarose. Pelas equações, verificou-se que, ao usar a concentração 60 g/L de sacarose, obteve-se a produção média de 12,1; 8,6 e 11,8 brotos $\geq$ a 1 cm, para os fotoperíodos de 8, 10 e 14 horas, respectivamente. Já Zimmerman (1983) não encontrou influência da sacarose no enraizamento de brotos de macieira, quando variou a concentração de sacarose de 15 a 60 g/L.

Para o fotoperíodo de 16 horas, verificou-se pela equação cúbica de regressão (Figura 2) que a produção máxima de brotos $\geq$ a 1,0 cm estimada em 8,6 brotos foi obtida com a concentração de 52,3 g/L de sacarose. Esta produção foi superior ao valor obtido nas condições normalmente utilizadas em macieira (30 g/L de sacarose e fotoperíodo de 16 horas) por Lane (1979) e Ochatt e Caso (1983).

Nota-se, ainda, que na ausência de sacarose, nos diferentes fotoperíodos testados, não ocorreram brotações maiores que 1,0 cm de

comprimento. Esse resultado demonstra que a duração do período de luz, independente da sacarose, tem baixa eficiência para produção de energia metabólica, necessária para o desenvolvimento e o crescimento do explante. Segundo George e Sherrington (1984), no cultivo *in vitro*, devido à baixa eficiência da luz e condições limitadas de trocas gasosas (CO₂), a habilidade fotossintética do explante fica deficiente, tornando-se necessária uma fonte exógena de energia e carbono.

CONCLUSÃO

- As combinações entre sacarose e fotoperíodo foram eficientes no processo de multiplicação de brotos do porta-enxerto de macieira “MM.111”, sendo que 60 g/L de sacarose com fotoperíodo de 8 horas proporcionaram os melhores resultados na produção total de brotos e no número de brotos ≥ 1 cm.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, A.J. & WHITELEY, E. Culture of *Malus* tissues *in vitro* I. Multiplication of apple plants from isolated shoot apices. *Sci. Hortic.*, 4(2):183-189, 1976.
- BROOME, O.C. & ZIMMERMAN, R.H. *In vitro* propagation of blackberry. *Hort. Sci.*, 13(2):151-153, 1978.
- CALDAS, L.S., HARIDASAN, 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, 1990. p.37-70.
- CHONG, C. & PUA, E.C. Carbon nutrition of ottawa 3 apple rootstock during stages of *in vitro* propagation. *J. Hortic. Sci.*, 60(3):285-290, 1985.
- DREW, R.A. & MILLER, R.M. Nutritional and cultural factors affecting rooting of papaya (*Carica papaya* L.) *in vitro*. *J. Hortic. Sci.*, 64(4):767-773, 1989.
- FASOLO, F., ZIMMERMAN, R.H. & FORDHAM, I. Adventitious shoot formation on excised leaves of *in vitro* grown shoots of apple cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 16:75-87, 1989.
- GAMBORG, O.L. Plant cell culture: Nutrition and media In: VASIL, I.K. (ed). *Cell culture genetics of plant*. New York: Academic Press, 1984. v.1, p.18-26.
- GEORGE, E.F. & SHERRINGTON, P.D. *Plant propagation by tissue culture*. Eversley: Exegetics. LTD., 1984. p.32.
- KORBAN, S.S., CONNOR, P.A. & ELOBEIDY, A. Effects of Thidiazuron, Naphthaleneacetic acid, dark incubation and genotype on shoot organogenesis from *Malus* leaves. *J. Hortic. Sci.*, 67(3):341-349, 1992.

- KOZAI, T. & IWABUCHI, K. Photoautotrophic an photomixotrophic growth of strawberry plantlets *in vitro* and changes in nutrient composition of the medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 25:107-115, 1991.
- LANE, W.D. Regeneration of pear plants from shoot meristem tips. *Plant Sci. Lett.*, 16:337-342, 1979.
- LANGFORD, P.J. & WAINWRIGHT, H. Effects of sucrose concentration on the photosynthetic ability of Rose shoots *in vitro*. *Ann. Bot.*, 60:633-640, 1987.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for growth and tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15(3):473-479, 1962.
- OCHATT, S.J. & CASO, O.M. *In vitro* meristem of 'M4'apple (*Malus pumila* Mill). I. Optimal nutrient medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2:39-48, 1983.
- OLIVEIRA, P.D. *Propagação in vitro de Crisântemo (Dendranthema grandiflora Tzvelev) cv. Orange Reagen*. Lavras: ESAL, 1994. 116p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola de Agronomia de Lavras.
- OTONI, W.C. *Estudos da propagação in vitro de Citrus sinensis L. Osb. cv. Pêra a partir de cultura de segmentos nodais juvenis*. Viçosa: UFV, 1988. 108p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa.
- SRISKANDARAJAH, S. & MULLINS, M.G. Induction of adventitious rooting *in vitro* in difficult to propagate cultivars of apple. *Plant Sci. Lett.*, 24:1-9, 1982.
- SRISKANDARAJAH, S. & MULLINS, M.G. Micropropagation of Granny smith apple factors affecting root formation *in vitro*. *J. Hort. Sci.*, 56(1):71-76, 1981.
- WANG, Q. The effect of light, darkness and temperature on micropropagation of the pear rootstock BP 10030. *J. Hort. Sci.*, 67(6):859-876, 1992.
- YAE, B.W., ZIMMERMAN, R.H. & FORDHAM, I. Influence of photoperiod, apical meristem, and explant orientation on axillary shoot proliferation of apple cultivars *in vitro*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 112(3):588-592, 1987.
- ZIMMERMAN, R.H. Factors affecting *in vitro* propagation of apple cultivars. *Acta Hort.*, 131:171-178, 1983.