

NOTAS CIENTÍFICAS

EFEITO DA SACAROSE E DO BENOMYL NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DA MACIEIRA¹

REJANE FLORES², ANTONIO OLIVEIRA LESSA³,
JOSÉ ANTONIO PETERS⁴ e GERSON RENAN DE LUCES FORTES⁵

RESUMO - Objetivou-se estudar o efeito de diferentes concentrações de sacarose e benomyl na multiplicação *in vitro* de macieira (*Malus prunifolia* Willd, Borkh). O meio de cultura utilizado foi o MS, acrescido de 1 mg L⁻¹ de BAP. O benomyl foi prejudicial à multiplicação da macieira em relação às variáveis estudadas. Concentrações de 30 a 45 g L⁻¹ de sacarose propiciaram maior número de brotações e número de gemas. O comprimento dos brotos foi favorecido com 45 g L⁻¹ de sacarose. As melhores respostas quanto à coloração das brotações foram obtidas com a adição de 15 a 30 g L⁻¹ de sacarose.

EFFECT OF SUCROSE AND BENOMYL ON *IN VITRO* MULTIPLICATION OF APPLE

ABSTRACT - The purpose of this work was to study the effect of sucrose and benomyl concentrations on *in vitro* multiplication of apple (*Malus prunifolia* Willd, Borkh). The culture media composition was MS basal media plus 1 mg L⁻¹ of BAP. Benomyl was harmful to *M. prunifolia* at all concentrations. The best sucrose concentrations was 30-45 g L⁻¹, evaluated by shoot and bud number. The sucrose concentration of 45 g L⁻¹ gave the biggest shoot length. The best shoot color was obtained at 15-30 g L⁻¹ of sucrose.

A cultura da macieira no Brasil, em 1995, já ocupava uma área de 27.522 hectares, com uma produção de 495.400 toneladas. O Estado de Santa Catarina é o maior produtor nacional, com 51% da produção, seguido pelo Rio Grande do Sul com 43%. Os demais estados produtores (Paraná, São Paulo e Minas Gerais) representam apenas 6% da produção. Para o ano 2000 a previsão nacional é de 680.000 toneladas de maçãs, em uma área explorada de 29.400 hectares (Associação Brasileira de Produtores de Maçã e Pêra, citado por Faria, 1996).

¹ Aceito para publicação em 19 de novembro de 1998.

² Bióloga, Rua Floriano Peixoto 598/202 CEP 97400 São Pedro do sul, RS.

³ Eng. Agr., Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 776, CEP 91440-000 Porto Alegre, RS.

⁴ Eng. Agr., Dr., Universidade Federal de Pelotas.

⁵ Eng. Agr., Dr., Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (CPACT), Caixa Postal 403, CEP 96001-970 Pelotas, RS.

O porta-enxerto Marubakaido (*Malus prunifolia*) é vigoroso e apresenta boa afinidade com todas as cultivares copa atualmente utilizadas, porém é altamente sensível a três viroses (CLSV, Stem Groovins e Stem Pitting) que, normalmente, causam a morte.

A cultura de tecidos representa uma das formas mais viáveis de multiplicação de matrizes sadias. A fase de proliferação *in vitro* tem como objetivo obter o maior número máximo de plantas em menor tempo possível. Para isto, faz-se necessário uma metodologia eficiente, que produza partes aéreas homogêneas e de boa qualidade (Grattapaglia & Machado, 1990). A sacarose é o carboidrato mais utilizado em culturas de tecidos, e sua concentração nos meios de multiplicação varia de 2 a 3% (Ozaias-Akins & Vasil, 1982). Variações na concentração de sacarose no meio de cultura afetam as condições osmóticas e o metabolismo da planta *in vitro*, influenciando no crescimento e na diferenciação das culturas (Barg & Umiel, 1977; Ozaias-Akins & Vasil, 1982; Kumar et al., 1984). O benomyl é um fungicida sistêmico usado em culturas *in vitro*, principalmente para evitar a contaminação fúngica do meio e dos tecidos vegetais. No entanto, Yang (1976) observou que o benomyl apresenta algumas propriedades de substâncias reguladoras de crescimento.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar o efeito de níveis de sacarose e benomyl no meio de cultura MS, na multiplicação *in vitro* da macieira.

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (CPACT) e no Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pelotas, RS. Foram utilizados como explantes segmentos apicais de macieira cv. Marubakaido, com 30 dias de idade, os quais foram inicialmente, cultivados no meio MS (Murashige & Skoog, 1962), com N reduzido a $\frac{3}{4}$, 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar e 1 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina).

Os explantes foram transferidos para cultivos com sais e vitaminas de MS, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 6 g L⁻¹ de agar e 1 mg L⁻¹ de BAP. As concentrações de sacarose utilizadas foram 0, 15, 30, 45 e 60 g L⁻¹; o benomyl foi aplicado nas concentrações de 0, 0,2, 0,4 e 0,6 g L⁻¹. O pH foi ajustado para 5,9. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 16 horas e 2.000 lux.

O experimento foi avaliado após 42 dias, considerando-se as variáveis: número de brotações, número de gemas, comprimento das brotações e coloração dos brotos. Esta última foi avaliada pela aplicação dos valores 1, 3 e 5 correspondentes à coloração verde-amarelado, verde-claro e verde-escuro, respectivamente. O delineamento experimental adotado foi o de blocos casualizados, com quatro repetições e cinco tubos por tratamento, perfazendo um total de 400 tubos de ensaio. Os dados foram analisados pela regressão polinomial, com α 0,01 e 0,05. As variáveis número de brotações e número de gemas foram transformadas segundo raiz quadrada de X+1, onde X significa o valor obtido para cada variável.

Houve interação significativa (P=0,01) entre as diferentes concentrações de sacarose e benomyl utilizadas na avaliação do número médio de brotações (Fig.1). O maior número de brotações foi obtido na ausência do benomyl e

com 45 g L^{-1} de sacarose, com uma média de 3,55 brotações por explante. O aumento das concentrações de benomyl no meio levou a uma redução linear do número de brotações. Esse resultado é conflitante com os de Moreira (1993), que obteve maior número de brotos em *Citrus sunki* com a elevação das doses do benomyl no meio de cultura. Por outro lado, a concentração de 45 g L^{-1} de sacarose está de acordo com a maioria dos trabalhos, que indicam uma concentração ótima para a obtenção de um maior número de brotações. Essa concentração ideal, normalmente entre $20\text{-}30 \text{ g L}^{-1}$, varia de espécie para espécie (Ozaias-Akins & Vasil, 1982). Chong & Pua (1985) determinaram a concentração de 30 g L^{-1} como sendo a que gerou maior número médio de brotações (4,1) no porta-enxerto de macieira Ottawa 3.

Em relação ao número total de gemas também houve uma interação significativa ($P=0,01$) entre as concentrações de sacarose e benomyl (Fig. 2). O maior número médio de gemas por explante foi obtido com 30 g L^{-1} de sacarose e com a concentração zero de benomyl, diminuindo gradativamente com as concentrações mais altas de benomyl. Para a variável crescimento das brotações não houve efeito significativo em relação às diferentes concentrações de sacarose ($P=0,058$), embora a concentração de 45 g L^{-1} tenha proporcionado um maior crescimento médio dos brotos ($1,52 \text{ cm}$) na ausência de benomyl. Chong &

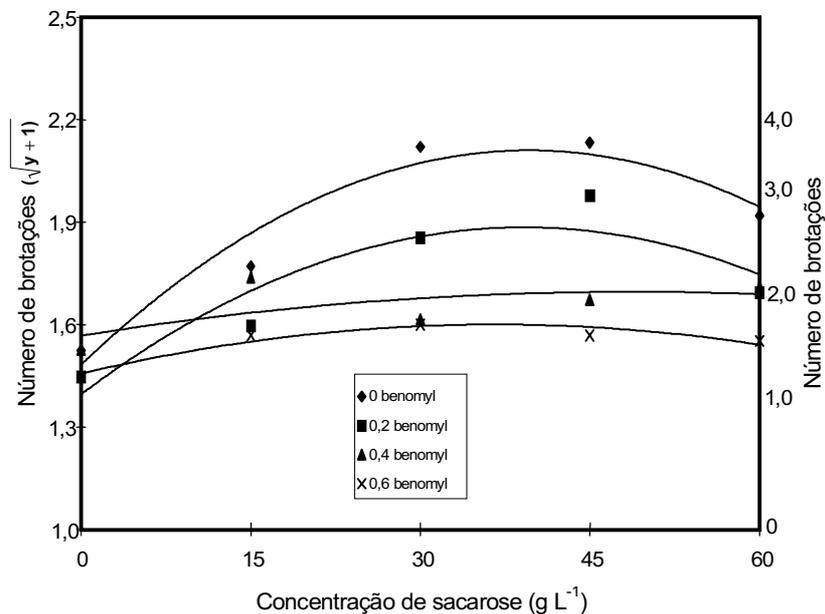


FIG. 1. Número médio de brotações do porta-enxerto Marubakaido em função de diferentes concentrações de sacarose e benomyl. Embrapa-CPACT, Pelotas, RS, 1998.

Pua (1985) relataram que o porta-enxerto de macieira Ottawa 3 apresentou um maior crescimento das brotações, na fase de multiplicação, com 30-50 g L⁻¹ de sacarose.

Por meio da Fig. 3, nota-se que houve efeito significativo em relação às diferentes concentrações de benomyl. Ocorreu uma redução no crescimento das brotações com o aumento da concentração desse produto no meio de cultura; seus efeitos foram explicados pela regressão linear. No entanto, Carvalho et al. (1996), estudando o efeito do benomyl e BAP na proliferação *in vitro* do café, não observaram efeito significativo na variável comprimento médio dos brotos.

Com relação à coloração, os explantes que apresentaram cor mais intensa, sendo aqui considerados os melhores, foram os cultivados nas concentrações 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose, em meios isentos de benomyl. As demais concentrações de benomyl (0,2 0,4 e 0,6 g L⁻¹) apresentaram resultados inferiores relativos aos brotos (Fig. 4). De acordo com Grattapaglia & Machado (1990), concentrações de sacarose inferiores a 2% podem resultar em clorose na cultura, e concentrações acima de 4% podem elevar excessivamente o potencial osmótico do meio, dificultando o desenvolvimento do material.

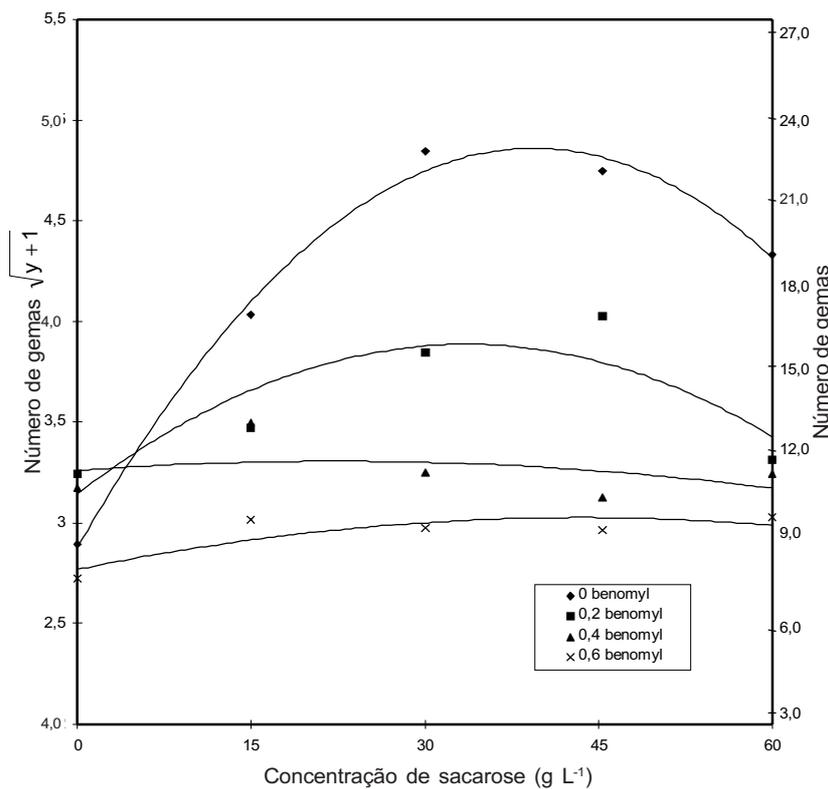


FIG. 2. Número total médio de gemas por explante em função das diferentes concentrações de sacarose e benomyl. Embrapa-CPACT, Pelotas, RS, 1998.

Nota-se que, em relação às quatro variáveis analisadas no presente trabalho, o benomyl influenciou negativamente na multiplicação *in vitro* da macieira, ao contrário da sacarose, cuja variação da concentração no meio influenciou os resultados obtidos, e as dosagens de 30-45 g L⁻¹ foram as que apresentaram

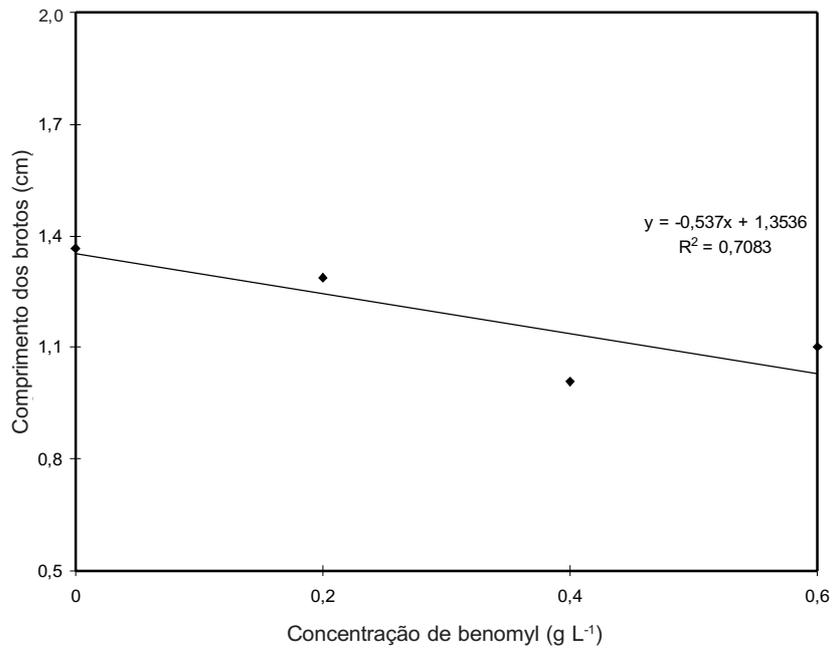


FIG. 3. Comprimento médio das brotações em função das concentrações de benomyl no meio de cultura. Embrapa-CPACT, Pelotas, RS, 1998.

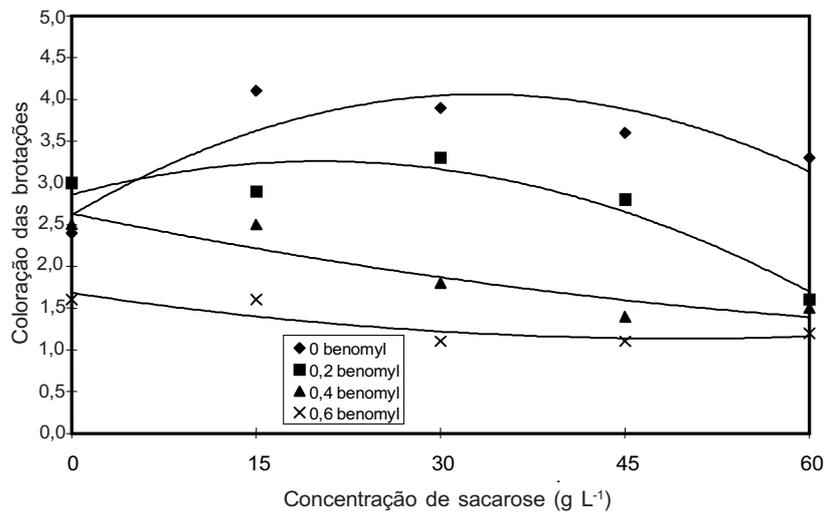


FIG. 4. Comportamento da coloração dos brotos, em função das concentrações de sacarose e de benomyl. Considerou-se: 1:verde-amarelado, 3:verde-claro e 5:verde-escuro. Embrapa-CPACT, Pelotas, RS, 1998 .

os melhores resultados. A utilização do benomyl deve ser considerada quando se deseja evitar contaminações fúngicas no meio de cultura. Estudos mais aprofundados devem ser conduzidos, para verificar a existência de algum efeito no cultivo *in vitro* pela aplicação de benomyl na planta matriz poucos dias antes da retirada dos explantes.

REFERÊNCIAS

- BARG, R.; UMIEL, N. Effects of sugar concentrations on growth, greening and shoot formation in callus cultures from four genetic lines of tobacco. **Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie**, v.81, p.161-166, 1977.
- CARVALHO, G.R.; PASQUAL, M.; ANTUNES, L.E.C.A.; RAMOS, J.D.; MACIEL, A.L.R. Influência do benomyl e benzilaminopurina sobre a proliferação *in vitro* do café cv. Catuaí. **Ceres**, v.43, n.248, p.402-408, 1996.
- CHONG, C.; PUA, E.C. Carbon nutrition of Ottawa 3 apple rootstock during stages of *in vitro* propagation. **Journal of Horticultural Science**, v.60, n.3, p.285-290, 1985.
- FARIA, J.T.C. **Calogênese e organogênese em porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido (*Malus prunifolia* Willd, Borkh)**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 1996. 51p. Dissertação de Mestrado.
- 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. 433p.
- KUMAR, A.; BENDER, L.; NEUMANN, K.H. Growth regulation, plastid differentiation and the development of a photosynthetic system in cultured carrot root explants as influenced by exogenous sucrose and various phytohormones. **Plant Cell, Tissue and Organ Tissue Culture**, v.4, p.11-28, 1984.
- MOREIRA, M.A. **Efeitos do benomyl e do ácido indolbutírico na propagação *in vitro* do porta-enxerto *Citrus sunki***. Lavras: ESAL, 1993. 56p. Dissertação de Mestrado.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- OZAIAS-AKINS, P.; VASIL, I.K. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* L.: evidence for somatic embryogenesis. **Protoplasma**, v.110, p.95-105, 1982.
- YANG, H.J. Effect of benomyl on *Asparagus officinalis* L. shoot and root development in culture media. **HortScience**, v.11, n.5, p.473-474, 1976.