

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FISILOGIA VEGETAL



DISSERTAÇÃO

ESTUDOS PRELIMINARES PARA MICROPROPAGAÇÃO DE *Malus prunifolia* cv. MARUBAKAIDO EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

CAMILA FERNANDA DE OLIVEIRA JUNKES

PELOTAS, 2015

CAMILA FERNANDA DE OLIVEIRA JUNKES

ESTUDOS PRELIMINARES PARA MICROPROPAGAÇÃO DE *Malus prunifolia* cv. MARUBAKAIDO EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Peters

Co-Orientadores: Prof. Dr.^a Eugenia Jacira Bolacel Braga

Dr.^a Daiane de Pinho Benemann

Dr. Osmar Nickel

PELOTAS, 2015

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz - CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

J95e Junkes, Camila Fernanda de Oliveira
Estudos preliminares para micropropagação de *Malus prunifolia* cv. Marubakaido em sistema de imersão temporária / Camila Fernanda de Oliveira Junkes. – 69f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2015. – Orientador José Antonio Peters; coorientadores Eugenia Jacira Bolacel Braga, Daiane de Pinho Benemann, Osmar Nickel.

1.Fisiologia vegetal. 2.Macieira. 3.Porta-enxerto. 4.Marubakaido. 5.Biorreatores. 6.Hiperidricidade. 7.Tipo de explante. 8.Enraizamento. 9.Aclimatização. I.Peters, José Antonio.II.Braga, Eugenia Jacira Bolacel. III.Benemann, Daiane de Pinho. IVNickel, Osmar. V.Título.

CDD: 583.22

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Antonio Peters – Orientador

Dr.^a Elizete Beatriz Radmann

Dr. Leonardo Ferreira Dutra

*Dedico esta dissertação à criança que um dia fui, à sua
imaginação e curiosidade insaciáveis e a todos os
sonhos que ousou sonhar. Espero deixá-la orgulhosa e
cumprir com suas expectativas.*

Agradecimentos

Uma dissertação, por mais simples que seja, nunca é construída por uma única pessoa. Existe sempre uma grande equipe de apoio físico ou emocional por detrás de cada etapa, e sem estas pessoas, sem dúvida alguma, independentemente de qualquer esforço, este trabalho nunca teria sido levado adiante.

Sou imensamente grata ao meu orientador, professor Peters, por ter aceitado o desafio de trabalhar com alguém sem o mínimo conhecimento prévio em fisiologia vegetal ou cultura de tecidos; por ter tido a paciência necessária em todas as tentativas frustradas na condução dos experimentos em laboratório; e por ter me ensinado tanto em tão pouco tempo.

A experiência de cursar este mestrado não teria sido tão gratificante se não a tivesse compartilhado com colegas tão solícitos e companheiros. Em especial, gostaria de agradecer à Alírcia e Andressa, que me acolheram desde o primeiro momento, proporcionando discussões instigantes sobre os mais diversos assuntos; ao meu caríssimo Manoel Urbano, por sua sábia e agradável presença; e minhas constantes companheiras de laboratório, Mara Cíntia, Cristina Weiser, Natália Gomes e Vania Trevelin, pelos momentos épicos pelos quais passamos. Além disso, não poderia deixar de citar minha querida Cristina Cuchiara, pelos agradáveis momentos compartilhados, e Rosane pelas surpresas que seu jeito calado reservam. Tenho também muito a agradecer aos professores deste curso, especialmente à professora Eugenia por toda colaboração e conselhos no decorrer deste período, e ao professor Luciano do Amarante, por sua postura ímpar e inspiradora.

Algumas pessoas do meu círculo pessoal também precisam ser citadas. Minha doce afilhada Nina Rosa, cuja dor de me distanciar durante seu crescimento foi um dos maiores sacrifícios para a obtenção deste título. Meus estimados amigos, Artur e Francisco, que transformaram minha estadia em Pelotas em uma experiência agradável e reconfortante, mesmo longe de qualquer família. Aqueles a quem eu mais procuro orgulhar, meus avós, Maria e Juventino, que, apesar de toda saudade, entenderam que a distância foi necessária, e minha tia Val, que foi muito mais do que uma mãe nestes anos.

E, finalmente, ao meu namorado, Mosiah. Nada disso teria acontecido se não fosse por você. Je t'aime.

*Mais cedo ou mais tarde, os que vencem são
aqueles que acreditam que conseguem.*

Richard Bach

*If my heart got there first, it will be easy to follow it
with my body.*

Paulo Coelho

RESUMO

JUNKES, Camila Fernanda de Oliveira. **ESTUDOS PRELIMINARES PARA MICROPROPAGAÇÃO DE *Malus prunifolia* cv. MARUBAKAIDO EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA**. 2015. 69f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS.

A macieira é uma frutífera lenhosa amplamente difundida no mundo. Suas mudas são propagadas por estaquia e os porta-enxertos por mergulhia de cepa devido ao alto grau de incompatibilidade entre os genótipos e grande período de juvenilidade. Os porta-enxertos conferem diferenças no vigor e resistência a doenças à cultivar copa, sendo mais utilizadas no Brasil as cultivares M.9 (anão) e 'Marubakaido' (vigoroso). Devido a problemas fitossanitários e de rendimento da técnica de propagação vegetativa, a micropropagação surge como uma tecnologia útil tanto a nível de pesquisa quanto a nível comercial. No entanto, cada genótipo de macieira responde de forma diferente aos estímulos *in vitro*, de forma que deve-se adequar os protocolos em função da cultivar em estudo. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo traçar os primeiros estudos sobre a utilização de sistema de imersão temporária (SIT) na micropropagação de 'Marubakaido'. Para tal, testes preliminares sobre a influência do tipo de explante (apical ou axilar) foram realizados via sistema convencional em três variações do meio MS (composição convencional; NH_4NO_3 e KNO_3 reduzido a $\frac{3}{4}$; e formulação industrial Himedia) suplementados com $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, 100 mg.L^{-1} de mio-inositol, 30 g.L^{-1} de sacarose e 7 g.L^{-1} de ágar. Após 45 dias observou-se que o meio Himedia conferiu maior homogeneidade entre as brotações, enquanto o tipo de explante não afetou a resposta quanto ao número e comprimento médio das brotações obtidas, podendo ambos serem utilizados sem prejuízo às taxas de multiplicação. Em seguida, os mesmos meios foram empregados na comparação entre micropropagação de explantes axilares de 'Marubakaido' em sistema convencional e SIT. Após 4 semanas verificou-se que as taxas de hiperidricidade obtidas em SIT foram muito mais elevadas do que em sistema convencional, chegando a 100% para meio MS. Uma intensa formação de calos foi observada nos meios MS e MS $\frac{3}{4}$ neste mesmo sistema, que impediram o desenvolvimento dos explantes. Quanto ao número médio e comprimento de brotações, o meio Himedia em SIT apresentou melhores resultados quando comparado a todos os tratamentos para meio e sistema (6,3 brotações por explante e 3,7 cm). O enraizamento das brotações produzidas em SIT com meio Himedia foi maior quando as brotações foram destacadas se comparadas com brotações mantidas em tufos (74,1% e 62,5% respectivamente), e a aclimatização das microestacas enraizadas resultou em 88,5% de sobrevivência após 21 dias. Embora os resultados tenham sido promissores, novos estudos ainda precisam ser realizados na tentativa de aperfeiçoar estes protocolos para 'Marubakaido', como alterações na composição hormonal, tempo e frequência de passagem do meio para os explantes ou enraizamento ao abrigo de luz.

Palavras-chave: Macieira, porta-enxerto, tipo de explante, biorreatores, hiperidricidade, enraizamento, aclimatização.

ABSTRACT

JUNKES, Camila Fernanda de Oliveira. **PRELIMINARY STUDIES FOR THE MICROPROPAGATION OF *Malus prunifolia* cv. MARUBAKAIDO IN TEMPORARY IMMERSION SYSTEM.** 2015. 69p. Dissertation (Master's degree in Plant Physiology) – Post-Graduate Program in Plant Physiology, Institute of Biology, Federal University of Pelotas, Pelotas/RS.

The apple tree is a woody fruit widespread in the world. Your plants are propagated by cuttings and rootstocks by layering strain due to the high level of incompatibility between the genotypes and great period of juvenility. Rootstocks confer differences in vigor and disease resistance to scion, being more used in Brazil the cultivars M.9 (dwarf) and 'Marubakaido' (vigorous). Due to phytosanitary problems and yield of vegetative propagation technique, micropropagation appears as a useful technology at level of research or commercially. However, each apple genotype responds differently to *in vitro* stimuli, so the protocols must be adapted according to cultivar in study. Herewith, the present research aimed to draw the first studies about the use of temporary immersion system (TIS) in 'Marubakaido's micropropagation. For this purpose, preliminary tests about the influence of the type of explant (apical or axillary) were performed via conventional system in three variations of the MS media (conventional composition; NH_4NO_3 and KNO_3 reduced to $\frac{3}{4}$, and industrial formulation Himedia) supplemented with 0.8 mg.L^{-1} BAP, 100 mg L^{-1} myo-inositol, 30 g L^{-1} sucrose and 7 g L^{-1} agar. After 45 days it was observed that the Himedia conferred greater homogeneity among the shoots, while the type of explant did not affect the response in the average of number and length of shoots obtained, and both can be used without prejudice to the multiplication rates. Then, the same media were used in the comparison of micropropagation of 'Marubakaido' axillary explants between conventional system and TIS. After 4 weeks it was found that the hyperhydricity rates obtained with TIS were much higher than in conventional system, reaching 100% at MS medium. An intense callus formation was observed in MS and MS $\frac{3}{4}$ media at same system, which stopped the development of the explants. For the mean of number and length shoots, the Himedia composition in TIS showed better results when compared to all treatments for media and system (6.3 shoots per explant and 3.7 cm). Rooting of shoots produced in TIS with Himedia was higher when the shoots were separated compared with shoots kept in tufts (74.1% and 62.5% respectively), and acclimatization of the rooted microcutting resulted in 88.5% of survival after 21 days. Although the results have been promising, further studies still need to be performed to improve these protocols to 'Marubakaido', as changes in hormonal composition, time and frequency for passage of media to the explants or rooting under darkness.

Keywords: Apple tree, rootstock, type of explant, bioreactors, hyperhydricity, rooting, acclimatization.

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1. Percentual de explantes sobreviventes obtidos a partir de estacas apicais ou axilares de 'Marubakaido' micropropagadas em diferentes formulações de meio + 0,8 mg.L⁻¹ de BAP aos 45 dias de cultivo *in vitro*. 31

Figura 2. Percentual de hiperidricidade em brotações de 'Marubakaido' em função do tipo de explante e diferentes formulações de meio + 0,8 mg.L⁻¹ de BAP aos 45 dias de cultivo *in vitro* 32

Figura 3. Brotações hiperídricas de *Malus prunifolia* cv. 'Marubakaido' obtidas de meio MS modificado a $\frac{3}{4}$ da concentração de NH₄NO₃ e KNO₃ + 0,8 mg.L⁻¹ de BAP após 45 dias de cultivo *in vitro* 34

Figura 4. Brotações de 'Marubakaido' desenvolvidas em meios MS (I), MS $\frac{3}{4}$ (II) e Himedia (III) + 0,8 mg.L⁻¹ de BAP para A) entrenó (gemas axilares) e B) apical após 45 dias de cultivo *in vitro* 36

Figura 5. Número médio de gemas obtidas de explantes apicais ou axilares de 'Marubakaido' micropropagadas em diferentes formulações de meio + 0,8 mg.L⁻¹ de BAP aos 45 dias de cultivo *in vitro* 37

Figura 6. Detalhes de brotações de 'Marubakaido' obtidas em meio MS (A) e Himedia B) a partir de segmentos nodais 38

Capítulo 2

Figura 1. Conjunto de frascos de microbiorreatores em SIT dispostos em sala de crescimento 47

Figura 2. Percentual de explantes sobreviventes de 'Marubakaido' obtidos a partir de micropropagação de estacas axilares em sistema convencional ou microbiorreatores em sistema de imersão temporária (SIT) em diferentes formulações de meio 49

Figura 3. Percentual de hiperidricidade em brotações de 'Marubakaido' obtidas a partir de micropropagação de estacas axilares em sistema convencional ou

microbiorreatores em sistema de imersão temporária (SIT) em diferentes formulações de meio	50
Figura 4. Sintomas de hiperidricidade observados na micropropagação de ‘Marubakaido’ em SIT com meio MS (A e B) e MS $\frac{3}{4}$ (C e D).....	50
Figura 5. Número médio de brotações obtidas a partir de micropropagação de estacas axilares de ‘Marubakaido’ em sistema convencional ou microbiorreatores em sistema de imersão temporária (SIT) em diferentes formulações de meio	52
Figura 6. Brotações obtidas a partir do cultivo de ‘Marubakaido’ em sistema convencional (A, B e C) e em SIT (D, E, F) em meios MS (A e D), MS $\frac{3}{4}$ (B e E) e Himedia (C e F)	53
Figura 7. Comprimento médio de brotações obtidas a partir de micropropagação de estacas axilares de ‘Marubakaido’ em sistema convencional ou microbiorreatores em sistema de imersão temporária (SIT) em diferentes formulações de meio.	55
Figura 8. Número médio de gemas obtidas a partir de micropropagação de estacas axilares de ‘Marubakaido’ em sistema convencional ou em microbiorreatores em sistema de imersão temporária (SIT) em diferentes formulações de meio	56
Figura 9. Folhas destacadas de ‘Marubakaido’ obtidas a partir de micropropagação em meio Himedia em sistema convencional (esquerda) e SIT (direita)..	57
Figura 10. Enraizamento <i>in vitro</i> de brotações destacadas de ‘Marubakaido’ em SIT.....	58
Figura 11. Enraizamento <i>in vitro</i> de brotações não-destacadas de ‘Marubakaido’ em SIT.	59
Figura 12. Plantas de ‘Marubakaido’ micropropagadas com formação de raízes <i>in vitro</i> após 21 dias de aclimatização.....	60

Lista de Tabelas

Capítulo 1

Tabela 1. Número médio de brotações e comprimento de segmentos nodais e apicais obtidos de <i>Malus prunifolia</i> cv. Marubakaido quando submetidos a cultivo <i>in vitro</i> com diferentes tipos de meio por 45 dias	35
--	----

Sumário

Resumo	7
Abstract	8
Introdução Geral.....	13
Objetivos	21
Referências Bibliográficas	22

CAPÍTULO 1 - Tipos de explante e meios de cultura na propagação *in vitro* de porta-enxerto de macieira *Malus prunifolia* cv. Marubakaido

Introdução	28
Objetivo	29
Material e Métodos.....	29
Resultados e Discussão.....	30
Conclusões.....	38
Referências Bibliográficas	39

CAPÍTULO 2 - Micropropagação de *Malus prunifolia* cv. Marubakaido em biorreator de imersão temporária

Introdução	44
Objetivos	45
Material e Métodos.....	46
Resultados e Discussão.....	48
Conclusões.....	61
Referências Bibliográficas	61
Considerações Finais.....	67

ESTUDOS PRELIMINARES PARA MICROPROPAGAÇÃO DE *Malus prunifolia* cv. MARUBAKAIDO EM SISTEMA DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

1. Introdução Geral

A macieira é uma frutífera lenhosa cuja origem data de cerca de 25 milhões de anos na região do Cáucaso, cadeia de montanhas da Ásia a leste da China entre os mares Negro e Cáspio, com 1,2 km de extensão e altitude de dois mil metros. A domesticação das espécies do gênero *Malus* começou provavelmente na região, há cerca de 20 mil anos (JUNIPER, 1998; HARRIS, 2002; BLEICHER, 2006). No entanto, foram os romanos que introduziram e disseminaram a maçã pela Europa e áreas mediterrâneas, sendo transportada pelos colonos europeus nos últimos 500 anos, a ponto de se tornar a fruta de clima temperado mais amplamente cultivada no mundo, produzida desde a Sibéria e norte da China, onde as temperaturas de inverno chegam a -40°C , até regiões equatoriais na Colômbia e Indonésia, onde duas safras podem ser produzidas em um único ano (HOKANSON et al., 2001).

Atualmente são conhecidas mais de 7.500 variedades, variantes e cultivares de macieira, que variam em tamanho, forma, cor, necessidade de frio, consistência, textura, suculência, doçura e o valor nutricional das frutas. A consistência da casca, a resistência contra várias doenças, facilidade de transporte, período de colheita curto e longo armazenamento são algumas das características de interesse em cultivares comerciais (BHATTI et al., 2010). A presença de vitamina C, β -caroteno, cálcio, potássio, ferro, magnésio, zinco, ácidos fólico, málico e tartárico, pectinas, fibras, compostos fenólicos e flavonoides no fruto da maçã o torna benéfico para a saúde humana e para o tratamento e prevenção de diversas doenças (BOYER e LIU, 2004; VEERIAH et al., 2006).

Segundo dados do United States Department of Agriculture, a macieira é uma das principais frutíferas de clima temperado e a segunda mais produzida no mundo, atrás apenas da produção de uvas, principalmente destinadas à produção de vinho, o que torna a macieira a frutífera com maior consumo *in natura* (USDA, 2014). De acordo com a Food and Agriculture Organization of the United Nation a produção mundial de maçãs atingiu 76,38 milhões de toneladas em 2013, sendo os maiores produtores a China, Estados Unidos e

Turquia, com o Brasil ocupando a décima primeira posição (FAO, 2015). Conforme levantamento realizado pelo Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola da EPAGRI o país produziu cerca de 1.373.633 toneladas, com rendimento de 36.988 kg.ha⁻¹, na safra 2013/2014. A Associação Brasileira de Produtores de Maçã estima para o ciclo 2014/2015 uma safra com volume semelhante ao de 2014.

Seu cultivo requer longas horas de frio para superação de dormência e é fortemente dependente das condições climáticas, o que é motivo de preocupação no atual cenário de aquecimento global e de mudanças climáticas (BHATTI et al., 2010). No Brasil, o plantio de macieira está concentrado nos estados da região sul, onde a área plantada ultrapassa 38,5 mil hectares, possuindo uma cadeia produtiva própria que possibilitou o país passar da posição de importador para exportador (ISPA, 2013). Os maiores produtores são respectivamente Rio Grande do Sul (690.422 toneladas e rendimento de 39.604 kg.ha⁻¹) e Santa Catarina (629.437 toneladas e 35.437 kg.ha⁻¹), que juntos respondem por 96% da produção nacional (EPAGRI, 2014). No entanto, estados como Paraná e alguns pertencentes à região nordeste, principalmente situados no Vale do São Francisco, produzem algumas cultivares de baixa exigência de frio como Eva (IAPAR-75), obtida pelo Instituto Agrônomo do Paraná por meio do cruzamento entre as cultivares Gala e Anna.

No entanto, várias são as dificuldades encontradas para seu cultivo no Brasil, como a difícil adaptação das plantas em algumas regiões, devido à falta de fatores edafoclimáticos relacionados principalmente à temperatura, altitude e precipitação (PETRI, 2006). O estabelecimento da cultura da macieira também tem sido acompanhado pela ocorrência de várias doenças típicas de clima tropical, como a sarna (*Venturia inaequalis*), oídio (*Podosphaera leucotricha*), mancha foliar da gala (*Colletotrichum spp.*), mancha foliar de marssonina (*Diplocarpon mali*), podridão amarga (*Colletotrichum spp.*), podridão branca (*Botryosphaeria dothidea*), podridão olho-de-boi (*Cryptosporiopsis perennans*), fuligem (*Gloeodes pomigena*), sujeira de mosca (*Schizothyrium pomi*), podridão do colo (*Phytophthora spp.*) e roseliniose (*Rosellinia necatrix*), além de diversas doenças transmissíveis por enxertia causada por vírus (FAJARDO et al., 2014; BONETI et al., 2011). O custo do controle das doenças é um fator limitante da cultura, dado que os

fungicidas e inseticidas chegam a responder por cerca de 26% do custo total da produção (EMBRAPA, 2003).

A ocorrência de doenças provocadas por vírus, por exemplo, pode induzir a susceptibilidade a outras pragas, influenciando na produção de mudas pela diminuição da sua quantidade e qualidade, afetando a viabilidade das enxertias, reduzindo a produtividade do pomar devido à menor produção por planta como também pelo tamanho dos frutos (NICKEL et al., 2001). Plantas infectadas por vírus podem ter seu desempenho comprometido por toda vida, podendo haver redução de 15 a 45% na produção dependendo do vírus em combinação com a cultivar, porta-enxerto, nutrição e idade da planta (NICKEL, 2004).

Considerando que a reprodução de macieiras por hibridação convencional enfrenta problemas devido ao longo período de juvenilidade, elevado nível de auto-incompatibilidade, grande número de sementes estéreis e natureza altamente heterozigota do genoma, a produção de mudas é realizada de forma assexuada por propagação vegetativa, via estaquia, enxertia ou mergulhia de cepa (PETRI, 2008). As características genéticas do porta-enxerto determinam o porte da planta, bem como oferecem resistência a patógenos e adaptação a diferentes tipos de solo (VIEIRA et al., 2007). Inúmeros porta-enxertos clonais estão sendo desenvolvidos (NOORMOHAMMADI et al., 2013), sendo mais utilizados no Brasil o M.9 (anão), M.7 (semi-vigoroso) e 'Marubakaido' (vigoroso).

Dentre os porta-enxertos o 'Marubakaido' (*Malus prunifolia*) é amplamente utilizado no Brasil em virtude da sua adaptação aos solos rochosos da região sul, resistência a pragas e excelente comportamento em situações de replantio em solos com baixa fertilidade (PETRI, 2008; MARCON FILHO et al. 2009). Sua origem é japonesa e atinge de 3 a 8 metros de altura na natureza, apresentando grandes flores brancas, bastante atrativas para insetos, e seu fruto, produzido no outono, possui coloração amarela ou vermelha, sendo pouco palatável para o consumo humano (GIACOBBO et al., 2003; STOLF et al., 2008). Embora seja suscetível a certas viroses que acometem a cultura, é resistente a pragas como o pulgão lanígero, podridão de colo e a *Phytophthora sp.* Além disso, demonstra boa capacidade de excluir o manganês e absorver melhor o cálcio, sendo ainda tolerante ao alumínio tóxico

no solo (STOLF et al., 2008). Sua utilização se dá em plantio de baixa densidade ou mediante associação com um inter-enxerto com filtro M.9 (*Malus pumila*), cujo objetivo é diminuir o vigor das variedades-copa enxertadas (GIACOBBO et al., 2003; STOLF et al., 2008). Sua propagação é por estacas lenhosas e tem sido empregado com sucesso na enxertia de diversas cultivares como Galaxy, Imperial Gala, Fuji Kiku e Fuji Suprema, e as cultivares Catarina e Joaquina (DENARDI, 2002).

A propagação vegetativa, no entanto, apresenta limitações devido ao baixo percentual de enraizamento e/ou de sobrevivência de muitos genótipos (DOBRÁNSZKI et al., 2010; CARDOSO et al., 2011), além de ser um processo com baixas taxas de multiplicação, dependente da sazonalidade, que requer muito tempo e espaço, e que não assegura a produção de plantas com qualidade fitossanitária (DOBRÁNSZKI et al., 2010). Diante da problemática associada às técnicas convencionais de propagação, a biotecnologia, através do aperfeiçoamento dos protocolos de cultivo *in vitro*, tem sido uma excelente opção para a multiplicação desta frutífera (ABREU et al., 2003). A cultura de tecidos é baseada na totipotência, característica que possibilita que qualquer tipo de tecido, como folhas, meristemas, embriões, gemas apicais ou axilares, pecíolos, pontas de raiz ou mesmo feixes vasculares, sejam capazes de se regenerar em uma planta inteira sob condições adequadas, e que são teoricamente dotadas das mesmas características genéticas da planta-matriz (GEORGE, 2008; CARDOSO et al., 2013).

A micropropagação divide-se basicamente em quatro etapas, cujos sucessos influem na taxa de sobrevivência e qualidade final das plantas obtidas (GEORGE e DEBERGH, 2008). Estas diferentes etapas requerem protocolos específicos, com possíveis estágios adicionais dependendo do genótipo em estudo. As fases de multiplicação *in vitro* são, segundo George e Debergh (2008): estabelecimento de cultura *in vitro*; multiplicação das brotações; enraizamento de microestacas; e aclimatização.

Durante o primeiro estágio os explantes são coletados e transferidos para cultura *in vitro* após desinfestação superficial. O sucesso desta etapa está relacionado a fatores como condições de desinfestação, época de coleta, estado nutricional da planta-matriz, além de ocorrência de oxidação dos explantes, que pode ser devido aos compostos fenólicos liberados em função

do genótipo ou de ferimentos ocasionados na excisão do explante (DOBRÁNSZKI et al., 2010). Alguns tratamentos físicos ou químicos podem ser exigidos de acordo com cada espécie, como por exemplo aplicação de pesticidas na planta matriz, uso de antioxidantes durante a desinfestação ou dissolvidos ao meio de cultura, adaptação das plantas ou dos explantes à luz artificial ou escuro, mudanças na temperatura, uso de antibióticos, etc. (GEORGE e DEBERGH, 2008).

A segunda fase tem como objetivo a obtenção de maior número possível de brotações a partir de subculturas sucessivas. Neste momento é de fundamental importância a definição de protocolos eficientes quanto à composição do meio, conteúdo e concentração de reguladores de crescimento, intensidade luminosa, temperatura ou umidade relativa (BHATTI et al., 2010). Sabe-se que concentrações mais elevadas de citocininas são necessárias para a diferenciação de novas brotações, embora, dependendo da concentração, possam causar inibição do seu alongamento (ZHU et al., 2005). Em função deste fato, por vezes se faz necessária a inserção de uma fase de alongamento das brotações inicialmente obtidas antes de passá-las para a etapa de enraizamento, e isso é realizado via alteração na composição hormonal do meio de cultura, em geral pela adição de giberelinas (DOBRÁNSZKI et al., 2010).

No estágio de enraizamento busca-se a formação de um sistema radicular adequado nas brotações, a fim de conferir maiores condições de adaptação ao ambiente externo. Sua eficiência se relaciona com fatores semelhantes aos da etapa anterior, onde em geral há redução nos teores de citocininas e adição de auxinas ou carvão ativado ao meio de cultura (DOBRÁNSZKI et al., 2010). Quando o enraizamento é feito *ex vitro*, geralmente utiliza-se imersão da base das estacas em solução contendo auxina (AIA ou AIB) e plantio em substrato (MUNIZ et al., 2013).

A transferência de brotos enraizados ao ambiente natural ocorre durante a fase de aclimatização, que é um passo crucial e decisivo para o uso comercial da micropropagação. Plantas obtidas de micropropagação podem apresentar alterações em seu metabolismo e morfologia devido às condições de baixa intensidade luminosa e alta umidade relativa observadas em cultivo *in vitro* (HAZARIKA, 2006; PATHAK et al., 2012). Por isso, durante a

aclimatização é necessário manter uma diminuição gradual da umidade e aumento concomitante da intensidade da luz, a fim de evitar uma perda significativa de material devido a dificuldades na adaptação das plantas (MUNIZ et al., 2013; DOBRÁNSZKI et al., 2010).

A micropropagação de macieira já é uma técnica bem estabelecida (BHATTI et al., 2010), permitindo que problemas inerentes aos métodos convencionais sejam superados, gerando multiplicação rápida de plantas livres de doença em escala comercial em qualquer época do ano (ZIMMERMAN e DEBERGH, 1991). Além disso, permite a propagação rápida de variedades, variantes ou linhagens novas de interesse para os melhoristas de macieira, pois mantém as características genéticas da planta de origem (DOBRÁNSZKI et al., 2010). A técnica pode ser aplicada na criopreservação, multiplicação de genótipos de interesse econômico mas que produzem sementes estéreis, e também é um passo essencial para o sucesso da regeneração de linhagens transgênicas, determinando a eficácia de um protocolo de transformação (ALDWINCKLE e MALNOY, 2009; BHATTI et al., 2010).

Para macieira foi demonstrado existir influência do genótipo no sucesso da micropropagação, o que implica em diferentes protocolos para cada espécie ou cultivar (DOBRÁNSZKI et al., 2010; MACHADO et al., 2013). Dentre os fatores mais importantes que influenciam a taxa de multiplicação destacam-se o tipo de explante, época de coleta, idade e genótipo da planta matriz, fonte de carbono, composição do meio de cultura, tipo e concentração de reguladores de crescimento, pH, e condições de cultura como luminosidade, temperatura e umidade relativa dentro dos frascos (ZANANDREA et al., 2009; DOBRÁNSZKI et al., 2010; TÁBORI et al., 2010).

O meio mais utilizado para a micropropagação de macieira é a formulação de Murashige e Skoog (MS, 1962). No entanto, a utilização de outros meios de cultura ou mesmo modificações na composição do meio MS básico também tem sido estudados. Welander (1985), citado por Dobránszki et al. (2010), estudou o efeito de diferentes composições químicas para meios, verificando que o meio MS foi o mais eficiente para a produção *in vitro* de brotos com mais de 1 cm para a cultivar 'Akeró'. Webster e Jones (1991) utilizaram com sucesso o meio MS modificado onde NaEDTA e FeSO₄ foram substituídas por [CH₂N(CH₂COO₂)₂FeNa na cultura de porta-enxerto 'M.9'. Para

esta cultivar também já foi verificada a utilização de meio MS modificado com concentração de nitrogênio a um terço da formulação normal em estudos sobre a funcionalidade do aparelho fotossintético *in vitro* (ZANANDREA et al., 2006).

Mudanças na composição de reguladores de crescimento tem grande impacto sobre o direcionamento que o explante tomará no cultivo *in vitro*, podendo induzir a formação de calos, embriões, parte aérea ou raiz (DOBRÁNSZKI et al., 2010). Os processos de desdiferenciação e rediferenciação, por exemplo, que são a base do desenvolvimento *in vitro*, são dirigidos por concentrações relativas de auxina e citocinina, de modo que uma alta proporção de citocinina e baixa de auxina promove o desenvolvimento de brotações, enquanto que um valor baixo para a razão de citocinina/auxina promove desenvolvimento radicular (PISCHKE et al., 2006).

Entre os diversos tipos de reguladores de crescimento utilizados em cultura de tecidos, as citocininas têm provado ser o mais importante fator que interfere na multiplicação e regeneração, pois induzem a proliferação de gemas adventícias e de brotações através do crescimento de meristemas laterais (ERIG et al., 2006) e os seus efeitos podem estar relacionados com as alterações histológicas nos tecidos induzidos (TÁBORI et al., 2010). O número de brotações obtidos *in vitro* varia de acordo com a cultivar de macieira estudada (ERIG et al., 2006), sendo que o nível ótimo de 6-benzilaminopurina (BAP) também sofre influência do genótipo. Isso se deve aos níveis endógenos desta classe de hormônio *in vivo*, com diferenças subsequentes na captação de citocinina a partir do meio, na eficiência de transporte através de culturas ou no metabolismo de BAP (DOBRÁNSZKI et al., 2010). O excesso pode ser tóxico e comprometer o desenvolvimento das culturas, como observado por Dunstan et al. (1985) com porta-enxerto 'M.4', em que concentrações de BAP acima de 3,0 mg.L⁻¹ no meio de cultura afetaram a qualidade das brotações, deixando-as atrofiadas. Para 'Marubakaido', Giacobbo et al. (2003) constataram que concentrações entre 0,5 e 1 mg.L⁻¹ apresentaram melhores resultados para altura, número de brotações e número de gemas adventícias.

O sistema de propagação empregado na cultura de tecidos também é determinante na qualidade e rendimento de brotações produzidas, além de implicar em alterações nos custos de produção (ETIENNE et al., 2002). A multiplicação convencional de cultura de tecidos é limitada na produção

comercial de diversas espécies de plantas devido à elevada demanda de trabalho manual e baixo grau de automação (CHU, 1995). Além disso, os tecidos vegetais de várias espécies têm um melhor desempenho quando em meio líquido em vez de em meio semissólido (MEHTA, 2014).

A utilização de biorreatores pode proporcionar uma ferramenta promissora para propagação clonal em massa (ETIENNE et al., 2002). Devido à utilização de meios líquidos, estes sistemas apresentam vantagens em relação a meios contendo ágar como: a) produção de um grande número de plantas, principalmente devido às condições de cultura mais uniformes, maior espaço disponível e facilidade com a qual os explantes/brotações podem absorver nutrientes; b) redução do tempo no manejo das culturas, em razão da operação semiautomática e consequente economia de trabalho; c) melhor crescimento e produção de biomassa devido à boa aeração por fornecimento de oxigênio forçado e; d) redução da dominância apical e maior estímulo do crescimento de brotos laterais, que é, provavelmente, devido à perda de orientação das brotações durante seu desenvolvimento *in vitro* (ZHU et al., 2005).

As vantagens da cultura de explantes diferenciados em meio líquido são muitas vezes contrabalançadas por problemas como forças de cisalhamento e a necessidade de equipamentos complexos (ETIENNE et al., 2002). Além disso, a completa imersão dos tecidos ou órgãos no meio líquido causa má-formação e perda de material devido a asfixia ou hiperidricidade (GEORGIEV et al., 2014). Na tentativa de contornar tais problemas, alguns procedimentos foram desenvolvidos, como a técnica de imersão baseada em um princípio semelhante aos biorreatores de aspensão, com contato temporário entre as plantas e o meio líquido em vez de um contato permanente, a fim de combinar aeração e os efeitos positivos de um meio de cultura líquido (PAEK et al., 2005). Neste sentido a técnica de imersão temporária tem sido mais utilizada para a micropropagação, pois reduz problemas relacionados a asfixia, danos mecânicos e hiperidricidade quando comparado a propagação em imersão constante (ETIENNE et al., 2002).

Para macieira a técnica de imersão temporária é bastante recente. Os primeiros trabalhos relatados foram realizados por Chakrabarty et al. (2003) e Zhu et al. (2005) com porta-enxerto 'M.9' e 'M.26' respectivamente. Estes

autores relataram que o sistema de imersão temporária (SIT) foi bastante útil na micropropagação destas cultivares, resultando em alta taxa de multiplicação com hiperidricidade reduzida, além de incremento no vigor de brotações e formação de gemas morfológicamente normais.

Diversos trabalhos já foram realizados na tentativa de melhorar as condições de micropropagação de 'Marubakaido' (ZANOL et al., 1998; NUNES et al., 1999; PEREIRA et al., 2001; HOFFMANN et al., 2001; ERIG et al., 2002; GIACOBBO et al., 2003; MACHADO et al., 2004; PEREIRA-NETO et al., 2007; PEREIRA-NETO, 2012; MUNIZ et al., 2013). Machado et al. (2004) citaram que esta cultivar apresenta excelente resposta morfogenética aos estímulos *in vitro*, principalmente de reguladores vegetais, o que possibilita elevar a eficiência dos protocolos de micropropagação, principalmente pelo aumento do número de brotações na fase de multiplicação. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo buscar condições mais adequadas para a multiplicação *in vitro* para este porta-enxerto de macieira via biorreatores de sistema de imersão temporária (SIT), já que não há relatos na literatura sobre o emprego deste sistema em micropropagação de 'Marubakaido'.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Verificar as influências de meio de cultura, tipo de explante e sistema de cultivo *in vitro* na micropropagação de 'Marubakaido'.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos de três formulações do meio MS (completo, $\frac{3}{4}$ e comercial) na micropropagação *in vitro* de 'Marubakaido';
- Avaliar a influência do tipo de explante (apicais e axilares) na multiplicação *in vitro* de 'Marubakaido';
- Comparar as variações na multiplicação de 'Marubakaido' em diferentes sistemas de cultivo *in vitro*: convencional e microbiorreatores em sistema de imersão temporária (SIT);

- Verificar a eficiência do enraizamento e aclimatização de brotações destacadas e não-destacadas de 'Marubakaido' micropropagadas em microbiorreatores de imersão temporária.

3. Referências Bibliográficas

ABREU, Monita F.; PEDROTTI, Enio L. *Micropropagação de macieira*. **Revista biotecnologia ciência & desenvolvimento**. n. 31, p. 100-108 Jul./Dez. 2003.

ALDWINCKLE H.; MALNOY M. "*Plant regeneration and transformation in the Rosaceae*". In: NAGESWARA-RAO M.; SONEJI J.R. (org.). **Transgenic plant Journal**. n. 3 (Special Issue 1). p. 1-39, 2009.

BAHLS, Anevair dos S. *Influência climática na cultura da maçã*. **Boletim de Geografia - UEM**. Maringá, Ano 2, n.2, p. 48-61, Jan. 1984.

BHATTI, Shammi; JHA, Gopuljee. *Current trends and future prospects of biotechnological interventions through tissue culture in apple*. **Plant Cell**. Vol 29, p. 1215-1225, 2010.

BLEICHER, J. *A cultura da macieira*. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis, SC. p. 29-36, 2002.

BLEICHER, J. *História da macieira*. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis-SC: EPAGRI. p.29-36, 2006.

BONETI, José I.; KATSURAYAMA, Yoshinori. *Uso dos fosfitos e compostos naturais no controle das doenças da macieira*. In: **Encontro Nacional Sobre Fruticultura De Clima Temperado**. Fraiburgo/SC, n. 12, 2011. Anais: Caçador: Epagri, vol I (Resumos), p. 54-66, 2011.

BOYER J.; LIU R.H. *Apple phytochemicals and their health benefits*. **Nutrition Journal**. V. 3, n. 5, 2004.

CARDOSO, Carina. YAMAMOTO, Lilian Y.; PRETI, Edilene A.; ASSIS, Adriane M.; NEVES, Carmen S. V. J.; ROBERTO, Sergio R. *AIB e substratos no enraizamento de estacas de pessegueiro 'Okinawa' coletadas no outono*. **Semina: Ciências agrárias**. Londrina: v, 32, n. 4, p. 1307-1314, 2011.

CARDOSO, Jean C.; SILVA, Jaime A. T.; *Gerbera micropropagation*. **Biotechnology advances**. Vol. 31, p. 1344-1357, 2013.

CHAKRABARTY D.; HAHN E.J.; YOON Y.S.; PAEK K.Y.; *Micropropagation of apple root stock 'M9 EMLA' using bioreactor*. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**. V.78, p. 605-609, 2003.

CHU. I. "Economic analysis of automated micropropagation" In: AITKEN-CHRISTIE J.; KOZAI T.; SMITH, MAL. (org.). *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p. 19-27, 1995.

CORNILLE, Amandine; GIRAUD, Tatiana; SMULDERS, Marinus J. M.; ROLDÁN-RUIZ, Isabel; GLADIEUX, Pierre. *The domestication and evolutionary ecology of apples*. **Trends in Genetics**. V. 30, n. 2, p. 58-65, Fev. 2014.

CRUZ Jr., Álvaro de Oliveira; AYUB, Ricardo Antonio. *Quebra de dormência de gemas de macieira cv. Eva tratadas com cianamida hidrogenada*. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 24, n.2, p. 576-578, Ago. 2002.

DENARDI, F. *Porta-enxertos*. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis-SC: EPAGRI, p.169-227, 2002.

DOBRÁNSKI, Judit; SILVA, Jaime A. T. *Micropropagation of apple - A review*. **Biotechnology Advances**. Vol. 28, p. 452-488, 2010.

DOBRÁNSZKI J.; JÁMBOR-BENCZÚR E.; HUDÁK I.; MAGYAR-TÁBORI K.; *Model experiments for establishment of in vitro culture by micrografting in apple*. **International Journal of Horticultural Science**. V. 1, p. 47-49, 2005.

DUNSTAN, D.I.; TURNER, K.E.; LAZAROFFI, W.R. *Propagation "in vitro" of apple rootstock M.4: effect of phytohormones on shoot quality*. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, v.4, p. 55-60, 1985.

EMBRAPA. *Produção Integrada de Maçãs no Brasil. Sistema de Produção*. N. 1, Janeiro 2013. Disponível em: <sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Maca/ProducaoIntegradaMaca/index.htm>. Acesso em: 17 de Janeiro de 2015.

ERIG, Alan C.; SCHUCH, Márcia W. *Ação da 6-Benzilaminopurina e da qualidade da luz na multiplicação in vitro de macieira (Malus domestica Borkh.) CVS. Galaxy e mastergala*. **Revista Brasileira Agrociência**. Pelotas, v. 12, n.2, p. 151-155, Abr./Jun. 2006.

ERIG, Alan C.; SCHUCH, Márcia W. *Multiplicação in vitro do porta-enxerto de macieira CV. Marubakaido: Efeito da orientatação do explante no meio de cultura*. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 293-295, agosto 2002.

ETIENNE, H.; BERTHOULY, M.; *Temporary immersion systems in plant micropropagation*. **Plant Cell, Tissue and organ culture**. V. 69, 215-231, 2002.

FAJARDO, Thor V. M.; NICKEL, Osmar. *Detecção simultânea de quatro vírus que infectam macieiras e pereiras por meio de hibridização molecular com uma polissonda*. **Ciência rural**. Santa Maria, v. 44, n. 10, p. 1711-1714, Out. 2014

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATION. FAOSTAT. Disponível em: < <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 15 de Janeiro de 2015.

GEORGE E.F.; DEBERGH P.C.; "Micropropagation: uses and methods". In: GEORGE E.F., HALL M.A.; De KLERK G.J.; (org.). *Plant propagation by tissue culture*. Dordrecht, Netherlands: Springer. 3. Ed. p. 29-64, 2008.

GEORGE, E.F. "Plant tissue culture procedure — background". In: GEORGE E.F.; Hall M.A.; DE KLERK, G.J. (org.). *Plant propagation by tissue culture*. Dordrecht, Netherlands: Springer. 3. Ed. p. 1-28, 2008.

GEORGIEV, Vasil; SCHUAMNN, Anika; PAVLOV, Atanas; BLEY, Thomas. *Temporary immersion systems in plant biotechnology*. **Engineering in life sciences**. V. 14, p. 607-621, 2014.

- GIACOBBO, Clevison L; GOMES, Fernando R. C.; KROTH, Leandro; CONCEIÇÃO, Melissa K.; FORTES, Gerson R. L. *Multiplicação in vitro de porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido (malus prunifolia willd, borkh) com diferentes níveis de Benzilaminopurina e ácido naftalenacético. Revista Brasileira Agrocência.* V. 9, n. 1, p. 31-33, Jan/Mar. 2003.
- HARRIS, S. A.; ROBINSON, J. P.; JUNIPER, B. E. *Genetic clues to the origin of the apple. Trends of genetics.* v. 18, n. 8, p. 426-430, 2002.
- HAZARIKA, B. N. *Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. Scientia horticulturae.* V. 108, p. 105-120, 2006.
- HOFFMANN, Alexandre; PASQUAL, Moacir; CHALFUN, Nilton N. J.; VIEIRA, Silvia S. N. *Efeito substratos na aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto de macieira 'marubakaido'. Ciências Agrotecnicas.* Lavras, v. 25, n.2, p. 462-466, mar/abr. 2001a.
- HOKANSON, S. C.; LAMBOY, W. F.; SZEWC-McFADDEN, A.K.; McFERSON, J. R. *Microsatellite (SSR) variation in a collection of Malus (apple) species and hybrids. Euphytica.* V. 118, p. 281-294, 2001.
- HOKANSON, S. C.; SZEWC-McFADDEN, A. K.; LAMBOY, W. F.; McFERSON, J. R.; *Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a Malus x domestica borkh. core subset collection. Theoretical and Applied Genetics.* V. 97, p.671-683, 1998.
- INSTITUTO AGRONÓMICO DO PARANÁ. *Macieira: IAPAR-75 Eva.* Disponível em: < http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/eva.pdf>. Acesso em: 15 janeiro de 2015.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. *Levantamento Sistemático da Produção Agrícola.* Rio de Janeiro, v.25, n.03, p.1-88, Mar. 2012.
- JUNIPER, B.E., WALKINS. R., HARRIS, S. A. *The origin of the apple. Acta Horticulturae.* v. 484, 1998.
- MACHADO, M. P.; CIOTTA, M. N.; DESCHAMPS, C.; ZANETTE, F.; COCCO, L. C.; BIASI, L. A. *Propagação in vitro e caracterização química do óleo essencial de Lavandula angustifolia cultivada no Sul do Brasil. Ciência Rural,* v.43, n.2, p.283-289, 2013.
- MACHADO, Marília P; CARVALHO, Dayse C.; BIASI, Luiz A. *Multiplicação in vitro do porta-enxerto de macieira 'marubakaido' em diferentes meios de cultivos e concentrações de ácido giberélico. Scientia Agraria.* Paraná, V. 5, n. 1-2, p. 69-72, 2004.
- MARCON FILHO, J. L. et al. *Aspectos produtivos e vegetativos de macieiras cv. Imperial Gala interenxertadas em M-9. Revista Brasileira de Fruticultura.* Jaboticabal – SP, v. 31, n. 3, p. 784-791, set. 2009.
- MEHTA, Mohina; RAM, Rajam; BHATTACHARYA, Amita. *A simple and cost effective liquid culture system for the micropropagation commercially important apple rootstocks. Indian journal of experimental biology.* Vol. 52, p. 748-754, Jul. 2014.

- MUNIZ, Aleksander W.; SÁ, Enilson L.; DALAGNOL, Gilberto L.; AMÉRICO Filho, João.; *Rooting and acclimatization of micropropagated marubakaido apple rootstock using Adesmia latifolia rhizobia*. **SpringerPlus**. V. 2, p. 437-441, 2013.
- MURASHIGE T.; SKOOG F. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. **Physiology Plantarum**. V. 15, p.473-497, 1962.
- NASCIMENTO, Flávia N. do N. *Preço da maçã, atipicamente, recuam no 2º semestre*. **Hortifruti Brasil**. p. 46-47, Dez/2014 - Jan/2015.
- NICKEL, O. "Doenças causadas por vírus". In: KOVALESKI, A. (Ed.). *Maçã: fitossanidade*. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**; Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. p.61-79. (Frutas do Brasil. 38), 2004.
- NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M.; JELKMANN, W.; KUHN, G. B. *Sequence analysis of the capsid protein gene of an isolate of Apple stem grooving virus, and its survey in southern Brazil*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, n.3, p.655-659, set. 2001.
- NICKEL, O.; JELKMANN, W.; KUHN, G. B. *Occurrence of Apple stem grooving capillovirus in Santa Catarina, Brazil, detected by RT-PCR*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, n.3, p.444-446, 1999.
- NOORMOHAMMADI, Z.; FARAHANI, F.; SAFARZADEH, M. *Study of morphological traits changes in different media culture of two apple rootstocks (M26 and MM106)*. **Malaysian Applied Biology Journal**, v.42, n.1, p.25-33, 2013.
- 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.
- PAEK, K. Y.; CHAKRABARTY, D; HAHN, E. J. *Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Vol. 81, p. 287-300, 2005.
- PATHAK, H.; DHAWAN, V. *Influence of different carbohydrate sources on In vitro Shoot proliferation of Apple (Malus x domestica Borkh.) Rootstocks M 7 and MM 111*. **Acta Horticulturae**. Vol. 961, p. 311-318, 2012.
- PEREIRA, Jonny E. S.; FORTES, Gerson R. de L.; *Multiplificação e aclimitização da macieira influenciada pelo tipo de explante e pelo tempo de permanência em meio de cultura de enraizamento*. **Revista Brasileira Fruticultura**. Jaboticabal, v. 23, n.2, p. 417-420, Ago. 2001b.
- PEREIRA-NETO, Adauto; PETKOWICZ, Carmem L. O.; CRUZ-SILVA, Claudia T. A.; GAZZONI, Mariana T.; MELLO, Arianne F. P.; SILVEIRA, Joana L. M. *Differential performance of marubakaido apple rootstock shoots grown in culture media containing different agar brands: dynamic rheological analysis*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** Vol. 43, p. 356-363, 2007.
- PEREIRA-NETTO, A. B. *Stigmaterol-driven enhancement of the in vitro*

multiplication rate for the marubakaido apple rootstock. Trees. V. 26, p. 581-586, 2012.

PETRI, J. L.; LEITE, G. B. *Macieira. Revista Brasileira de Fruticultura.* Jaboticabal-SP, v. 30, n. 4, p. 857-1166, 2008.

PETRI, José L. *Macieira. Revista Brasileira de Fruticultura.* Vol. 30, n. 4, p. 857-1166, 2006.

PISCHKE, Melissa S.; HUFFLIN, Edward L.; HEGEMAN, Adrian D.; SUSSMAN, Michael R. *A Transcriptome-based characterization of habituation in plant tissue culture. Plant Physiology.* Vol. 140, p. 1255-1278, Abr. 2006.

STOLF, Elaine C.; DANTAS, Adriana C. de M.; BONETTI, José I.; COMIN, Jucinei J.; NODARI, Rubens O. *Estabelecimento de critérios para selecionar porta-enxertos de macieira tolerantes ao alumínio em solução nutritiva. Revista Brasileira de Fruticultura.* V. 30, n. 2, p. 476-481, Jun. 2008.

TABORI, Katalin M.; DOBRANSKY, Judit; SILVA, Jaime A. T. ; BUTLEY, Sean M. ; HUDAK, Ildikó.. *The role cytokinins in shoot organogenesis in apple. Plant Cell, Tissue and organ culture.* V. 101, p. 251-267, 2010.

USDA, **United States Department of Agriculture.** Disponível em: <<http://usda.org>>. Online. Acesso em 31 jan. 2015.

VEERIAH S.; KAUTENBURGER T.; HABERMANN N.; et alli. *Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. Molecular Carcinogenesis.* V. 45, p.164–174, 2006.

VIEIRA, Luiz M; GOULART Jr., Rogério. *Boletim da maçã. Epagri.* n. 1, 28 de novembro de 2014. Disponível em: <docweb.epagri.sc.gov.br/website_cepaa/Boletim_agropecuaria/boletim_maca_n1.pdf>. Acesso em: 17 de Janeiro de 2015.

VIEIRA, R. L.; LEITE, G. B.; WAMSER, A. F. *Efeito de substratos porosos no enraizamento in vitro do portaenxerto de macieira m-9 (Malus pumilla). Revista Brasileira de Fruticultura,* Jaboticabal, v.29, n.1, p.128-132, 2007.

WEBSTER C.A.; JONES O.P. *Micropropagation of some cold hardy dwarfing rootstocks for apple. Journal of Horticultural Science & Biotechnology.* V. 66, p. 1-6, 1991.

WELANDER M. *In vitro shoot and root formation in the apple cultivar Åkerö. Annals of Botany.* v. 55, p. 249-261, 1985.

ZANANDREA, Ilisandra; BACARIN, Marcos A.; BRAGA, Eugenia J. B.; BIANCHI, Valmor J. B.; PETERS, José A. *Morphological and Physiological Photon Flux Influence Under in vitro Culture of Apple Shoots. Brazilian archives of biology and technology.* Vol. 52, n. 5, p. 1091-1098, Set./Out. 2009.

ZANANDREA, Ilisandra; BACARIN, Marcos A.; SCHMITZ, DOUGLAS D.; BRAGA, Eugenia J. B.; PETERS, José A. *Chlorophyll fluorescence in in vitro cultivated apple. Revista Brasileira Agrociência.* Pelotas, v. 12, n. 3, p. 305-308, Jul./Set. 2006.

ZANOL, Geni C.; FORTES, Gerson R. L.; SILVA, João B.; FARIA, Janine T. C.; GOTTINARI, Rosete A.; CENTELLAS, Alberto Q. *Uso do ácido indolbutírico e do escuro no enraizamento in vitro do porta-enxerto de macieira 'marubakaido'.* **Ciência rural.** Santa Maria, v. 28, n. 3, p. 387-391, 1998.

ZHU, Li-Hua ; LI, Xue-Yuan ; WELANDER, Margareta. *Optimisation of growing conditions for the apple rootstocks M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle.* **Plant Cell, Tissue and organ culture.** V. 81, p. 313-318, 2005.

ZIMMERMAN R.H.; DEBERGH P.C. "Micropropagation of temperate zone fruit and nut crops." In: ZIMMERMAN R.H.; DEBERGH P.C. (org.). *Micropropagation: technology and application.* Boston: Kluwer Academic. p. 231-46, 1991.

CAPÍTULO 1 - Tipos de explante e meios de cultura na propagação *in vitro* de porta-enxerto de macieira *Malus prunifolia* cv. Marubakaido

1. Introdução

Segundo dados do United States Department of Agriculture, a macieira é uma das principais frutíferas de clima temperado e a segunda mais produzida no mundo (USDA, 2014). No Brasil, seu plantio está concentrado nos estados da região sul, onde as condições climáticas são mais adequadas, embora a cultura esteja sujeita ao ataque de inúmeras doenças típicas de clima tropical, causadas por vírus, fungos, bactérias e insetos, que proliferam mais facilmente devido às condições climáticas encontradas no país, e que acarretam em diminuição da produção e aumento do uso de insumos químicos (PETRI, 2002).

A produção de mudas de macieira baseia-se fundamentalmente no uso da enxertia, que tem como função o controle do vigor da planta, além de oferecer resistência a patógenos e adaptação a diferentes tipos de solo (VIEIRA et al., 2007). Dentre os porta-enxertos, destaca-se a cultivar 'Marubakaido' (*Malus prunifolia*), que tem sido utilizado para plantio adensado em associação com inter-enxerto do anão M.9 (*Malus pumila*) com finalidade de reduzir o vigor das variedades-copa enxertadas (STOLF et al., 2008).

A propagação vegetativa de macieira, no entanto, apresenta limitações relacionadas à baixa qualidade fitossanitária (CARDOSO et al., 2011), de forma que a cultura de tecidos tem sido uma excelente opção para a multiplicação desta frutífera (ABREU et al., 2003). Para macieira foi demonstrado existir influência do genótipo no sucesso da micropropagação, o que implica em diferentes protocolos para cada espécie ou cultivar (DOBRÁNSZKI et al., 2010). Embora já tenha sido observado que o porta-enxerto 'Marubakaido' apresenta excelente resposta morfogênica aos estímulos *in vitro*, principalmente sob influência de reguladores de crescimento (MACHADO et al., 2004), ainda não há dados sobre seu comportamento em biorreatores em sistema de imersão temporária, de forma que se torna necessário traçar estudos a respeito.

Em micropropagação pode-se utilizar como fonte de explante qualquer tipo de tecido somático, à exceção quando visa-se produzir culturas haploides,

onde emprega-se o cultivo de anteras (CARDOSO et al., 2013). Diferentes taxas de sucesso são observadas em cada tipo de explante, dependendo do grau de diferenciação do tecido e da espécie em estudo (CHUGH et al., 2009). Em propagação de lenhosas geralmente se utilizam segmentos apicais ou estacas caulinares com alguns nós como fonte de explante na fase de multiplicação *in vitro* (BHATTI et al., 2010). Neste sentido o presente trabalho objetivou averiguar as diferenças na utilização destes dois diferentes explantes para micropropagação de 'Marubakaido', a fim de determinar as melhores condições para posterior estabelecimento de protocolo para sistema de imersão temporária para a cultivar.

2. Objetivo

Verificar a influência da composição do meio de cultura e tipo de explante na multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de macieira *Malus prunifolia* cv. Marubakaido.

3. Material e Métodos

Os explantes utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram oriundos de isolamento de meristema de porta-enxerto de macieira 'Marubakaido', realizado pelo Laboratório de Cultura de Tecidos e Biotecnologia da EMBRAPA Uva e Vinho, cultivados *in vitro* durante 180 dias em meio nutritivo Himedia (meio comercial com formulação MS) acrescido de 0,8 mg.L⁻¹ de BAP, 30 g.L⁻¹ de sacarose e 7 g.L⁻¹ de ágar, pH 5,8, repicados a cada seis semanas. Após a obtenção de número suficiente de material propagativo, as brotações foram divididas em dois tipos de explantes: estacas apicais de aproximadamente 0,7 cm contendo gema apical e segmentos nodais com cerca de 1 cm contendo três gemas axilares. Estes explantes foram, então, cultivados em três diferentes meios de cultura: MS completo, MS modificado ($\frac{3}{4}$ da concentração normal de NH₄NO₃ e KNO₃, identificado como MS $\frac{3}{4}$) e MS Himedia (comercial), todos acrescidos de 0,8 mg.L⁻¹ de BAP, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 30 g.L⁻¹ de sacarose, 7 g.L⁻¹ de ágar e pH 5,8. Os meios foram distribuídos (30 mL por recipiente) em frascos de vidro com capacidade para 200 mL e autoclavados a 120°C, 1,5 atm por 20 minutos. Foram utilizadas tampas de polipropileno como vedação.

Em cada frasco foram colocados cinco explantes do tipo axilar ou apical, posicionados horizontalmente nos meios, com cinco repetições por tratamento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por fatorial de três tipos de meio x dois tipos de explante. Os frascos foram mantidos em câmara de crescimento com temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e $25\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de fluxo de fótons por 45 dias. Após este período, avaliou-se o percentual de explantes sobreviventes e hiperídricos, número médio de brotações por explante, comprimento médio (cm) e o número médio de gemas axilares de todas as brotações. Os dados obtidos foram comparados estatisticamente pela análise de variância e submetidos a teste de Tukey a 5% de probabilidade do erro através do software Statistix 9.0 (ANALYTICAL SOFTWARE, 2009).

4. Resultados e Discussão

Houve interferência do tipo de explante apenas quando o meio utilizado foi MS $\frac{3}{4}$, onde a taxa de sobrevivência foi de 68% para segmentos nodais contra 90,5% para apicais. Esta diferença não ocorreu quando os explantes foram inoculados em meios MS e Himedia, visto que a taxa de sobrevivência foi elevada em ambos os tipos de explantes (média de 90 e 91% nos meios MS e Himedia, respectivamente). Em relação aos explantes de origem apical, não houve diferenças entre os meios utilizados, que apresentaram percentuais entre 90 e 96%. Para explantes axilares o percentual de sobreviventes nos meios MS e Himedia, com 84 e 92% respectivamente (Figura 1).

Em relação à ocorrência de hiperidricidade, houve influência do tipo de meio sobre esta variável, sendo que o meio Himedia apresentou melhor desempenho em relação aos demais tratamentos, com apenas 22,5% de explantes hiperídricos de origem apical e 14% de explantes axilares (Figura 2). A ocorrência desta anomalia foi bastante elevada para explantes apicais cultivados em meio MS $\frac{3}{4}$ (63 %) e explantes axilares em meio MS (77,7%). O tipo de explante utilizado não provocou interferência sobre este aspecto a 5% de probabilidade de erro quando comparados dentro da mesma formulação de meio.

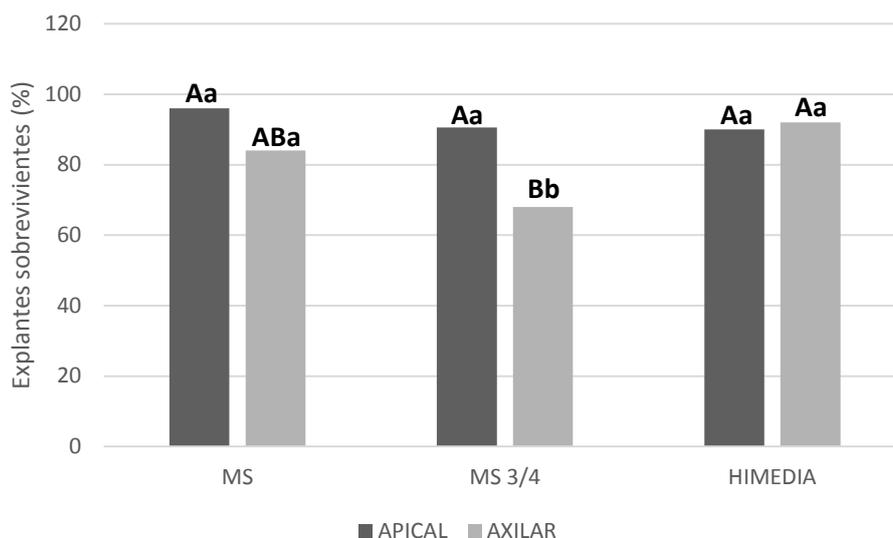


Figura 1. Percentual de explantes sobreviventes obtidos a partir de estacas apicais ou axilares de 'Marubakaido' micropropagadas em diferentes formulações de meio + 0,8 mg.L⁻¹ de BAP aos 45 dias de cultivo *in vitro*. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para meio e minúscula para explante não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A micropropagação de plantas lenhosas, principalmente de espécies do gênero *Malus*, é muitas vezes dificultada pelo fenômeno da hiperidricidade (CHAKRABARTY et al., 2003). Essa anomalia se caracteriza por uma aparência vítrea ou inchaço do tecido, geralmente resultando em taxas reduzidas de multiplicação, brotações de má qualidade e necrose dos tecidos. Os explantes parecem túrgidos, aguados e com superfície hipolignificada, seus órgãos são translúcidos, em alguns casos menos verdes e facilmente quebráveis (CHAKRABARTY et al., 2005).

Embora a ocorrência de hiperidricidade permaneça imprevisível e seja induzida por diversos fatores, o estresse parece ser o principal fator subjacente ao fenômeno (CHAKRABARTY et al., 2005). Estes fatores podem ter origem física, como ferimentos provocados ao tecido, ou química, relacionados à disponibilidade de água, teor de nutrientes e desequilíbrio hormonal nos meios de cultura, além da presença de etileno na atmosfera do frasco (HAZARIKA, 2006). O acúmulo excessivo de água no tecido vegetal, sintoma mais característico de hiperidricidade, pode resultar em esgotamento das concentrações de oxigênio celulares, o que acarreta em diversos distúrbios fisiológicos devido à interferência na cadeia de transporte de elétrons da respiração (CHAKRABARTY et al., 2005).

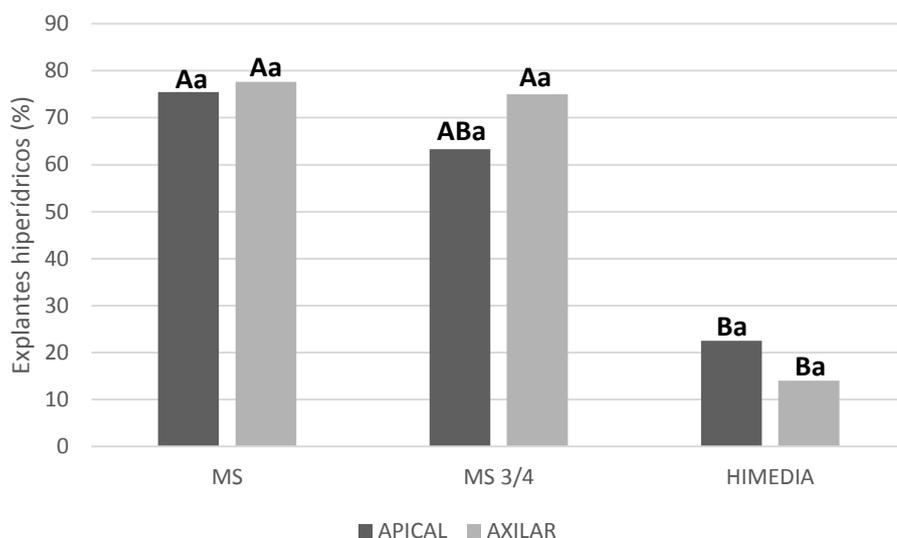


Figura 2. Percentual de hiperidricidade em brotações de 'Marubakaido' em função do tipo de explante e diferentes formulações de meio + 0,8 mg.L⁻¹ de BAP aos 45 dias de cultivo *in vitro*. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para meio e minúscula para explante não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Além disso, um dos fatores descritos como indutores de hiperidricidade é a quantidade de agente gelificante, pois um incremento na concentração de ágar no meio semissólido aumenta a resistência à difusão de sais e diminui o potencial hídrico, tendo efeito sobre a absorção de nutrientes, inibição do crescimento e redução no processo de hiperidricidade, motivo pelo qual alguns autores sugerem aumentar sua concentração no meio de cultura (PEREIRA-NETTO et al., 2007). Contudo, a elevação na concentração de agente gelificante resulta em aumento de custos na técnica.

Visando diminuir custos e ocorrência de hiperidricidade, alguns autores indicam a redução da concentração de sais do meio MS para diversas plantas lenhosas, em especial quanto à disponibilidade de nitrogênio, que pode diminuir a incidência de hiperidricidade sem interferir no sucesso da multiplicação (RAMAGE, 2002; TAMAKI et al., 2007). Além disso, algumas cultivares de macieira mostraram adaptação a outras formulações de meio de cultura, que apresentam diferentes concentrações de sais, como WPM, QL e DKW (CICCOTI et al., 2008 e 2009), Lepivre (WELANDER, 1985) e LS (VAN NIEUWKERK et al., 1986). No entanto Dobránszki et al. (2010) cita que Ciccoti (2008) observou redução da altura e clorose dos brotos em alguns genótipos de macieira quando cultivadas em meio WPM, possivelmente devido ao seu baixo conteúdo de nitrogênio, o que torna preferencial o uso do meio MS.

O meio MS é conhecido por conter alta concentração de nitrogênio e potássio, macronutrientes envolvidos em processos metabólicos relacionados ao crescimento e vigor vegetal. O nitrogênio é constituinte de ácidos nucleicos, nucleotídeos, aminoácidos, amidas, proteínas, coenzimas, etc. (XU et al., 2012) enquanto o potássio é o principal cátion envolvido na manutenção do turgor e eletroneutralidade celular, além de ser cofator na reação de mais de 40 enzimas (WANG et al., 2013).

Geralmente estes nutrientes são fornecidos aos meios de cultura na forma de nitrato de amônio e nitrato de potássio, de forma que decidiu-se reduzir a $\frac{3}{4}$ da sua concentração em um dos meios utilizados no experimento (ZANANDREA et al., 2009). No entanto, no presente estudo este meio não determinou melhores condições de crescimento, tendo, ao contrário, apresentado maior percentual de morte de explantes, independentemente do tipo de meio utilizado (média de 79%). Outro aspecto observado foram as altas taxas de hiperhidricidade, o que inviabiliza sua utilização para micropropagação da cultivar 'Marubakaido' (Figura 3). Considerando que estes nutrientes estão relacionados à homeostase e funções bioquímicas essenciais para o desenvolvimento das plantas, a redução em sua concentração pode ter afetado os mecanismos de absorção, sinalização e transporte celulares, o que justificaria uma elevada absorção de água e alto teor de hiperhidricidade observados (HAZARIKA, 2006; WANG et al., 2013).

Outro aspecto relevante foi observado por Pereira-Netto et al. (2007), que verificou que a repicagem *in vitro* de 'Marubakaido' por longo período torna as brotações muito sensíveis a mudanças na composição de meio. Segundo o autor, a razão para que isso ocorra não tem uma explicação simples, mas a diferença no vigor dos explantes pode ser responsável por essa sensibilidade diferencial. Desta forma, como o material utilizado neste trabalho estava habituado ao meio Himedia, uma alteração no meio de cultura pode ter induzido ao elevado grau de hiperhidricidade observada nos tratamentos MS e MS $\frac{3}{4}$.



Figura 3. Brotações hiperídricas de *Malus prunifolia* cv. 'Marubakaido' obtidas de meio MS modificado a $\frac{3}{4}$ da concentração de NH_4NO_3 e KNO_3 + $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP após 45 dias de cultivo *in vitro*.

Em relação ao número médio e comprimento de brotações, não houve diferença estatística significativa tanto para a fator meio quanto para tipo de explante, com média global de 3,27 brotações e 1,43 cm (Tabela 1). Modgil et al. (1999) em estudo sobre o efeito que gemas apicais e estacas nodais exerciam sobre a multiplicação da cultivar 'Tydeman's Early Worcester', concluiu que o número de novos brotos foi maior quando segmentos nodais foram utilizadas como explantes, embora geralmente mais curtos (8,4 novos brotos por explante com média de 3,16 cm de comprimento) em comparação com brotos provenientes de explantes apicais (4,4 novos brotos por explante com um comprimento de 5,16 centímetros).

Considera-se que ápices meristemáticos não são o melhor tipo de explante quando se visa elevar a taxa de multiplicação, uma vez que a dominância apical, provocada pelo maior acúmulo de auxina nas gemas apicais em detrimento das axilares, leva ao incremento de altura ao invés de produção de gemas secundárias (ERIG et al., 2002). Neste sentido, embora os resultados deste experimento não tenham demonstrado diferença estatística significativa para o número de brotações em função do tipo de explante utilizado, percebeu-se, como observado na tabela 1, que o número de brotações produzido por segmentos nodais foi maior do que o encontrado para gemas apicais para os meios com composição completa, MS e Himedia (3,82 e

4,04 respectivamente para estacas axilares contra 3,01 e 2,74 para explantes apicais).

Tabela 1. Número médio de brotações e comprimento de segmentos nodais e apicais obtidos de *Malus prunifolia* cv. Marubakaido quando submetidos a cultivo *in vitro* com diferentes tipos de meio por 45 dias.

Meio	Nº Brotações		Comprimento (cm)	
	Apical	Axilar	Apical	Axilar
MS	3,01	3,82	1,33	1,23
MS $\frac{3}{4}$	3,88	2,24	1,41	1,12
HIMEDIA	2,74	4,04	1,48	1,63
Média	3,27		1,43	
CV (%)	47,89		26,85	

As médias não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade do erro.

O número médio de brotações obtido neste estudo foi consideravelmente menor do que o encontrado por Giacobbo et al. (2003), em que segmentos nodais com duas gemas apresentaram 6,5 brotações na mesma concentração de BAP para 'Marubakaido'. O autor, no entanto, utilizou menor concentração de ágar na composição do meio de cultura, o que pode interferir na absorção de nutrientes pelo explante, possibilitando melhor desenvolvimento embora aumente as chances de desenvolver culturas hiperídricas. No entanto, os resultados obtidos foram melhores do que o observado por Nunes et al. (1999), que obteve 2,4 brotações por explante da mesma cultivar nas mesmas condições de cultivo.

Quanto ao comprimento médio das brotações os valores obtidos neste estudo (1,43 cm) são semelhantes aos encontrados tanto por Nunes et al. (1999) quanto por Giacobbo et al. (2003) para o mesmo genótipo na mesma concentração de BAP (1,23 e 1,25 cm respectivamente). A figura 4 ilustra o comprimento das maiores brotações obtidas em cada tratamento para meio e explante. Nunes et al. (1999) citaram que a elevação na concentração de BAP para 1 mg.L⁻¹ provocou redução no número médio de brotações (de 2,4 em 0,8 mg.L⁻¹ para 1,73), além de apresentar comprimento menor do que o obtido em concentrações mais baixas de reguladores de crescimento (0,81 cm contra 1,23 cm quando a concentração utilizada foi de 0,8 mg.L⁻¹). Dessa forma, não observou-se vantagens na variação da concentração de BAP na condução destes experimentos.



Figura 4. Brotações de 'Marubakaido' desenvolvidas em meios MS (I), MS $\frac{3}{4}$ (II) e Himedia (III) + 0,8 mg.L⁻¹ de BAP para A) entrenó (gemas axilares) e B) apical após 45 dias de cultivo *in vitro*.

Quanto ao número de gemas formadas, o tipo de meio apresentou diferença significativa a nível de 5% de probabilidade. Explantes de origem axilar produziram mais gemas do que apicais para meio MS (8,28 e 7,04 respectivamente), condizendo com a literatura, visto que a excisão da gema apical durante a introdução do explante no meio de cultura provoca a superação da dominância apical, favorecendo o surgimento e desenvolvimento de gemas secundárias (ERIG et al., 2002).

Nunes et al. (1999) obtiveram 4,45 gemas por brotação de 'Marubakaido' nas mesmas condições utilizadas neste experimento. Esta diferença de valores pode ser devido ao tempo de multiplicação *in vitro* ocorrido antes da instalação dos tratamentos, já que o número de repicagens interfere no processo de diferenciação celular (PEREIRA-NETTO et al., 2007). Os meios Himedia e MS $\frac{3}{4}$ não mostraram diferença quanto aos tipos de explante. No entanto, o meio Himedia, que apresentou média de 6,3 gemas por brotação, diferiu estatisticamente dos demais tratamentos, que não apresentaram diferença entre si, com médias de 7,66 para MS e 7,58 para MS $\frac{3}{4}$ (Figura 5).

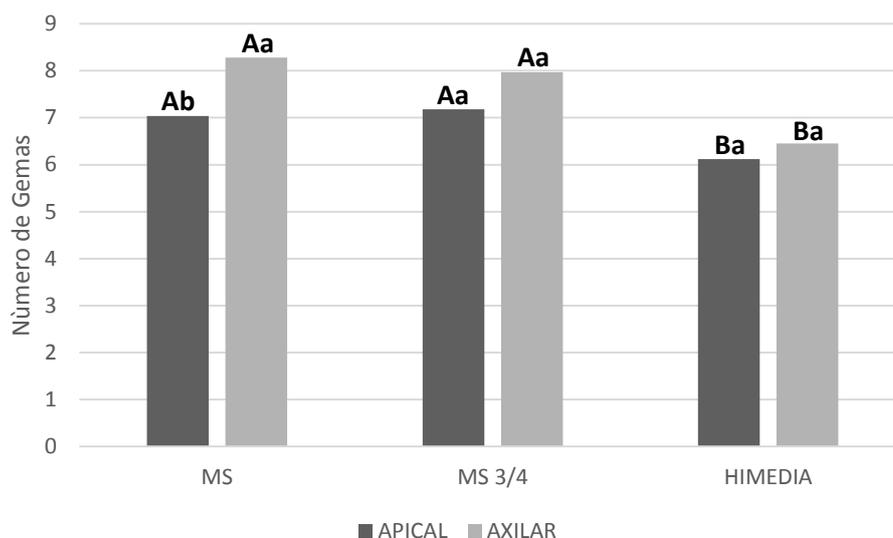


Figura 5. Número médio de gemas obtidas de explantes apicais ou axilares de ‘Marubakaido’ micropropagadas em diferentes formulações de meio + 0,8 mg.L⁻¹ de BAP aos 45 dias de cultivo *in vitro*. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para meio e minúscula para explante não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Uma vez que ambos, MS e Himedia, possuem a mesma composição, as diferenças morfológicas observadas podem ser advindas da manipulação de ambas soluções (uma vez que Himedia é industrializado e MS é produzido em laboratório, possibilitando erros de manipulação ou armazenamento dos reagentes) ou da forma como o ferro está disponível para o explante. Os meios MS e MS^{3/4} foram preparados com EDTA-Férrico (oxidado), enquanto o MS Himedia apresenta EDTA-Ferroso (reduzido) em sua composição, conforme formulação original do meio MS. Ambas as formas de ferro são absorvidas normalmente pelas plantas, porém a maioria das espécies absorvem melhor o Ferro como Fe²⁺ (forma mais solúvel), ao invés do quelato de Fe³⁺, o que torna seu uso mais comum em laboratório (SCHMIDT, 2003). Em algumas espécies de macieira o crescimento das brotações foi favorecido quando a forma quelatada (Fe³⁺) foi utilizada como fonte de ferro (DOBRÁNSZKI et al., 2010; ZANANDREA et al., 2009), mas não foi observado para ‘Marubakaido’ neste experimento.

Em função dos resultados obtidos, observa-se que a formulação comercial do meio Himedia apresentou melhor performance do que as demais composições utilizadas neste estudo. Isso porque, quando se pretende melhorar protocolos de multiplicação *in vitro*, não basta visar apenas as altas

taxas de multiplicação em alguns explantes. O importante é obter uma taxa média satisfatória, com o mínimo de variação de explante para explante (ERIG et al., 2002), qualidade e homogeneidade da parte aérea produzida (GEORGE e DEBERGH, 2008) e brotações com comprimento adequado que proporcionem facilidade de manuseio (SILVA, 2013), pois estes fatores determinarão o sucesso no enraizamento e, por consequência, na produção de mudas (DANTAS et al., 2002).

Neste sentido, o meio Himedia apresentou melhores condições de multiplicação, visto que os explantes apresentaram número adequado de brotações, com comprimento suficiente e menor percentual de hiperidricidade. Na figura 6.A observa-se que algumas brotações em meio MS apresentaram mudança no sentido de crescimento, com curvatura em direção ao meio de cultura, enquanto todas as brotações obtidas de meio Himedia (Figura 6.B) mostraram gravitropismo adequado. As causas para este fenômeno não foram investigadas, de forma que outros estudos precisam ser realizados a fim de esclarecer este aspecto.

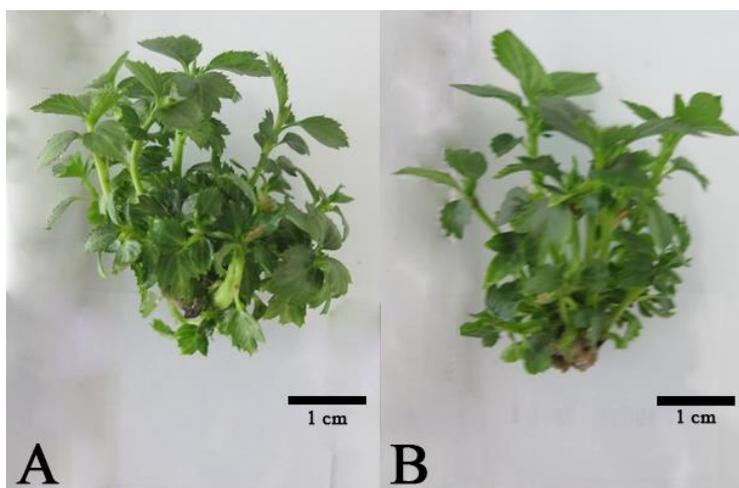


Figura 6. Detalhes de brotações de 'Marubakaido' obtidas em meio MS (A) e Himedia B) a partir de segmentos nodais.

5. Conclusões

- O tipo de explante (apical ou axilar) não afeta o número e comprimento de brotações de porta-enxerto 'Marubakaido' micropropagado;
- O meio comercial Himedia induz menor hiperidricidade e maior homogeneidade das brotações obtidas.

6. Referências Bibliográficas

ABREU, Monita F.; PEDROTTI, Enio L. *Micropropagação de macieira*. **Revista biotecnologia ciência & desenvolvimento**. n. 31, p. 100-108 Jul./Dez. 2003.

AMIRI, E. M.; ELAHINIA, A.; *Optimization of medium composition for apple rootstocks*. **African Journal of Biotechnology**. V. 10, n. 18, p. 3594-3601, Mai. 2011a.

AMIRI, M. E.; ELAHINIA, A. *Influence of medium compositions on growth of apple rootstocks ('M9', 'M27', 'MM106') in In vitro condition*. **Acta Horticulturae**. Vol. 923, p. 139-146, 2011b.

Analytical Software. Statistix 9. User's Manual Analytical Software. Florida State University Tallahassee, Florida, USA, 2009.

BENNICI, A. *Expression of hormone-autotrophy in tissues of plantlets regenerated from habituated callus of Nicotiana bigelovii*. **Plant Cell, Tissue and organ culture**. V. 2, p. 355-358, 1983.

BHATIA, Poonam; ASHWATH, Nanjappa; SENARATNA, Tissa; MIDMORE, David. *Tissue culture studies of tomato (Lycopersicon esculentum)*. **Plant Cell, Tissue and organ culture**. V. 78, p. 1-21, 2004.

BHATTI, Shammi; JHA, Gopuljee. *Current trends and future prospects of biotechnological interventions through tissue culture in apple*. **Plant Cell**. Vol 29, p. 1215-1225, 2010.

CARDOSO, Carina. YAMAMOTO, Lilian Y.; PRETI, Edilene A.; ASSIS, Adriane M.; NEVES, Carmen S. V. J.; ROBERTO, Sergio R. *AIB e substratos no enraizamento de estacas de pessegueiro 'Okinawa' coletadas no outono*. **Semina: Ciências agrárias**. Londrina: v, 32, n. 4, p. 1307-1314, Out./Dez. 2011.

CARDOSO, Jean C.; SILVA, Jaime A. T.; *Gerbera micropropagation*. **Biotechnology advances**. Vol. 31, p. 1344-1357, 2013.

CHAKRABARTY D.; HAHN E.J.; YOON Y.S.; PAEK K.Y.; *Micropropagation of apple root stock 'M9 EMLA' using bioreactor*. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**. V.78, p. 605-609, 2003.

CHAKRABARTY, D.; PARK, S. Y.; ALI, M. B.; SHIN, K. S.; PAEK, K. Y. *Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects*. **Tree Physiology**. Vol 26, p. 377-388, 2005.

CHUGH, Samira; GUHA, Satyakam; RAO, I. Usha. *Micropropagation or orchids: A review on the potential of different explants*. **Scientia Horticulturae**. V. 122, p.507-520, 2009.

CICCOTI A.M.; BISOGNIN C.; BATTOCLETTI I.; SALVADORI A.; HERDEMERTENS M.; JARAUSCH W.; *Micropropagation of apple proliferation-resistant apomictic Malus sieboldii genotypes*. **Agronomy Research**. V. 6, p.445-458, p. 2008.

- CICCOTI A.M.; BISOGNIN C.; BATTOCLETTI I.; SALVADORI A.; HERDEMERTENS M.; WALLBRAIN M.; et al. *Micropropagation of Malus sieboldii hybrids resistant to apple proliferation disease. Acta Horticulturae*. V. 839, p.35-42, 2009.
- DANTAS, A. C. de M.; NESI, A. N.; MACHADO, L. B.; HAERTER, J.; FORTES, G. R. de L. *Estabelecimento e multiplicação in vitro de cultivares de Pyrus spp. Revista Brasileira de Agrociência*, v.8, n.1, p.19-23, 2002.
- DENARDI, F. "Porta-enxertos". In: EPAGRI. *A cultura da macieira*. Florianópolis-SC: EPAGRI. p.169-227, 2002.
- DOBRÁNSKI, Judit; SILVA, Jaime A. T. *Micropropagation of apple - A review. Biotechnology Advances*. Vol. 28, p. 452-488, 2010.
- ERIG, Alan C.; SCHUCH, Márcia W. *Multiplicação in vitro do porta-enxerto de macieira CV. Marubakaido: Efeito da orientatação do explante no meio de cultura. Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 293-295, agosto 2002.
- GEORGE E.F.; DEBERGH P.C.; "Micropropagation: uses and methods". In: George E. F.; Hall M.A.; De Klerk G.J. (org.). *Plant propagation by tissue culture*. Dordrecht, Netherlands: Springer. 3. Ed.p. 29-64, 2008.
- GIACOBBO, Clevison L; GOMES, Fernando R. C.; KROTH, Leandro; CONCEIÇÃO, Melissa K.; FORTES, Gerson R. L. *Multiplicação in vitro de porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido (Malus prunifolia willd, borkh) com diferentes níveis de Benzilaminopurina e ácido naftalenacético. Revista Brasileira Agrociência*. V. 9, n. 1, p. 31-33, Jan./Mar. 2003.
- GREVET, Anne-Limanton; SOTTA, Bruno; BROWN, Spencer; JULLIEN, Marc. *Analysis of habituated embryogenic lines in Asparagus officinalis L.: growth characteristics, hormone content and ploidy level of calli and regenerated plants. Plant Science*. Vol 160, p. 15-26, 2000.
- HAZARIKA, B. N. *Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. Scientia horticulturae*. V. 108, p. 105-120, 2006.
- ISPA, **Informativo da Secretaria de Política Agrícola**. Cenário da cadeia produtiva da maçã. Disponível em: www.agapomi.com.br. Acesso em 31 de jan. 2015.
- KEVERS, C.; COUMANS, M.; COUMANS-GILLÈS, M.-F.; GASPAR, Th. *Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured in vitro. Physiology Plantarum*. Copenhagen, v. 61, p. 69-74, 1984.
- LIMANTON-GREVET, Anne.; JULLIEN, Marc.; *Somatic embryogenesis in Asparagus officinalis can be an in vitro selection process leading to habituated and 2, 4-D dependent embryogenic lines. Plant Physiology and Biochemistry*. V. 38, 567-576, 2000.
- MACHADO, Marília P; CARVALHO, Dayse C.; BIASI, Luiz A. *Multiplicação in vitro do porta-enxerto de macieira 'marubakaido' em diferentes meios de cultivos e concentrações de ácido giberélico. Scientia Agraria*. Paraná, V. 5, n. 1-2, p. 69-72, 2004.

MAHNA, N.; AZAR, Motallebi. In vitro *micropropagation of apple (Malus x Domestica borkh.) cv. golden delicious*. **Communications in agricultural and applied biological sciences**. Ghent university, Vol 72, n. 1, p. 235-238, 2007.

MEINS Jr., Frederick. *Heritable variation in plant cell culture*. **Annual Review Plant Physiology**. Vol. 34, p. 327-346, 1983.

MODGIL, M.; SHARMA, D. R.; BHARDWAJ, S. V. *Micropropagation of apple cv. Tydeman's Early Worcester*. **Scientia horticultrae**. V. 81, p.179-188, 1999.

MURASHIGE T.; SKOOG f.; *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. **Physiology Plantarum**. V. 15, p. 473-497, 1962.

NICKEL, O. "Doenças causadas por vírus". In: KOVALESKI, A. (org.). *Maçã: fitossanidade*. Brasília/DF: **Embrapa Informação Tecnológica**; Bento Gonçalves/RS: Embrapa Uva e Vinho. p.61-79, 2004.

NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M.; JELKMANN, W.; KUHN, G. B. *Sequence analysis of the capsid protein gene of an isolate of Apple stem grooving virus, and its survey in southern Brazil*. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v.26, n.3, p.655-659, set. 2001.

NICKEL, O.; JELKMANN, W.; KUHN, G. B. *Occurrence of Apple stem grooving capillovirus in Santa Catarina, Brazil, detected by RT-PCR*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, n.3, p.444-446, 1999.

NOORMOHAMMADI, Z.; FARAHANI, F.; SAFARZADEH, M. *Study of morphological traits changes in different media culture of two apple rootstocks (M26 and MM106)*. **Malaysian Applied Biology Journal**, v.42, n.1, p.25-33, 2013.

NORDSTRÖM, Anders; TARKOWSKI, Petr; TARKOWSKA, Danuse; NORBAEK, Rikke; ASTOT, Crister; DOLEZAL, Karel; SANDBERG, Göran. *Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in Arabidopsis thaliana: A factor of potential importance for auxin–cytokinin-regulated development*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. Vol. 101, n. 21, p. 8039-8044, Mai. 2004.

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, Jonny E. S.; FORTES, Gerson R. de L.; *Multiplicação e aclimatização da macieira influenciada pelo tipo de explante e pelo tempo de permanência em meio de cultura de enraizamento*. **Revista Brasileira Fruticultura**. Jaboticabal, v. 23, n.2, p. 417-420, Ago. 2001b.

PEREIRA, Jonny E. S.; FORTES, Gerson R. de L.; SILVA, João B. *Baixa temperatura para explantes do porta-enxerto de macieira 'marubakaido' in vitro durante a aclimatização*. **Scientia Agricola**. V. 58, n. 2, p. 401-405, Abr./Jun. 2001c.

- PEREIRA-NETO, Adauto; PETKOWICZ, Carmem L. O.; CRUZ-SILVA, Claudia T. A.; GAZZONI, Mariana T.; MELLO, Arianne F. P.; SILVEIRA, Joana L. M. *Differential performance of marubakaido apple rootstock shoots grown in culture media containing different agar brands: dynamic rheological analysis*. In **Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** Vol. 43, p. 356-363, 2007.
- PEREIRA-NETTO, A. B. *Stigmaterol-driven enhancement of the in vitro multiplication rate for the marubakaido apple rootstock*. **Trees**. V. 26, p. 581-586, 2012.
- PETRI, J. L. "Fatores edafoclimáticos". In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis-SC: EPAGRI. p.743, 2002.
- PETRI, José Luiz.; LEITE, Gabriel B.; COUTO, Marcelo; FRANCESCOTTO, Poliana. *Avanços na cultura de macieira no Brasil*. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, Volume especial, p. 48-56, Out. 2001.
- RAMAGE, C.M.; WILLIAMS, R.R. *Mineral nutrition and plant morphogenesis*. In **vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Ashford, v.38,p.116-124, 2002.
- ROBINSON, Terence. *Avanços na pomicultura mundial*. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, Volume especial, p. 37-47, Out. 2001.
- SCHMIDT, Wolfgang. *Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants*. **Plant Science**. Vol. 8, n. 4, p. 188-193, Abr. 2003.
- SILVA, Ilda M. de C. *Cultivo in vitro de Pyrus sp., cultivares Carrick, Cascatense e Ya-Li*. Tese (Doutoramento de Fisiologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.
- STOLF, Elaine C.; DANTAS, Adriana C. de M.; BONETTI, José I.; COMIN, Jucinei J.; NODARI, Rubens O. *Estabelecimento de critérios para selecionar porta-enxertos de macieira tolerantes ao alumínio em solução nutritiva*. **Revista Brasileira de Fruticultura**. V. 30, n. 2, p. 476-481, Jun. 2008.
- TABORI, Katalin M.- ; DOBRANSKY, Judit ;SILVA, Jaime A. T. ; BUTLEY, Sean M. ; HUDAK, Ildikó.. *The role cytokinins in shoot organogenesis in apple*. **Plant Cell, Tissue and organ culture**. V. 101, p. 251-267, 2010.
- TAMAKI, V.; MERCIER, H.; NIEVOLA, C.C.; *Cultivo in vitro de clones de Ananas comosus (L.) Merrill cultivar Smooth Cayene em diferentes concentrações de macronutrientes*. **Hoehnea** v 34, n 1 67-73, 2007.
- USDA, **United States Department of Agriculture**. Disponível em: <<http://usda.org>>. Online. Acesso em 31 jan. 2015.
- VAN NIEUWKERK J.P.; ZIMMERMAN R.H.; FORDHAM I.; *Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation in vitro*. **Horticultural Science**. V. 21, p. 516-8, 1986.
- VIEIRA, R. L.; LEITE, G. B.; WAMSER, A. F. *Efeito de substratos porosos no enraizamento in vitro do portaenxerto de macieira m-9 (Malus pumilla)*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.29, n.1, p.128-132, 2007.
- WANG, Yi; WU, Wei-Hua; *Potassium transport and signaling in higher plants*.

Annual review plant biology. V. 64, p.451-476, 2013.

WEBSTER C.A.; JONES O.P.; *Micropropagation of some cold hardy dwarfing rootstocks for apple.* **Journal of Horticultural Science & Biotechnology.** V.66, p.1-6, 1991.

WELANDER M. *In vitro shoot and root formation in the apple cultivar Åkerö.* **Annals of Botany.** V.55, p.249-261, 1985.

XU, Jin; WANG, Yuzhen; ZHANG, Yuxiu; CHAI, Tuanyao. *Rapid in vitro multiplication and ex vitro rooting of Malus zumi (Matsumura) Rehd.* **Acta physiology.** V. 30, p. 129-132, 2008.

ZANANDREA, Ilisandra; BACARIN, Marcos A.; BRAGA, Eugenia J. B.; BIANCHI, Valmor J. B.; PETERS, José A *Morphological and Physiological Photon Flux Influence Under in vitro Culture of Apple Shoots.* . **Brazilian archives of biology and technology** Vol. 52, n. 5, p. 1091-1098, Set./Out. 2009.

ZANANDREA, Ilisandra; BACARIN, Marcos A.; SCHMITZ, DOUGLAS D.; BRAGA, Eugenia J. B.; PETERS, José A. *Chlorophyll fluorescence in in vitro cultivated apple.* **Revista Brasileira Agrociência.** Pelotas, v. 12, n. 3, p. 305-308, Jul./Set. 2006.

CAPÍTULO 2 - Micropropagação de *Malus prunifolia* cv. Marubakaido em biorreator de imersão temporária

1. Introdução

A maçã é atualmente a fruta de maior consumo *in natura* no mundo e a frutífera de clima temperado mais amplamente disseminada e cultivada (HOKANSON, et al., 2001). Segundo a FAO os maiores produtores são a China e Estados Unidos, com o Brasil ocupando a décima primeira posição mundial (FAO, 2015). No país, a produção concentra-se nos estados do sul, principalmente devido à demanda de frio para superação de dormência, de maneira que Rio Grande do Sul e Santa Catarina respondem por 96% da produção nacional (EPAGRI, 2014).

A macieira é uma cultura propagada assexuadamente por enxertia. Os porta-enxertos, por sua vez, são propagados vegetativamente por estaquia ou, principalmente, mergulhia de cepa (DENARDI, 2002). O porta-enxerto determina o vigor da planta, além de oferecer resistência a patógenos e adaptação a diferentes tipos de solo (VIEIRA et al., 2007). Dentre as principais cultivares de porta-enxerto o 'Marubakaido' (*Malus prunifolia*) é amplamente utilizado no Brasil em virtude da sua adaptação aos solos rochosos da região sul, resistência a pragas e excelente comportamento em situações de replantio em solos com baixa fertilidade (PETRI, 2008; MARCON FILHO et al. 2009). Devido a problemas envolvendo a propagação vegetativa, como o baixo percentual de enraizamento e por não assegurar a produção de plantas com qualidade fitossanitária (DOBRÁNSZKI et al., 2010; CARDOSO et al., 2011) surge a necessidade de melhorar protocolos de multiplicação *in vitro* para a cultura.

Visto que mudanças na composição de nutrientes e, principalmente, de reguladores de crescimento tem grandes impactos sobre o direcionamento que o explante tomará no cultivo *in vitro* (DOBRÁNSZKI et al., 2010), os protocolos de micropropagação para macieiras diferem de acordo com os genótipos utilizados. Desta forma, cada variedade precisa ter concentrações adequadas de nutrientes e reguladores de crescimento (DOBRÁNSZKI et al., 2010). Diversos trabalhos já foram realizados neste sentido, principalmente em sistema convencional com a utilização de meio semissólido, onde o meio MS

(MURASHIGE e SKOOG, 1962), é a composição mais utilizada (BHATTI et al., 2010).

A multiplicação convencional de cultura de tecidos é limitada na produção comercial de diversas espécies de plantas devido ao alto custo relacionado à elevada demanda de trabalho manual e baixo grau de automação (CHU, 1995). A utilização de biorreatores pode ser uma alternativa promissora para propagação em massa quando os protocolos estão bem definidos (ETIENNE et al., 2002). Geralmente sistemas em fase líquida não asseguram crescimento satisfatório de explantes diferenciados, já que a completa imersão dos tecidos ou órgãos causa má-formação e perda de material por asfixia ou hiperidricidade (GEORGIEV et al., 2014). Neste sentido a técnica de imersão temporária tem sido mais utilizada para a micropropagação, pois implica em contato temporário entre as plantas e o meio, combinando aeração e os efeitos positivos de um meio de cultura líquido, podendo-se reduzir problemas relacionados a asfixia, danos mecânicos e hiperidricidade quando comparado a propagação em imersão constante (ETIENNE et al., 2002).

Para macieira a técnica de imersão temporária é bastante recente, cujos primeiros registros datam de 2003 (CHAKRABARTY et al., 2003). No entanto, não há relatos na literatura sobre o emprego deste sistema em micropropagação de 'Marubakaido'. Além disso, a fase de aclimatização é crucial na eficiência da técnica a nível comercial, de forma que a indução de rizogênese *in vitro* pode determinar uma vantagem de adaptação para a planta em casa de vegetação (GEORGE, 2008). Desta forma, torna-se necessário averiguar a eficiência de formação de raízes em SIT e a proporção de plantas sobreviventes durante aclimatização.

2. Objetivos

Avaliar as condições de cultivo de porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' em microbiorreatores de imersão temporária em três composições de meio de cultura e comparar com micropropagação e sistema convencional;

Avaliar as taxas de enraizamento *in vitro* de brotações oriundas de SIT destacadas ou em tufos e aclimatização das estacas enraizadas.

3. Material e Métodos

3.1 Material Vegetal

O material utilizado proveio de isolamento de meristemas de plantas de 'Marubakaido' cultivadas em casa de vegetação do Centro Nacional de Pesquisa em Uva e Vinho – EMBRAPA Uva e Vinho, Bento Gonçalves/RS. As plantas obtidas, cedidas pelo Laboratório de Cultura de Tecidos e Biotecnologia da citada instituição, foram multiplicadas *in vitro* por 180 dias em meio nutritivo Himedia (meio comercial com formulação igual ao MS), acrescido de 0,8 mg.L⁻¹ de BAP, 30 g.L⁻¹ de sacarose e 7 g.L⁻¹ de ágar, pH 5,8, com repicagem a cada 45 dias. Em função dos resultados observados no capítulo 1 deste trabalho, que demonstraram que o número médio e comprimento de brotações não sofreram influência do tipo de explante para micropropagação de 'Marubakaido', optou-se por utilizar segmentos nodais contendo três gemas axilares, com aproximadamente 0,8 cm na condução deste experimento. A escolha deste tipo de explante também se deve pela obtenção de maior quantidade de segmentos nodais em micropropagação quando comparado com estacas apicais.

3.2 Metodologia

Experimento 1. Multiplicação *in vitro* em sistema convencional e biorreator de imersão temporária

Os segmentos nodais contendo gemas axilares selecionados foram cultivados em três meios de cultura: MS completo, MS modificado ($\frac{3}{4}$ da concentração normal de NH₄NO₃ e KNO₃, identificado como MS $\frac{3}{4}$) e Himedia, todos acrescidos de 0,8 mg.L⁻¹ de BAP, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 30 g.L⁻¹ de sacarose, pH 5,8. Foram utilizados dois diferentes sistemas de propagação *in vitro*: meio semissólido, onde foi adicionado 7 g.L⁻¹ de ágar aos meios de cultura, os quais foram distribuídos em frascos (30 mL por recipiente), e microbiorreatores de imersão temporária (SIT) desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecido de Plantas da Universidade Federal de Pelotas, com

capacidade para 800 mL contendo 300 mL de meio por frasco utilizado como reservatório para meio (Figura 1). Em seguida todos os recipientes de ambos sistemas foram autoclavados a 120°C, 1,5 atm por 20 minutos.



Figura 1. Conjunto de frascos de microbiorretores em SIT dispostos em sala de crescimento.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por fatorial de três tipos de meio e dois tipos de sistema de micropropagação. Para o cultivo semissólido foram inoculados cinco explantes por frasco para cada tratamento de meio de cultura e seis repetições, enquanto para os microbiorretores foram utilizados dez explantes por frasco para cada tratamento de meio e quatro repetições.

Ambos os sistemas foram mantidos em câmara de crescimento com temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e $25\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de fluxo de fótons. O SIT foi programado para imersão dos explantes por três minutos a cada seis horas, perfazendo quatro imersões a cada 24 horas. Após o período de duas semanas foi realizada no SIT trocas de meios de cultura, substituindo BAP nos meios MS, MS $\frac{3}{4}$ e Himedia por $1\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de GA_3 , $0,2\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA, além de incorporar $200\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de mio-inositol.

Quarenta e cinco dias após inoculação, avaliou-se o percentual de explantes vivos e vitrificados, número médio de brotações por explante, comprimento médio e número médio de gemas axilares de todas as brotações. Os dados obtidos foram comparados estatisticamente pela análise de variância

e submetidos a teste de Tukey a 5% de probabilidade do erro através do software Statistix 9.0 (ANALYTICAL SOFTWARE, 2009).

Experimento 2. Enraizamento e aclimatização de brotações micropropagadas em SIT

As brotações que apresentaram melhores condições de desenvolvimento após a avaliação da multiplicação em microbiorreatores (obtidas do meio Himedia) foram colocados para enraizamento no mesmo sistema em meio de cultura composto por meio Himedia diluído a 50%, acrescido de $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de ácido indolilbutírico (AIB) e 20 g.L^{-1} de sacarose, pH regulado para 5,8. Em cada recipiente do sistema utilizado como reservatório para meio foram distribuídos 300 mL de solução nutritiva, seguido de autoclavagem por 20 minutos a 120°C , 15 atm.

Os explantes foram inoculados de duas formas: brotações individualizadas na base ou em tufo, conforme sua multiplicação na fase anterior. Para brotações separadas cada frasco recebeu 15 explantes e para brotações em conjunto cada frasco recebeu quatro tufo. O sistema foi programado para quatro passagens diárias de meio de cultura para os explantes, com duração de três minutos. A formação de raízes por explante foi avaliada após quatro semanas. Em seguida, as brotações enraizadas foram aclimatizadas em casa de vegetação em bandejas seladas contendo plantmax como substrato. Após 21 dias observou-se o percentual de explantes sobreviventes.

4. Resultados e Discussão

Experimento 1.

Houve influência tanto do tipo de meio quanto do sistema de multiplicação utilizados em todas as variáveis avaliadas a 5% de probabilidade de erro. Para percentual de explantes sobreviventes, o SIT apresentou valores menores quando comparado ao sistema convencional (médias de 59,3 e 88,9%, respectivamente), embora não tenha havido diferença estatística significativa para o meio Himedia, cuja sobrevivência foi de 96,7% para sistema

convencional e 82,5% para SIT. Os meios MS e MS $\frac{3}{4}$ (Figura 2) apresentaram as menores taxas de sobrevivência em SIT (42,5 e 53% respectivamente).

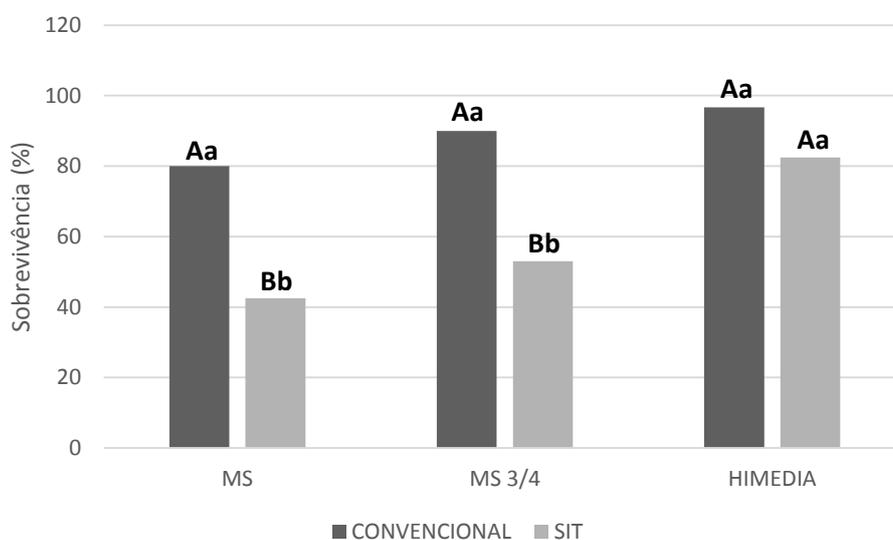


Figura 2. Percentual de explantes sobreviventes de ‘Marubakaido’ obtidos a partir de micropropagação de estacas axilares em sistema convencional ou microbiorretores em sistema de imersão temporária (SIT) em diferentes formulações de meio. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para meio e minúscula para sistema não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A elevada perda de explantes observada nos meios MS e MS $\frac{3}{4}$ em SIT pode estar relacionada ao elevado grau de hiperidricidade nas brotações obtidas. De acordo com os dados obtidos, todos os meios utilizados apresentaram alto percentual de hiperidricidade quando foi utilizado SIT, chegando a 100% na formulação MS. No sistema convencional os meios MS e MS $\frac{3}{4}$ apresentaram valores de 48,9 e 60,8% de explantes hiperídricos, respectivamente (Figura 3).

Os sintomas de hiperidricidade observados incluíam folhas grossas e largas, translúcidas, de aspecto amassado ou enrolado e quebradiças (Figura 4.A e 4.C), além de intensa formação de calos por toda a extensão do explante (Figura 4.B e 4.D). De acordo com Hazarika (2006), em folhas hiperídricas observa-se alterações anatômicas como estômatos anormais, tecido epidérmico irregular, grandes espaços intercelulares no mesofilo e presença de uma cutícula fina ou ausente.

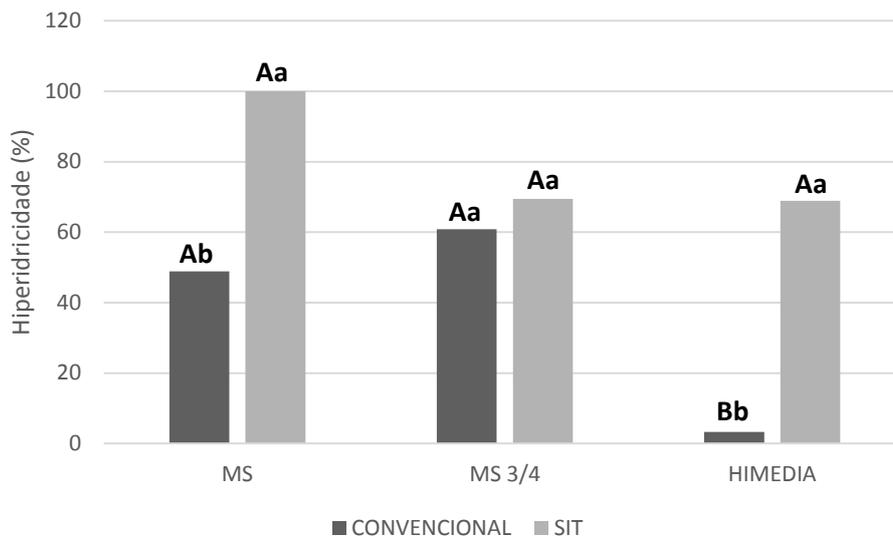


Figura 3. Percentual de hiperidricidade em brotações de 'Marubakaido' obtidas a partir de micropropagação de estacas axilares em sistema convencional ou microbiorreatores em sistema de imersão temporária (SIT) em diferentes formulações de meio. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para meio e minúscula para sistema não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.



Figura 4. Sintomas de hiperidricidade observados na micropropagação de 'Marubakaido' em SIT com meio MS (A e B) e MS $\frac{3}{4}$ (C e D).

Segundo Chakrabarty et al. (2006) as condições atmosféricas encontradas em ambiente de cultura de tecidos, que incluem alta umidade relativa, são análogas às observadas em condições de solos encharcados, estando associadas à redução da transpiração e absorção de água em excesso. Isso resulta em concentrações muito baixas de oxigênio nos tecidos, levando a interferência na respiração a nível da cadeia de transporte de elétrons. Condições de estresse podem resultar na formação de espécies reativas de oxigênio que atacam os lipídios insaturados da membrana, ácidos nucleicos, enzimas e outras estruturas celulares, que acaba resultando na morfologia anormal observada em folhas hiperídricas (CHAKRABARTY et al., 2006).

A utilização de ágar no meio semissólido, além de proporcionar sustentação para o explante, também tem efeito sobre a absorção de nutrientes, inibição do crescimento e redução no processo de hiperidricidade (PEREIRA-NETO et al., 2007). Cultura de tecidos com baixa concentração de ágar, ou seja, baixa resistência à difusão de sais e alto potencial hídrico, podem resultar em culturas hiperídricas, de forma que concentrações mais elevadas de agente gelificante têm sido usados para evitar este fenômeno. Considerando que o SIT foi executado em meio líquido, que proporciona absorção de nutrientes e água por toda superfície da planta, a ocorrência de hiperidricidade é acentuada quando se compara com sistema convencional (ARAGÓN et al., 2014).

Outro aspecto a ser considerado é que, de acordo com Zhu et al. (2005), culturas de macieira em meio líquido são sabidamente mais sensíveis a reguladores de crescimento quando comparadas com meio semissólido, de forma que as mesmas concentrações utilizadas em ambos sistemas podem produzir diferentes taxas de hiperidricidade. Isso ocorre em função de que o meio líquido promove um acesso facilitado de nutrientes e hormônios para o explante (MEHTA, 2014), aumentando sua absorção e podendo resultar em maior ocorrência de desequilíbrios fisiológicos (CHAKRABARTY et al., 2007). Desta forma, a fim de evitar a ocorrência de anomalias fisiológicas observadas neste experimento, ainda é necessário melhorar as condições de cultivo para 'Marubakaido' em SIT, através de alterações na composição de meio de cultura, tipo e concentração de reguladores de crescimento ou ainda tempo e

frequência de imersão do explantes, a fim de estabelecer um protocolo mais adequado para a cultura.

Quanto ao número médio de brotações não foi observada diferença significativa entre os tipos de meio em sistema convencional (Figura 5), como constatado no primeiro capítulo deste trabalho, embora a média observada tenha se mostrado menor do que o obtido anteriormente (3,4 brotações para gemas axilares no capítulo 1 e 2,9 neste experimento). O mesmo não foi observado quando foi utilizado SIT, onde o meio Himedia apresentou resultado superior, com média de 6,3 brotações por explante, em relação aos meios MS e MS $\frac{3}{4}$ (1,7 e 1,8 respectivamente). Estes meios (MS e MS $\frac{3}{4}$), apresentaram maior formação de calos e hiperidricidade, resultando em cerca de 3 vezes menos brotações do que o meio Himedia.

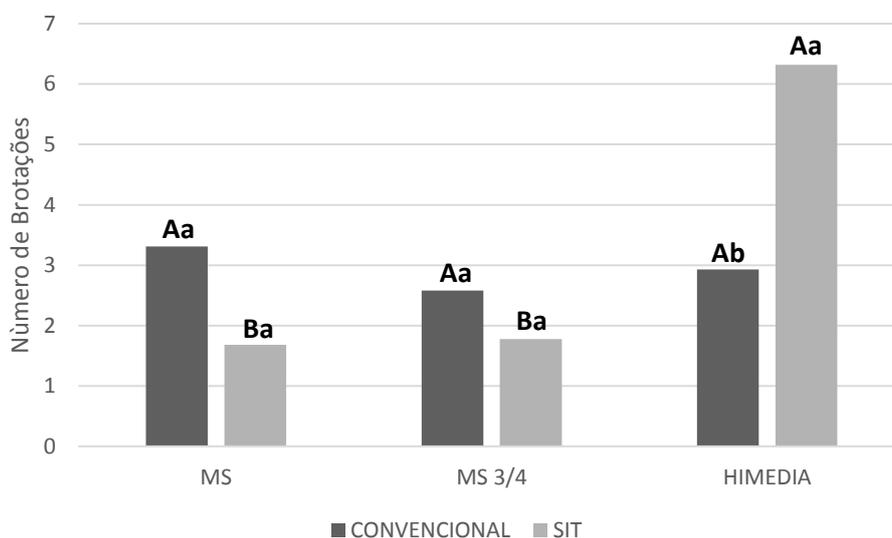


Figura 5. Número médio de brotações obtidas a partir de micropropagação de estacas axilares de 'Marubakaido' em sistema convencional ou microbiorreatores em sistema de imersão temporária (SIT) em diferentes formulações de meio. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para meio e minúscula para sistema não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Com exceção de uma única repetição de MS $\frac{3}{4}$ em SIT, onde dois dos dez utilizados produziram 11 e 28 brotações (Figura 6.E), todos os demais apresentaram apenas uma brotação, em estado de hiperidricidade, tal como observado para meio MS (Figura 6.D). Para meio Himedia o número médio de brotações foi mais uniforme entre os explantes não vitrificados, compreendendo de 5 a 33 novos brotos por explante inicial (figura 6.F). Como é possível observar na figura 6 (A, B e C), o número de brotações permaneceu constante entre os meios utilizados em sistema convencional.

O baixo número de brotações observado para MS e MS $\frac{3}{4}$ em SIT podem ser devidos ao elevado percentual de hiperidricidade que os explantes cultivados nestes meios produziram. Já para Himedia, o maior número de brotações obtido em SIT condiz com o esperado para cultivo em meio líquido, que facilita o contato dos explantes *in vitro* com os nutrientes do meio, possibilitando inclusive a absorção de nutrientes pelas folhas (ARAGÓN et al., 2014). Além disso, a disposição aleatória dos explantes dentro do recipiente inibe o transporte polar de auxina e, como consequência favorece o aparecimento de brotações, um comportamento já observado em 'Marubaikaido' por ERIG et al., 2002.



Figura 6. Brotações obtidas a partir do cultivo de 'Marubakaido' em sistema convencional (A, B e C) e em SIT (D, E, F) em meios MS (A e D), MS $\frac{3}{4}$ (B e E) e Himedia (C e F).

Quando comparada a qualidade dos explantes obtidos com meio Himedia em ambos os sistemas, percebeu-se que o SIT apresentou melhor desempenho. Um fato que deve ser levado em consideração refere-se à renovação da atmosfera dos recipientes em SIT. As condições ambientais em SIT têm influência sobre o crescimento, fisiologia e metabolismo de carbono

das folhas em cultivo *in vitro* (ARAGÓN et al., 2005). Segundo estes autores, uma das principais causas pode ser as trocas gasosas permitem a eliminação de etileno e compostos voláteis presentes nos frascos. Estes compostos em geral causam estresse nas plantas, prejudicando o crescimento, respiração, transpiração e funcionamento fisiológico normal (ETIENNE et al., 2002; ARAGÓN et al., 2014).

Zhu et al. (2005) reportaram que a troca do meio de cultura do porta-enxerto de macieira 'M.26' em sistema de imersão temporária teve efeito no incremento no número de brotações, mas não em seu comprimento. Desta forma, embora o mesmo não tenha sido observado com os meios MS e MS $\frac{3}{4}$, a perda de orientação dos explantes, associado à maior absorção de nutrientes proporcionado pela utilização de meio líquido, fornecimento renovado de nutrientes e aeração nos recipientes, podem ter influenciado na qualidade e número de brotações obtidos no tratamento de meio Himedia em SIT.

Em relação ao comprimento das brotações, como ocorreu com os resultados obtidos no capítulo 1, não houve diferença significativa entre os meios utilizados no sistema convencional, que apresentaram média de 1,29 cm (Figura 7). Contudo, em SIT os explantes cultivados em meio Himedia apresentaram os maiores valores, com média de 3,7 cm por brotação, tendo chegado a até 7,0 cm em alguns casos. Os demais meios em SIT foram inferiores e não diferiram entre si, com média de 2,18 cm para MS e 1,49 cm para MS $\frac{3}{4}$.

Segundo De La Vinã et al. (2001), o aumento no comprimento das brotações micropropagadas em SIT 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 semissólido, propiciando maior taxa de crescimento. Por outro lado, estes valores, maiores que os verificados em sistema convencional de micropropagação, podem ser devido à inclusão de 1 mg.L⁻¹ de GA₃ durante a troca de meio nos microbiorreatores após duas semanas de cultivo.

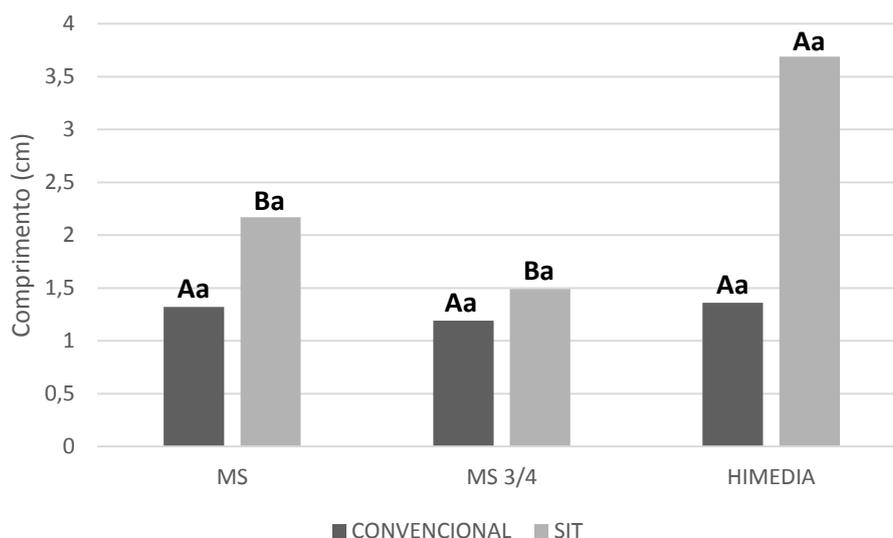


Figura 7. Comprimento médio de brotações obtidas a partir de micropropagação de estacas axilares de 'Marubakaido' em sistema convencional ou microbiorreatores em sistema de imersão temporária (SIT) em diferentes formulações de meio. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para meio e minúscula para sistema não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Giberelinas são uma classe de fitormônios envolvidos no controle diversos aspectos do crescimento e desenvolvimento de plantas, incluindo a germinação de sementes, alongamento do caule, expansão foliar e desenvolvimento de flores e sementes (YAMAGUCHI, 2008). O ácido giberélico (GA_3) é um regulador de crescimento conhecido por promover o crescimento das plantas pelo alongamento celular, que tem resultado sobre o alongamento dos entrenós (PEREIRA et al., 2001), o que é de interesse para o sucesso da técnica a nível comercial (SILVA, 2013). Em macieira o efeito de giberelinas no alongamento de brotações com tamanho reduzido produzidas em micropropagação com alta concentração de citocininas já é conhecido (DASTJERD et al., 2013). No entanto, Machado et al. (2004) verificaram que 5 μ M de GA_3 adicionado em sistema dupla-fase de 'Marubakaido' provocou redução na altura das brotações. Outros experimentos precisariam ser realizados a fim de verificar os fatores responsáveis por esse incremento no comprimento de brotações cultivados em SIT.

Quanto ao número de gemas formadas, verificou-se que os meios MS e MS $\frac{3}{4}$ em SIT foram os responsáveis pelos menores números observados neste experimento (4,71 e 5,25 gemas por brotação, respectivamente). Todos os demais tratamentos tanto para meio quanto para sistema de propagação não diferiram significativamente entre si, apresentando média de 7,55 gemas

por brotação (Figura 8). O meio Himedia em SIT apresentou o maior número de gemas, com média de 8,55 por brotação.

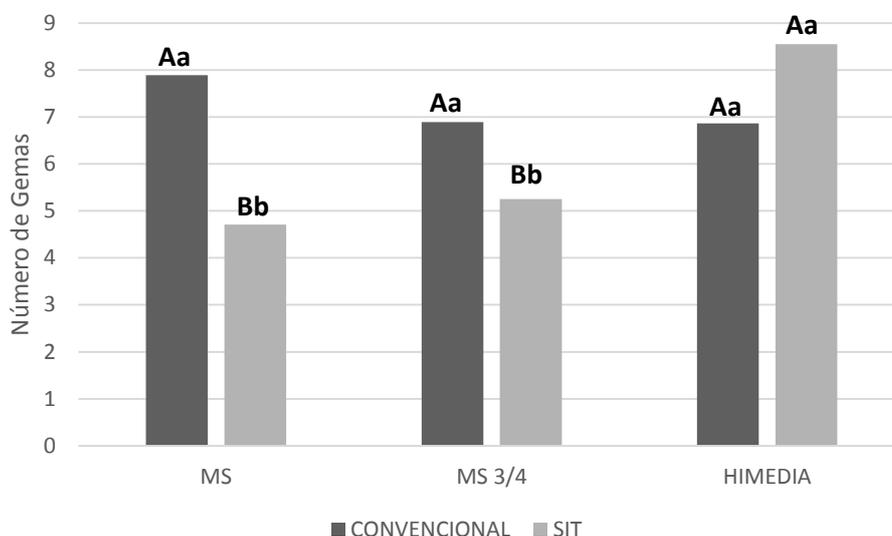


Figura 8. Número médio de gemas obtidas a partir de micropropagação de estacas axilares de 'Marubakaido' em sistema convencional ou em microbiorreatores em sistema de imersão temporária (SIT) em diferentes formulações de meio. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para meio e minúscula para sistema não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Um aspecto importante a destacar entre os sistemas empregados neste estudo diz respeito ao tamanho ou área foliar. As folhas obtidas no tratamento com meio Himedia em SIT se mostraram mais expandidas e desenvolvidas do que as observadas nos tratamentos para sistema convencional (Figura 9). Isso pode ser devido ao fato de que as folhas fazem contato direto com nutrientes da solução do meio durante a imersão, possibilitando a absorção destes minerais por outros órgãos que não a base caulinar. Aragón et al. (2014) perceberam incremento na eficiência do uso da água, na taxa de transpiração e eficiência fotossintética em folhas de banana-da-terra cultivadas em imersão temporária quando em comparação com cultivo convencional.

Plantas micropropagadas podem apresentar anomalias morfo-fisiológicas, como estômatos não funcionais, redução da camada de células paliádicas, alteração na composição de cutícula e parede celular e aparato fotossintético deficiente (HAZARIKA, 2006). Os estômatos *in vitro* não são funcionais, permanecem constantemente abertos ou fechados e são insensíveis aos estímulos habituais de escuro, alta concentração de CO₂ e ABA (ABREU et al., 2003). Isso ocorre em função das condições encontradas

em ambiente *in vitro*, como baixa intensidade luminosa e alta umidade relativa, o que resulta em fotossíntese inexistente ou insuficiente, motivo pelo qual os explantes dependem de uma fonte de carboidrato no meio de cultura (PATHAK et al., 2012). Folhas mais desenvolvidas podem ser relevantes na fase de aclimatização, posto que seu maior desenvolvimento fisiológico aumenta a taxa de sucesso na adaptação *ex vitro* por estarem mais competentes para a realização de fotossíntese e menor perda de água por transpiração, devido ao estado funcional dos estômatos (ARAGÓN et al., 2014).



Figura 9. Folhas destacadas de 'Marubakaido' obtidas a partir de micropropagação em meio Himedia em sistema convencional (esquerda) e SIT (direita).

Experimento 2.

O enraizamento de microestacas é considerado um dos estágios mais críticos do processo de micropropagação de plantas perenes, pois interfere diretamente nas taxas de aclimatização, que é um dos entraves na aplicação da técnica a nível comercial (POMPELLI et al., 2006). Para a maioria das espécies, auxinas exógenas são adicionadas ao meio de cultura na fase de indução das raízes, cujos efeitos em processos de expansão, alongamento e divisão celular, causam reflexos no enraizamento (ABREU et al., 2003).

Em função das condições em que os materiais obtidos na micropropagação em SIT com meios MS e MS $\frac{3}{4}$ (alto percentual de hiperidricidade e calosidade excessiva), optou-se por conduzir o enraizamento apenas com brotações não hiperídricas obtidas de Himedia. De acordo com os resultados obtidos, entre explantes destacados houve 74,1% de enraizamento,

com média de 3,5 raízes formadas por explante, sendo que em 36% destes casos houve formação de raízes secundárias e em nenhum caso houve formação de calos (Figura 10). Esta resposta é de grande valia pois um maior número de raízes resulta em aumento da área de contato entre a raiz e o substrato, refletindo em maior absorção de água e nutrientes (VILLA et al., 2008), além de servir como maior reserva de nutrientes até que novas raízes sejam formadas na fase de aclimação (POMPELLI et al., 2006).



Figura 10. Enraizamento *in vitro* de brotações destacadas de 'Marubakaido' em SIT.

O sistema radicular formado *in vitro* geralmente consiste somente em raízes principais finas, frágeis e facilmente quebráveis durante a retirada do ágar e plantio no substrato (BORKOWSKA, 2001). George (1993) ressaltou que as raízes produzidas *in vitro* a partir de calos não são funcionais quando transferidas para a fase de aclimatização pois não são dotadas de pelos radiculares e conexão vascular, além de não desenvolverem câmbio secundário, mas são necessárias para a absorção de nutrientes e como reservas durante a produção de um sistema radicular funcional durante a aclimatização (ABREU et al., 2003). Considerando que as raízes obtidas neste trabalho foram formadas diretamente a partir da base das brotações e não a partir de calos, estudos anatômicos precisam ser feitos a fim de verificar sua funcionalidade e persistência *ex vitro*.

Em relação à utilização de tufo de brotações não separadas, ocorreu a formação de raízes em 62,5% do material analisados, sendo que no material não enraizado não houve formação de calos. Essas raízes eram em pequeno

número e menor tamanho, de forma que no momento da separação das brotações apenas 24,37% delas permaneceram com raízes visíveis (Figura 11). Abreu et al. (2003) cita que as condições junto à base das microestacas podem interferir na evolução do processo de rizogênese induzido por auxinas. Neste sentido, o enraizamento em brotações não destacadas pode ter sido prejudicado devido à pequena área de contato da base das brotações com o meio de cultura, que pode interferir na absorção de nutrientes e reguladores de crescimento presentes no meio.



Figura 11. Enraizamento *in vitro* de brotações não-destacadas de 'Marubakaido' em SIT.

No entanto, considerando que uma das razões para a utilização de SIT seja justamente o menor gasto com mão-de-obra e redução no manuseio dos explantes, o considerável percentual de enraizamento em brotações não separadas ainda torna preferível esta prática. Sugere-se, no entanto, realizar novos estudos considerando aumento na concentração de AIB na tentativa de aumentar seu efeito sobre os tufos.

Outra possibilidade seria a troca de meio de cultura durante o período de enraizamento, que poderia provocar mudanças significativas no número de raízes, já que o pouco contato dos nutrientes com a base dos explantes aliado à degradação dos componentes hormonais da solução nutritiva podem ter reduzido seu efeito sobre a rizogênese de brotações em tufos. Outra variável que poderia ser testada é a exposição ao escuro durante a fase de enraizamento, pois a luz em geral tem efeito negativo sobre a iniciação

radicular (RADMANN et al., 2002), possivelmente pela oxidação de auxina endógena (AIA). Zanol et al. (1998) já observaram efeito positivo da exposição ao escuro durante seis dias na fase de enraizamento *in vitro* de brotações de 'Marubakaido' quando o meio semissólido foi suplementado com $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB, de forma que uma alteração na incidência ou intensidade de luz também pode produzir efeito em SIT.

Após 21 dias de aclimatização, 88,5% dos explantes que foram aclimatizados com raiz sobreviveram (Figura 12), apresentando grande número de raízes secundárias que serviram de sustentação para plantas com características de vigor e robustez. Neste sentido, as raízes produzidas *in vitro* em SIT parecem ter dado condições de sobrevivência e adaptação em ambiente *ex vitro*.



Figura 12. Desenvolvimento de plantas de 'Marubakaido' micropropagadas com formação de raízes *in vitro* após 21 dias de aclimatização.

5. Conclusões

- SIT apresentou maior rendimento quanto ao número médio e comprimento de brotações em explantes sadios quando comparado ao sistema convencional;
- Brotações produzidas em SIT com todos os meios empregados apresentam hiperidricidade, principalmente quando utilizados MS e MS ¾;
- Utilização do meio comercial Himedia em SIT induz maior homogeneidade, taxa de multiplicação e comprimento das brotações;
- Brotações enraizadas em SIT apresentam elevado percentual de sobrevivência na fase de aclimatização.
- Novos estudos ainda precisam ser realizados na adequação do protocolo de micropropagação em SIT para 'Marubakaido', visando diminuir o percentual de hiperidricidade observado em todos os tratamentos.

6. Referências

- ABREU, Monita F.; PEDROTTI, Enio L. *Micropropagação de macieira*. **Revista biotecnologia ciência & desenvolvimento**. n. 31, p. 100-108 Jul./Dez. 2003.
- ALVARD, D.; COTE, F.; TEISSON, C. *Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation - Effects of temporary immersion of explants*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. N. 32, p. 55-60, 1993.
- Analytical Software. Statistix 9. User's Manual Analytical Software. Florida State University Tallahassee, Florida, USA, 2009.
- ARAGON, C. E. ; SANCHEZ, C. ; GONZALEZ-OLMEDO, J.; ESCALONA, M.; CARVALHO, L.; AMÂNCIO, S. *Comparison of plantain plantlets propagated in temporary immersion bioreactors and gelled medium during in vitro growth and acclimatization*. **Biologia Plantarum**. Vol. 58, V. 1, p. 29-38, 2014.
- ARAGON, C. E. ; SANCHEZ, C. ; GONZALEZ-OLMEDO, J.; ESCALONA, M.; CARVALHO, L.; AMÂNCIO, S. *Comparison of plantain plantlets propagated in temporary immersion bioreactors and gelled medium during in vitro growth and acclimatization*. **Biologia Plantarum**. Vol. 58, V. 1, p. 29-38, 2014.
- ARAGÓN, C.; ESCALONA, M.; CAPOTE, I.; PINA, D.; CEJAS, I.; RODRÍGUEZ, R.; CAÑAL, M.; SANDOVAL, J.; ROELS, S.; DEBERGH P.; GONZÁLEZ-OLMEDO, J. *Photosynthesis and carbon metabolism in plantain (Musa AAB) growing in temporary immersion bioreactor (TIB) and ex vitro acclimatization*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. V. 41, p. 550-554, 2005.
- ARAGÓN, Carlos E.; ESCALONA, Marilza ; RODRIGUEZ, Roberto ; CAÑAL, Maria Jesús.; CAPOTE, Iris; PINA, Danilo; GONZALEZ-OLMEDO, Justo. *Effect*

*of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. **Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant.** 2009*

BHATTI, Shammi; JHA, Gopuljee. *Current trends and future prospects of biotechnological interventions through tissue culture in apple. **Plant Cell.** Vol 29, p. 1215-1225, 2010.*

BLEICHER, J. *A cultura da macieira.* In: EPAGRI. **A cultura da macieira.** Florianópolis, SC, 2002. p. 29-36.

BLEICHER, J. *História da macieira.* In: EPAGRI. **A cultura da macieira.** Florianópolis-SC: EPAGRI, 2006. p.29-36.

BOLAR, Jyothi P.; NORELLI, John L.; ALDWINCKLE, Herb S.; HANKE, Viola. *An efficient method of rooting and acclimation of micropropagated apple cultivars. **HortScience.** Vol 33, Ano 7, p. 1251-1252, 1998.*

BORKOWSKA, B. *Morphological and physiological characteristics of micropropagated strawberry plants rooted in vitro or ex vitro. **Scientia Horticulturae.** Skierniewice, v.89, p.195-206, 2001.*

CARDOSO, Carina. YAMAMOTO, Lilian Y.; PRETI, Edilene A.; ASSIS, Adriane M.; NEVES, Carmen S. V. J.; ROBERTO, Sergio R. *AIB e substratos no enraizamento de estacas de pessegueiro 'Okinawa' coletadas no outono. **Semina: Ciências agrárias.** Londrina: v, 32, n. 4, p. 1307-1314, Out./Dez. 2011.*

CENTELLAS, Alberto Q.; FORTES, Gerson R. de L.; MÜLLER, Nilvane T. G.; CARMENZANOL; Geni; FLORES, Rejane; GOTTINARI, Rosete A. *Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento in vitro da macieira. **Pesquisa agropecuária brasileira.** Brasília, v. 34, n. 2, p. 181-186, Fev. 1999.*

CHAKRABARTY D.; HAHN E.J.; YOON Y.S.; PAEK K.Y.; *Micropropagation of apple root stock 'M9 EM LA' using bioreactor. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology.** V. 78, p. 605–609, 2003.*

CHAKRABARTY, D.; DEWIR, Y. H.; HAHN, E. J.; DATTA, S. K.; PAEK, K. Y.; *The dynamics of nutrient utilization and growth of apple root stock 'M9 EMLA' in temporary versus continuous immersion bioreactors. **Plant Growth Regulation.** Vol. 51, p.11-19, 2007.*

CHAKRABARTY, D.; PARK, S. Y.; ALI, M. B.; SHIN, K. S.; PAEK, K. Y. *Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. **Tree Physiology.** Vol 26, p. 377-388, 2005.*

CHU. I. "Economic analysis of automated micropropagation" In: AITKEN–CHRISTIE J.; KOZAI T.; SMITH, MAL. (org.). *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture.* Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. p. 19-27, 1995.

DASTJERD, Ziba H.; JABBARZADEH, Zohreh.; MARANDI, Rasul J.; *Interaction Effects of Chitosan, Benzyladenine, and Gibberellic Acid on in Vitro Proliferation of M26 Apple Rootstock. **Horticulture, Environment, and Biotechnology.** Vol. 54, n. 6, p. 538-547, 2013.*

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-SC: EPAGRI. p.169-227, 2002.

DOBRÁNSKI, Judit; SILVA, Jaime A. T. *Micropropagation of apple - A review*. **Biotechnology Advances**. Vol. 28, p. 452-488, 2010

ERIG, Alan C.; SCHUCH, Márcia W. *Multiplicação in vitro do porta-enxerto de macieira CV. Marubakaido: Efeito da orientação do explante no meio de cultura*. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 293-295, agosto 2002.

ETIENNE, H.; BERTHOULY, M.; *Temporary immersion systems in plant micropropagation*. **Plant Cell, Tissue and organ culture**. V. 69, 215-231, 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATION. FAOSTAT. Disponível em: < <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>>. Acesso em: 15 de Janeiro de 2015

FRANCOISE-MARGA, Laurence; MORVAN, Henri. *Agar fractions could protect apple shoots cultured in liquid media against hyperhydricity*. **Plant Cell, Tissue and Organ culture**. Vol. 49, p. 1-5, 1997.

GEORGE E.F.; "Micrografting". In: GEORGE E.F. (org.). *Plant propagation by tissue culture. Part 1*. Edington, Wilts., UK: Exegetics Ltd., p. 64-66 1993.

GEORGE E.F.; DEBERGH P.C.; "Micropropagation: uses and methods" In: GEORGE E.F.; HALL M.A.; De KLERK G.J. (org.). *Plant propagation by tissue culture*. Dordrecht, Netherlands: Springer. 3. ed. p. 29-64, 2008.

GEORGIEV, Vasil; SCHUAMNN, Anika; PAVLOV, Atanas; BLEY, Thomas. *Temporary immersion systems in plant biotechnology*. **Engineering in life sciences**. V. 14, p. 607-621, 2014.

GIACOBBO, Clevison L; GOMES, Fernando R. C.; KROTH, Leandro; CONCEIÇÃO, Melissa K.; FORTES, Gerson R. L. *Multiplicação in vitro de porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido (Malus prunifolia willd, borkh) com diferentes níveis de Benzilaminopurina e ácido naftalenacético*. **Revista Brasileira Agrociência**. V. 9, n. 1, p. 31-33, Jan./Mar. 2003.

HARRIS, S. A.; ROBINSON, J. P.; JUNIPER, B. E., *Genetic clues to the origin of the apple*. **Trends of genetics**, v. 18, n. 8, p. 426-430, 2002.

HAZARIKA, B. N. *Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants*. **Scientia horticultrae**. V. 108, p. 105-120, 2006.

HOFFMANN, Alexandre; PASQUAL, Moacir; CHALFUN, Nilton N. J.; VIEIRA, Silvia S. N. *Efeito substratos na aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto de macieira 'marubakaido'*. **Ciências Agrotecnicas**. Lavras, v. 25, n.2, p. 462-466, mar/abr. 2001a.

HOFFMANN, Alexandre; PASQUAL, Moacir; CHALFUN, Nilton N. J.; VIEIRA, Silvia S. N. *Substratos na indução e desenvolvimento in vitro de raízes em dois porta-enxertos de macieira*. **Pesquisa agropecuária brasileira**. Brasília, v. 36, n. 11, p. 1371-1379, nov. 2001b.

HOKANSON, S. C.; LAMBOY, W. F.; SZEWC-McFADDEN, A.K.; McFERSON, J. R. *Microsatelite (SSR) variation in a collection of Malus (apple) species and hybrids*. **Euphytica**. V. 118, p. 281-294, 2001.

JUNIPER, B.E., WALKINS. R., HARRIS, S. A. *The origin of the apple*. **Acta Horticulturae**, v. 484, 1998.

KERESA, Snjezana; MICHIVOLOVIC BOSNJAK, Anita; BARIC, Marijana; HABUS JERCIC, Ivanka; SARCEVIC, Hrvoje; BSKO, Ante. *Efficient Axillary Shoot Proliferation and in Vitro Rooting of Apple cv. 'Topaz'*. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici**. V. 40, n.1, p. 113-118, 2012.

MACHADO, Marília P; CARVALHO, Dayse C.; BIASI, Luiz A. *Multiplicação in vitro do porta-enxerto de macieira 'marubakaido' em diferentes meios de cultivos e concentrações de ácido giberélico*. **Scientia Agraria**. Paraná, V. 5, n. 1-2, p. 69-72, 2004.

MACIEL, Scheila da C.; VORTOLINI, José A.; PEDROTTI, Enio L. *Enraizamento ex vitro e aclimatização do porta-enxerto de macieira marubakaido micropropagado*. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 289-292, agosto 2002.

MARCON FILHO, J. L. et al. *Aspectos produtivos e vegetativos de macieiras cv. Imperial Gala interenxertadas em M-9*. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal – SP, v. 31, n. 3, p. 784-791, set. 2009.

MEHTA, Mohina; RAM, Rajam; BHATTACHARYA, Amita. *A simple and cost effective liquid culture system for the micropropagation commercially important apple rootstocks*. **Indian journal of experimental biology**. Vol. 52, p. 748-754, Jul. 2014.

MOREIRA, André L.; SILVA, Adriano B.; SANTOS, Aline; REIS, Caroline O.; LANDGRAF, Paulo R. C.; *Crescimento de Cattleya walkeriana em diferentes sistemas de micropropagação*. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 43, n. 10, p. 1084-1810, Out. 2013.

MUNIZ, Aleksander W.; SÁ, Enilson L.; DALAGNOL, Gilberto L.; AMÉRICO Filho, João.; *Rooting and acclimatization of micropropagated marubakaido apple rootstock using Adesmia latifolia rhizobia*. **SpringerPlus**. V. 2, p. 437-441, 2013.

MURASHIGE T.; SKOOG F.; *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. **Acta Physiologiae Plantarum**. V. 15, p. 473-497, 1962.

NAIJA, Sélima; ELLOUMI, JBIR, Najoua; AMMAR, Saida; KEVERS, Claire; *Anatomical and biochemical changes during adventitious rooting of apple rootstocks MM 106 cultured in vitro*. **Comptes rendus Biologies**. Vol. 331, p. 518-525, 2008.

- NORDSTRÖM, Anders; TARKOWSKI, Petr; TARKOWSKA, Danuse; NORBAEK, Rikke; ASTOT, Crister; DOLEZAL, Karel; SANDBERG, Göran. *Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in Arabidopsis thaliana: A factor of potential importance for auxin–cytokinin-regulated development. Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 101, n. 21, p. 8039-8044, Mai. 2004
- PATHAK, H.; DHAWAN, V. *Influence of different carbohydrate sources on In vitro Shoot proliferation of Apple (Malus x domestica Borkh.) Rootstocks M 7 and MM 111. Acta Horticulturae*. Vol. 961, p. 311-318, 2012.
- PAWLICKI, Nathalie; WELANDER, Margareta. *Influence of carbohydrate source, auxin concentration and time of exposure on adventitious rooting of the apple rootstock Jork 9. Plant Science*. Vol. 106, p.167-176, 1995.
- 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.
- PEREIRA-NETO, Adauto; PETKOWICZ, Carmem L. O.; CRUZ-SILVA, Claudia T. A.; GAZZONI, Mariana T.; MELLO, Arianne F. P.; SILVEIRA, Joana L. M. *Differential performance of marubakaido apple rootstock shoots grown in culture media containing different agar brands: dynamic rheological analysis. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. Vol. 43, p. 356-363, 2007.
- PETRI, J. L.; LEITE, G. B. *Macieira. Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal-SP, v. 30, n. 4, p. 857-1166, 2008.
- POMPELLI, Marcelo F.; GUERRA, Miguel P. *Enraizamento in vitro e ex vitro de Dyckia distachya Hassler, sob diferentes concentrações de AIB. Floresta & ambiente*. V.12, n. 2, p.42-49, nov;/dez. 2006.
- RANDMANN, Elizete B.; FACHINELLO, José C.; PETERS, José A.; *Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento in vitro de porta-enxertos de macieira 'M-9'. Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal, v. 24, n. 3., p. 624-628, Dez. 2002.
- SHULAEV, V.; KORBAN, S. S.; SOSINKI, Bryon; ABBOTT, A. G.; ALDWINCKLE, H. S.; FOLTA, K. M.; MAIN, Amy lezzoni; MAIN, Dorrie; ARÚS, Pere; DANDEKAR, Abhaya M.; LEWERS, Kim; BROWN, Susan K.; DAVIS, Thomas M.; GARDINER, Susan E.; POTTER, Daniel; VEILLEUX, Richard E. *Multiple models for Rosaceae Genomics. Plant physiology*. V. 147, p. 985-1003, Jul. 2008.
- SILVA, Ilda M. de C. *Cultivo in vitro de Pyrus sp., cultivares Carrick, Cascatense e Ya-Li*. Tese (Doutoramento de Fisiologia Vegetal) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.
- SILVEIRA, J. P. G. et al. *A Inibição na síntese de giberelina reduz o crescimento vegetativo em macieiras e proporciona controle de “bitter pit” nos frutos. Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal – SP, v. 34, n. 2, p. 328-335, 2012.

SINGHA, Suman; OBERLY, Gene H.; TOWNSEND, Edwin C. *Changes in nutrient composition and pH of the culture medium during in vitro shoot proliferation of crabapple and pear*. **Plant Cell, Tissue and organ culture**. N. 11, p. 209-220, 1987.

STOLF, Elaine C.; DANTAS, Adriana C. de M.; BONETTI, José I.; COMIN, Jucinei J.; NODARI, Rubens O. *Estabelecimento de critérios para selecionar porta-enxertos de macieira tolerantes ao alumínio em solução nutritiva*. **Revista Brasileira de Fruticultura**. V. 30, n. 2, p. 476-481, Jun. 2008.

UCGUCHI-TANAKA, Miyako ; NAKAJIMA, Masatoshi ; MOTOYUKI, Ashikari ; MATSUOKA, Makoto. *Gibberellin receptor and its role in Gibberellin signaling in plants*. **Annual Review Plant Biology**. V. 58, p. 183-198, 2007.

VIEIRA, Luiz M; GOULART Jr., Rogério. *Boletim da maçã*. **Epagri**. n. 1, 28 de novembro de 2014. Disponível em: <docweb.epagri.sc.gov.br/website_cepa/Boletim_agropecuario/boletim_maca_n1.pdf>. Acesso em: 17 de Janeiro de 2015.

VIEIRA, R. L.; LEITE, G. B.; WAMSER, A. F. *Efeito de substratos porosos no enraizamento in vitro do portaenxerto de macieira m-9 (Malus pumilla)*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.29, n.1, p.128-132, 2007.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; FRAGUAS, C. B.; REZENDE, J. C. de. *Enraizamento in vitro do porta-enxerto de videira "VR043-43": efeito do ANA e NaCl*. **Agrarian**, v.1, n.2, p.103-111, 2008.

WATT, M. Paula. *The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation*. **African Journal of Biotechnology**. V. 11, n. 76, p. 14025-14035, 20 Set. 2012.

YAMAGUCHI, Shinjiro. *Gibberellin metabolism and its regulation*. **Annual Review Plant Biology**. Vol. 59, p. 225-251, 2008.

ZANOL, Geni C.; FORTES, Gerson R. L.; SILVA, João B.; FARIA, Janine T. C.; GOTTINARI, Rosete A.; CENTELLAS, Alberto Q. *Uso do ácido indolbutírico e do escuro no enraizamento in vitro do porta-enxerto de macieira 'marubakaido'*. **Ciência rural**. Santa Maria, v. 28, n. 3, p. 387-391, 1998.

ZHU, Li-Hua ; LI, Xue-Yuan ; WELANDER, Margareta. *Optimisation of growing conditions for the apple rootstocks M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle*. **Plant Cell, Tissue and organ culture**. V. 81, p. 313-318, 2005.

Considerações Finais

Embora existam vários estudos sobre micropropagação de porta-enxerto 'Marubakaido' em sistema convencional, ainda não há dados sobre a resposta em SIT, de forma que neste trabalho foram realizados os primeiros estudos visando adequar as condições para a micropropagação por este sistema. Inicialmente foram realizados experimentos em sistema convencional a fim de determinar o melhor tipo de explante (estacas apicais ou axilares) para a propagação *in vitro*. De acordo com os resultados não houve diferença significativa entre os tipos de explantes, de forma que estacas axilares foram escolhidas para os demais estudos.

Nos experimentos em SIT o meio Himedia apresentou as melhores respostas quanto ao percentual de sobrevivência, comprimento médio, número de gemas e de brotações. Esta diferença em relação aos outros meios pode estar relacionada à constituição do meio, já que a formulação segue um padrão industrial, com controle de qualidade e certificação, enquanto a composição MS, manipulada em laboratório, pode envolver diferentes lotes de reagentes, com possíveis erros de manipulação ou armazenamento, acarretando em mudanças nas reações químicas envolvidas. No entanto, devido aos custos de aquisição da composição comercial, novas buscas devem ser conduzidas na perspectiva de aumentar a eficiência e controle de qualidade durante a elaboração de meio no laboratório.

Por outro lado, observou-se percentual relativamente alto de hiperidricidade nas brotações induzidas em todos os tratamentos em SIT quando comparado ao sistema convencional. Esta anomalia fisiológica, determina baixa produção de brotações adequadas a novas multiplicações e ao enraizamento. Assim, novos estudos ainda precisam ser realizados na adequação do protocolo de micropropagação para 'Marubakaido'. Dentre estes podem ser salientados a alteração da composição dos meios de cultura, tanto na parte mineral como hormonal, número de imersões diárias e tempo de contato dos explantes com o meio, temperatura da câmara de crescimento e tipo de luz.

A etapa de enraizamento apresentou resultados altamente promissores nestes testes iniciais, com percentuais de 74,1% para brotações

individualizadas e 62,5% para tufos de brotações. Outro aspecto positivo é que nas condições em que foram realizados os experimentos, não ocorreu a formação de calos nas bases das brotações, ou seja, as raízes formadas eram funcionais, possibilitando altas taxas de aclimatização (88,5% de sobrevivência após 21 dias). Embora brotações destacadas tenham apresentado melhor enraizamento, novos estudos precisam ser realizados na tentativa de melhorar a eficiência do protocolo para enraizamento de tufos obtidos diretamente da fase de multiplicação, através da troca de meio, já que a separação das brotações implica uma etapa de manuseio dos explantes, o que não é desejado quando se trabalha com biorreatores.