

**INFLUÊNCIA DO ÁCIDO INDOLBUTÍRICO,  
FLOROGLUCINOL E LUZ NO ENRAIZAMENTO  
*IN VITRO* DA MACIEIRA cv. FRED HOUGH<sup>1</sup>**

Alberto Quezada Centellas<sup>3</sup>  
Gérson Renan de Lucas Fortes<sup>2</sup>  
João Batista Da Silva<sup>3</sup>  
Geni C. Zanol<sup>3</sup>  
Janine C. Faria<sup>3</sup>

**1. INTRODUÇÃO**

Ao clone Malus 31 foi dado o nome de Fred Hough, em homenagem ao pesquisador americano da Universidade de Nova Jersey, pioneiro na criação de cultivares de macieira com resistência genética à sarna (*Venturia inaequalis*). No Brasil, a sarna ocorre em todos os estados produtores, nas regiões mais altas e frias e a doença tem maior importância (1). Este cultivar, lançado em 1994 pela EPAGRI/Estação Experimental de Caçador, apresenta frutos e produtividade maior que o cv. Gala, requerendo menos frio, é imune à sarna, e a maturação ocorre de três a quatro semanas após o cv. Gala (2).

A divulgação e liberação de um novo cultivar requerem grande quantidade de material propagativo, e, com o emprego das técnicas

<sup>1</sup>Parte da dissertação apresentada pelo primeiro autor à Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Aceito para publicação em 13-05-1998.

<sup>2</sup>EMBRAPA/CPACT, Cx.P. 403, 96001-970 Pelotas, RS. E-mail: gerson@embrapa.cpact.br

<sup>3</sup>UFPel, Cx. P. 354, 96001-970 Pelotas, RS. E-mail: quezadas@ufpel.tche.br

convencionais de propagação, não se atingiria este objetivo em curto tempo. As possibilidades aumentam quando se faz uso da técnica da micropropagação (26).

A formação de plantas completas para posterior aclimatação às condições *ex-vitro* requer o desenvolvimento de raízes adventícias nas partes aéreas obtidas no estágio de multiplicação. Na maioria das espécies lenhosas, o enraizamento é difícil, quando não se usa material juvenil (9). Brotações de ramos maduros precisam sofrer mudanças do balanço hormonal, isto é, diminuir as citocininas e aumentar as auxinas exógenas (21). As citocininas geralmente inibem a formação de raízes (5).

Os tipos e as concentrações de auxinas são as variáveis que, em geral, mais influenciam o enraizamento. As auxinas têm em comum a capacidade de atuar na expansão e no alongamento celular, ajudando, também, na divisão celular na cultura de tecidos (14). O ácido naftaleno acético (ANA) e o ácido indolbutírico (AIB) são os mais conhecidos (19). Muitos autores conseguiram o enraizamento de diferentes cultivares de macieira usando de 1 a 3 mg/l de AIB, não obtendo respostas positivas na ausência deste regulador (11, 15, 17, 24).

Auxinas e citocininas, endógenas e exógenas, são exigidas em proporções adequadas para a formação de brotos e raízes adventícias, as quais variam com as diversas espécies vegetais. O aumento na concentração de auxina favorece a iniciação radicular, enquanto um aumento nos níveis de citocininas induz à multiplicação de brotos (16).

A formação de raízes nas brotações pode ser afetada pelas condições de ambiente, às quais as culturas são submetidas. O período de pré-acondicionamento no escuro confere maior habilidade de enraizamento, pelo fato de a luz ativar a formação do complexo AIA-fenóis, que está diretamente ligado à rizogênese (3, 20).

Os compostos fenólicos, particularmente o floroglucinol, influenciam também esta fase, estimulando o enraizamento e desenvolvimento de brotos na cultura de tecidos de espécies lenhosas. O papel deste composto seria o de auxiliar na manutenção de elevados teores endógenos de AIA, agindo como substrato alternativo para a AIA-oxidase, além de estimular a síntese dessa auxina ou atuar como uma substância sinérgica na iniciação radicular (6). Também reduz a formação de calo, que ocorre com o aumento da concentração de auxina, no enraizamento *in vitro* de algumas variedades de macieira (25).

O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito do AIB associado ao floroglucinol na presença e ausência de luz no enraizamento *in vitro* da macieira (*Malus domestica*, Borkh cv. Fred Hough).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Brotações provenientes do processo de multiplicação *in vitro* da macieira cv. Fred Hough foram inoculadas em meio contendo vitaminas e sais de MS, com a concentração deste último reduzida à metade, ambos acrescidos de 100 mg/l de mio-inositol, 30 g/l de sacarose e 6 g/l de ágar. O pH foi ajustado para 5,9 antes da autoclavagem.

O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso, em fatorial (2x2x5) com dez repetições, sendo cada uma constituída por um frasco (unidade experimental) de 250 ml, com 40 ml do meio, com cinco explantes de 10 mm de comprimento cada uma (unidade de observação). O fator AIB foi testado nos níveis (0 e 3  $\mu$ M); o fator floroglucinol constou de dois níveis (0 e 162 mg/l). Após a inoculação, os explantes permaneceram em diferentes tempos (0, 2, 4, 6 e 8 dias) no escuro e, em seguida, foram transferidos para a sala de crescimento, sob condições de  $25 \pm 2^\circ$  C, 16 horas de fotoperíodo e 2.000 lux de intensidade luminosa. A avaliação foi feita aos 30 dias após a instalação do experimento. As variáveis observadas foram percentagem de enraizamento, número médio de raízes, comprimento médio de raízes e intensidade de formação de calo na base das brotações. Esta última foi avaliada subjetivamente pela aparência visual, atribuindo-se notas de 0 a 3, sendo 0 = ausência; 1 = pouca; 2 = média e 3 = alta intensidade de calejamento.

Os resultados foram submetidos à análise de variância. A comparação entre médias dos tratamentos foi realizada pelos testes de Duncan e de F ( $\alpha = 0,05$ ), os quais estão representadas nas figuras com letras diferentes. Os dados do número de raízes foram transformados em  $\sqrt{x + 1}$ , os de percentagem em arco seno  $\sqrt{\%}$  e os de formação de calo (notas) sofreram transformação logarítmica.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença do AIB foi importante para atingir alta percentagem de enraizamento e maior comprimento de raízes. Na ausência deste regulador houve pouca resposta ao enraizamento (Figuras 1 e 2).

Zimmerman e Broome (25) mostraram que na ausência de AIB ou em concentrações baixas (0,1 mg/l) o enraizamento de muitos cultivares de macieira foi ineficaz. No entanto, com o incremento de AIB, houve melhora do desenvolvimento do sistema radicular. Para JAMES (10), a concentração da auxina exógena também afeta o enraizamento, que é função da espécie e do cultivar, havendo inclusive grande número de espécies no qual o AIB é eficaz na concentração de 5  $\mu$ M.

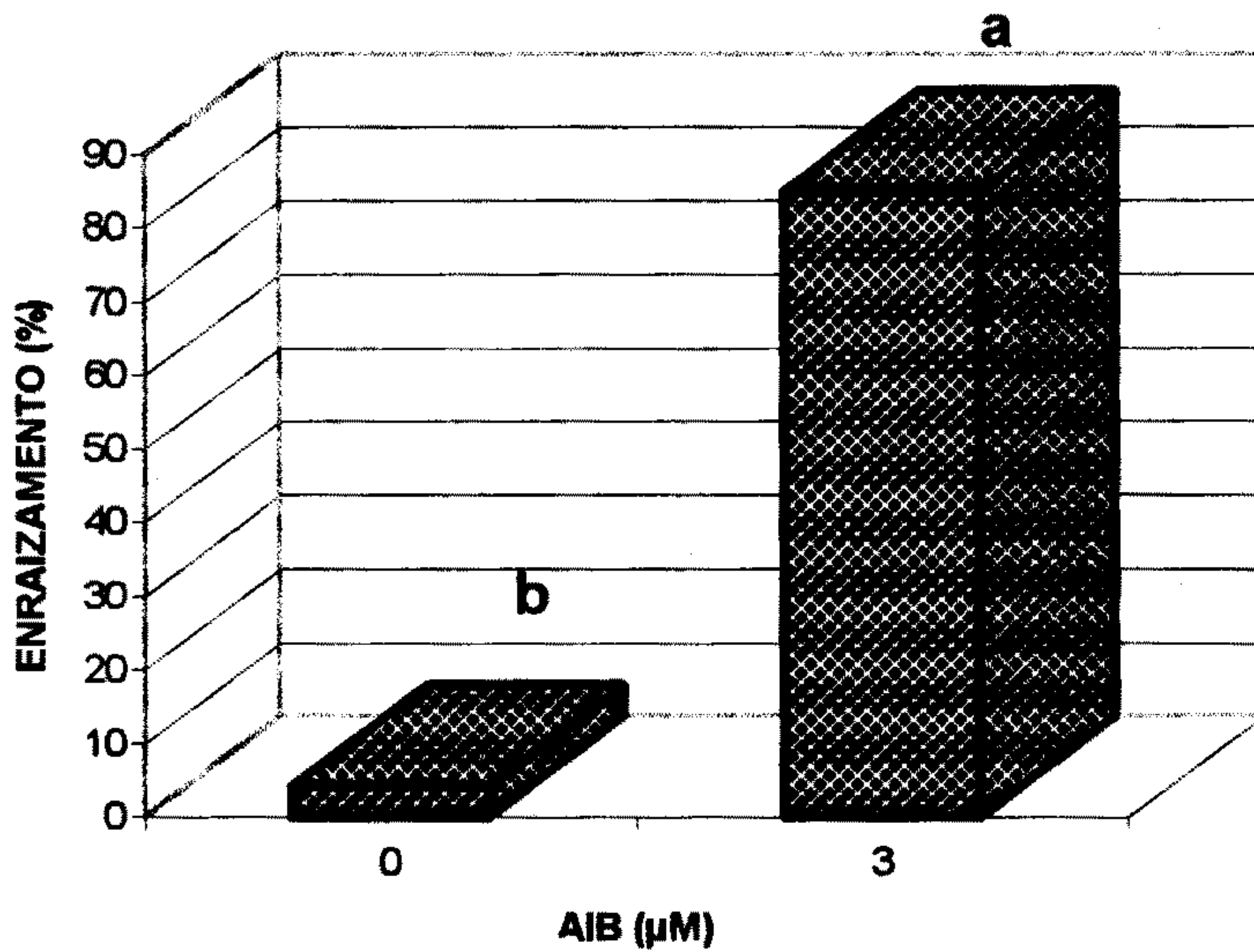


FIGURA 1 - Percentagem média de enraizamento de brotações de macieira cv. Fred Hough cultivadas *in vitro* na presença e ausência de AIB. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de F a 5% de probabilidade.

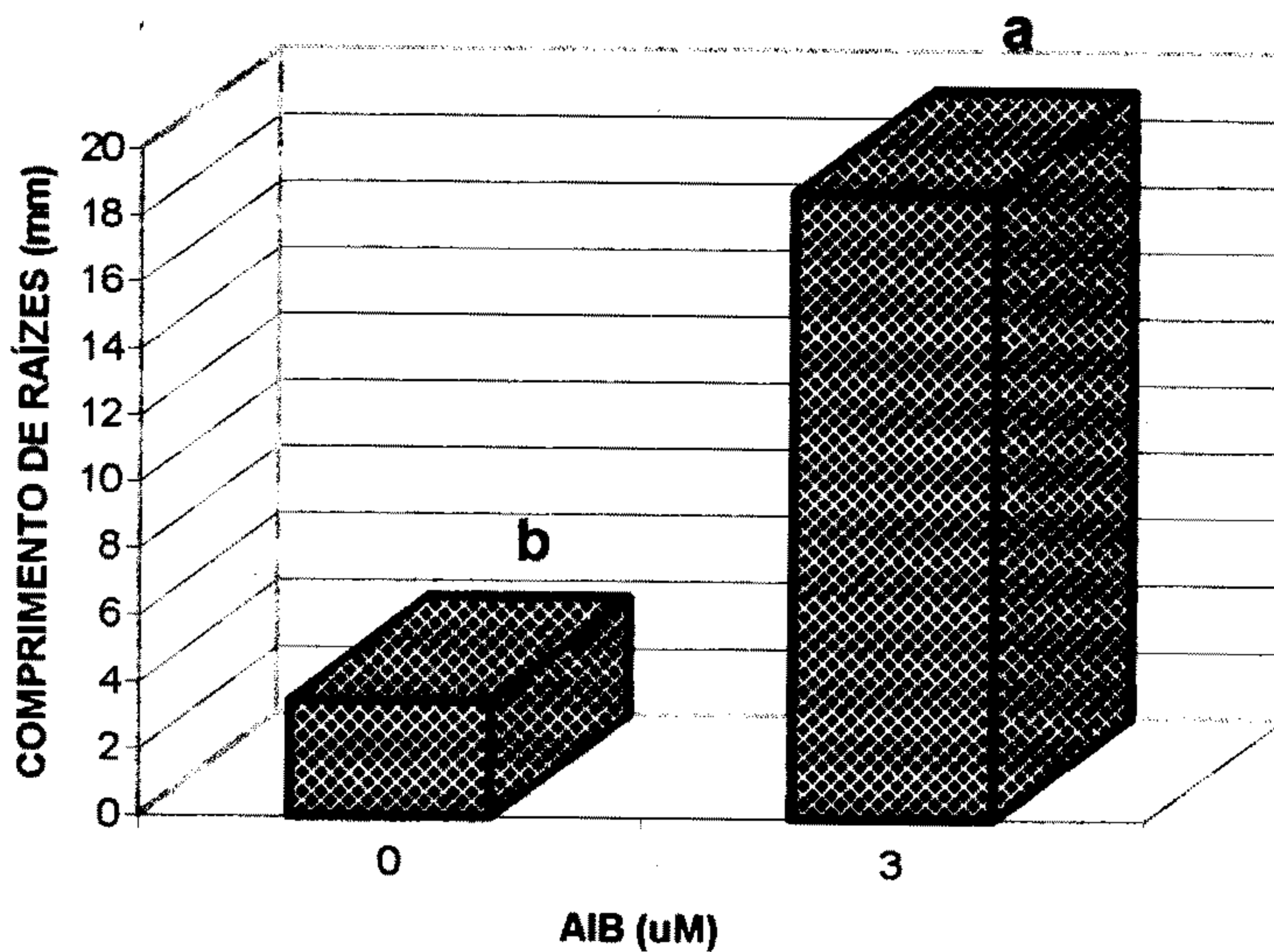


FIGURA 2 - Comprimento médio de raízes em brotações de macieira cv. Fred Hough cultivadas *in vitro* na presença e ausência de AIB. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de F a 5% de probabilidade.

O número de raízes não foi afetado pela adição de floroglucinol, porém, a presença deste polifenol diminuiu a incidência de calo na base das brotações enraizadas (Figuras 3 e 4). O melhor desempenho do floroglucinol em diminuir a intensidade de calo também foi observado por HAMMATT (7), e este produto reduziu sensivelmente a formação de calo em *Prunus avium*. RODRIGUES *et alii* (18) mostraram também que o floroglucinol melhorou o enraizamento do cv. Gala pela diminuição da intensidade de formação de calo.

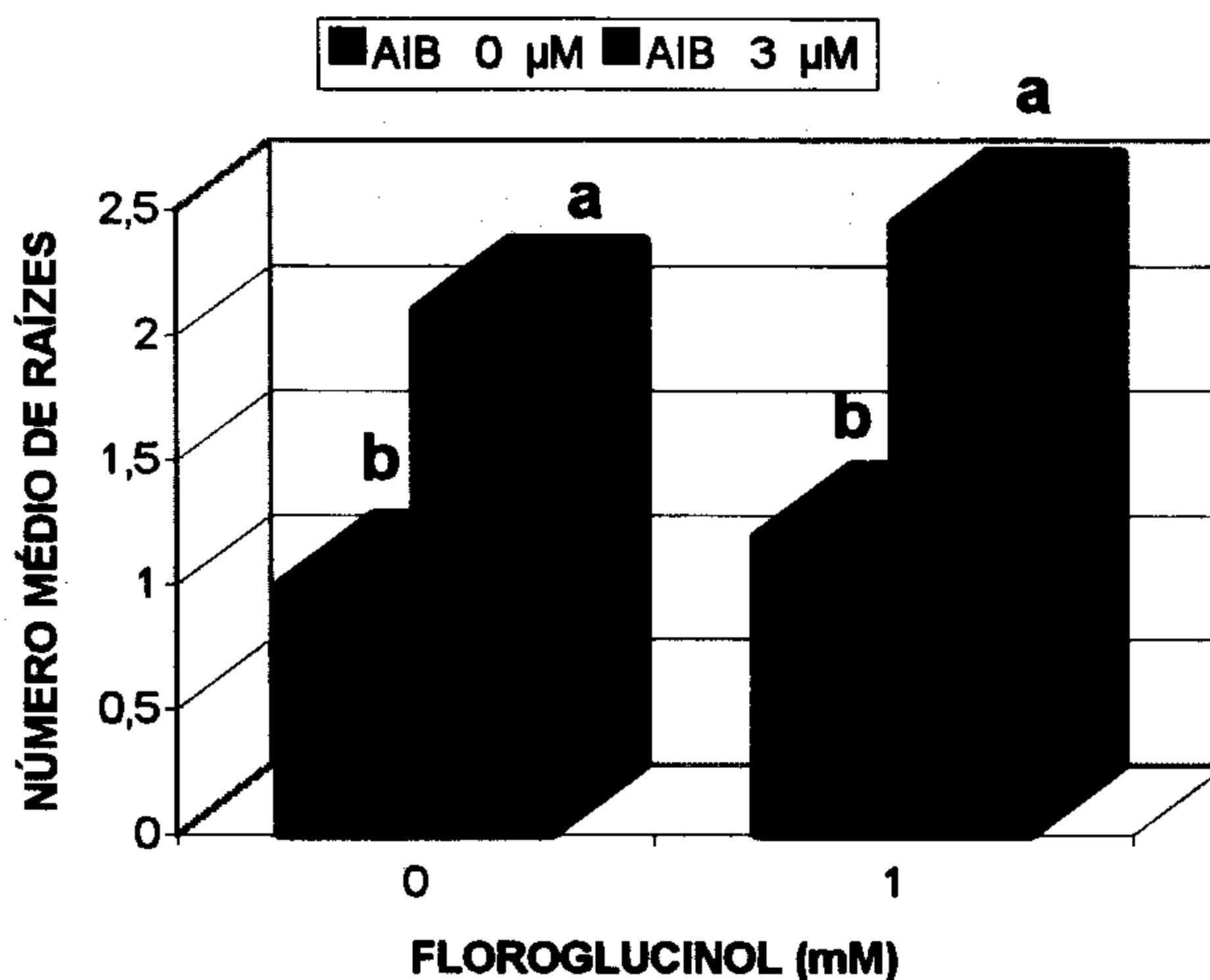
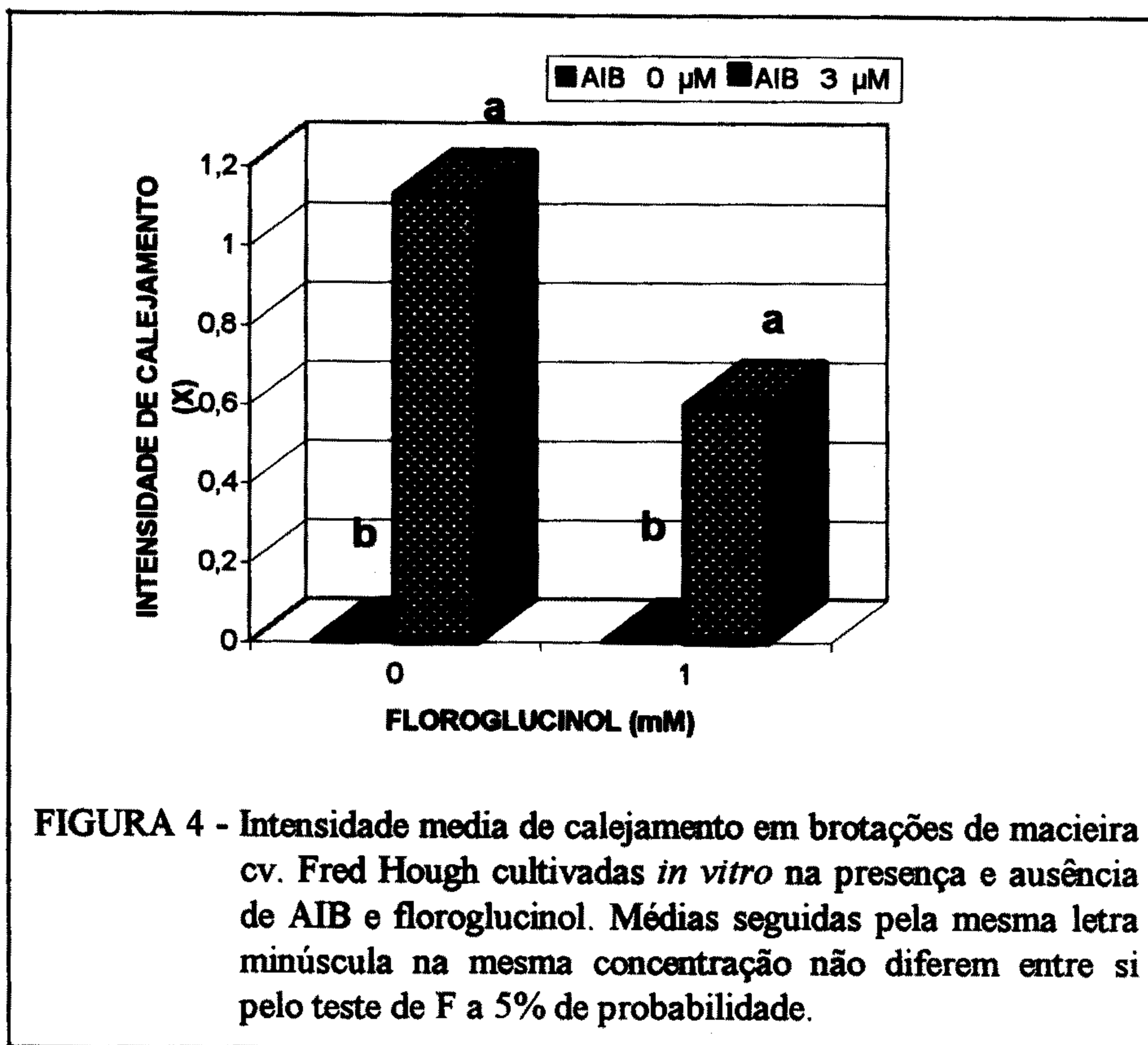


FIGURA 3 - Número médio de raízes em brotações de macieira cv. Fred Hough cultivadas *in vitro* na presença e ausência de AIB e floroglucinol. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma concentração não diferem entre si pelo teste de F a 5% de probabilidade.

Por outro lado, WELÅNDER e HUNTRIESIER (23), trabalhando com o porta-enxerto A2, demonstraram efeitos sinérgicos do AIB com floroglucinol na indução do enraizamento, e indicaram que isto não só dependeria das concentrações destas, mas também eram afetadas pela idade da fonte do material, dos quais os brotos eram originados. Mencionaram, também, que a melhora do enraizamento com o uso de fenóis resultava da inibição deste componente à AIA-oxidase, prevenindo a destruição da auxina.



JONES e HATFIELD (12) já haviam mostrado que o floroglucinol foi ineficiente quando aplicado na ausência de auxinas. JAMES (10) também observou que quando as raízes ficavam em contato prolongado com o floroglucinol, a auxina exógena causava-lhe um efeito inibitório.

A influência da permanência no escuro e o efeito do AIB na intensidade de calo são apresentados na Figura 5. Observa-se que o período de escuro aumentou a formação de calo quando comparado com a presença de luz, não havendo diferença significativa entre os diversos períodos de escuro. FORTES e LEITE (4), testando o cv. Gala em diversos períodos de escuro, também notaram que o número de calo na base das brotações também aumentou com os períodos de escuro.

WELANDER (22), trabalhando com o porta-enxerto M26, indica que houve incremento do enraizamento quando a fase de iniciação dos diversos tratamentos ocorreu no escuro. No entanto, esta situação não foi evidenciada para a melhor concentração de AIB (1 μM).

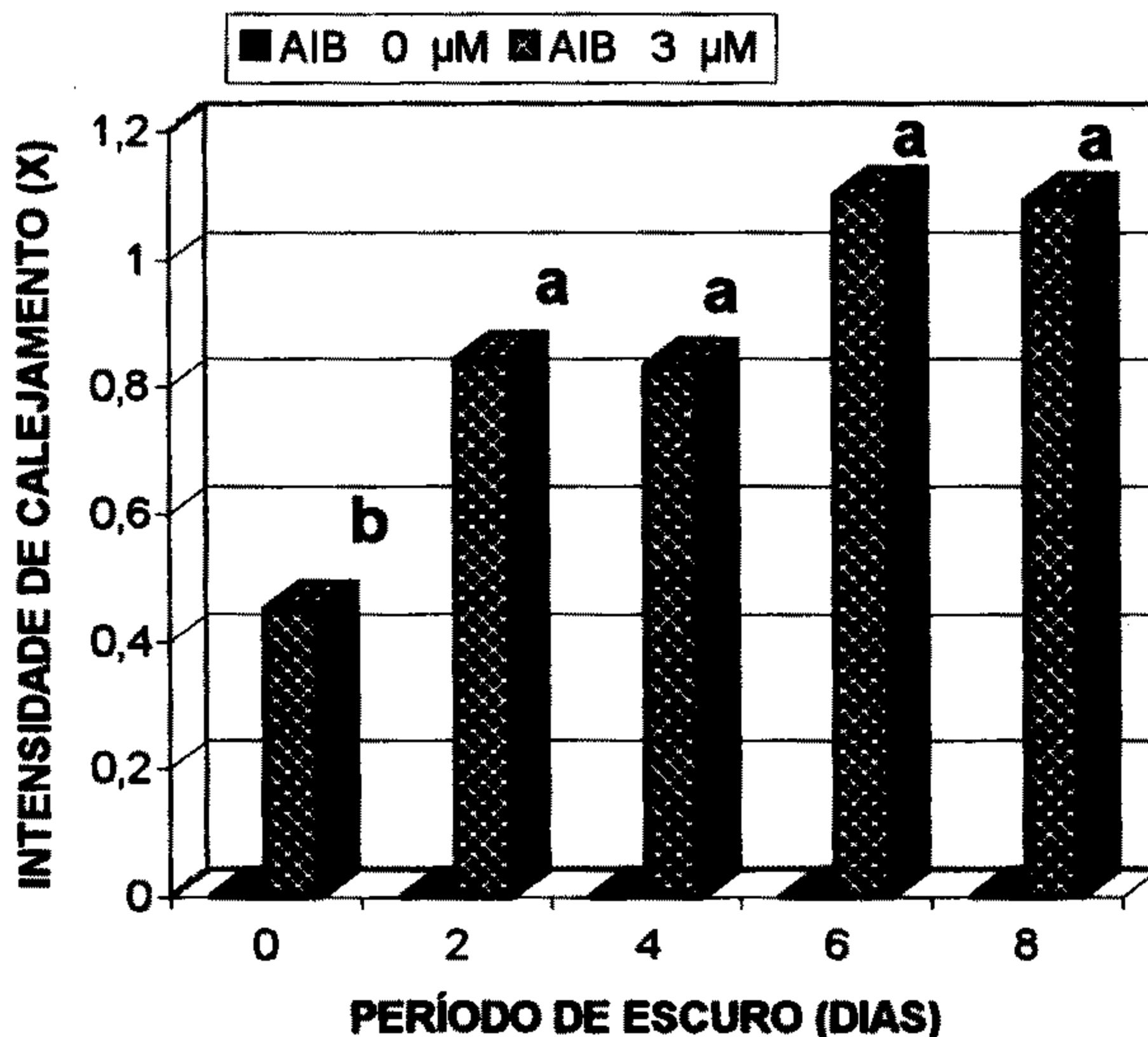


FIGURA 5 - Intensidade média de calejamento em brotações de macieira cv. Fred Hough cultivadas *in vitro* na presença e ausência de AIB, em cinco períodos de escuro. Médias seguidas pela mesma letra minúscula nos diversos períodos de escuro não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Nos trabalhos realizados por KORNOVA e MICHAILOVA (13), na cultura de *Rosa damascena*, explantes colocados 10 dias no escuro, durante o período de enraizamento, não estimularam significativamente o processo de enraizamento.

A luz tem diferentes efeitos no enraizamento, que variam segundo a espécie, parecendo inativar a formação do complexo essencial AIA-fenóis. No entanto, o mecanismo desta inibição não está claro (20). HANSEN (8) menciona que em muitas espécies estudadas os efeitos da luz ocasionaram desde inibição até estimulação na formação de raízes. O benefício do tratamento no escuro é todavia duvidoso e muitos outros trabalhos terão que ser desenvolvidos para que este processo possa ser entendido.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Brotações da macieira (*Malus domestica*, Borkh.) cv. Fred Hough, com aproximadamente 10 mm de comprimento da porção apical, foram cultivadas em meio contendo sais MS/2 e vitaminas de MS, acrescidos de mio-inositol (100 mg/l), sacarose (30 g/l), e ágar (6 g/l). Testaram-se o

ácido indolbutírico (AIB) (0 e 3)  $\mu$ M, o floriglucinol (0 e 1) mM e a permanência das brotações no escuro por (0, 2, 4, 6, 8) dias. O pH do meio foi ajustado para 5,9, sendo os tratamentos repetidos cinco vezes e colocados em sala de incubação à temperatura de  $25 \pm 2^\circ$  C, com intensidade luminosa de 2.000 lux e 16 horas de fotoperíodo. Cada repetição constou de um frasco de 250 ml, com 40 ml do meio e cinco explantes. O AIB afetou significativamente a percentagem, o comprimento e o número de raízes. A presença de floriglucinol no meio de enraizamento diminuiu a formação de calo na base dos explantes, não influenciando, porém, na percentagem de enraizamento, no número de raízes e comprimento destas. A ausência de luz induz maior formação de calo na base das brotações deste cultivar.

## 5. SUMMARY

### (INFLUENCE OF INDOLYL BUTIRIC ACID, PHLOROGLUCINOL AND LIGHT ON THE *IN VITRO* ROOTING OF APPLE cv. FRED HOUGH)

Shoots of the apple tree (*Malus domestica*, Borkh.) cv. Fred Hough, of approximately 10 mm in length from the apical portion, were cultivated in the MS half strength basal medium added to MS vitamins, myo-inositol (100 mg/l), sucrose (30 g/l), agar (6 g/l) in order to evaluate the influence of 3-indolebutiric acid (IBA), phloroglucinol and light on the *in vitro* rooting of apple, cv. Fred Hough. IBA (0 and 3  $\mu$ M), phloroglucinol (0 and 1 mM) and exposure to darkening period were tested (0, 2, 4, 6 and 8 days) prior to placement in growth room at  $25 \pm 2^\circ$  C, 16 hour photoperiod and 2000 lux. Five shoots per treatment were inoculated in a 250 ml flask with 40 ml medium. The IBA had a significant effect on the rooting percentage, length and number of roots. The presence of phloroglucinol in the root media decreased the callus formation although it had no effect on the percentage of rooting and length of roots. The lack of light during the first days of the rooting process induced a higher callus formation on the base of the shoots.

## 6. LITERATURA CITADA

1. BLEICHER, J. Doenças da macieira. In: EMPASC. *Manual da cultura da macieira*. Florianópolis, EPAGRI, 1986. p. 381-391.
2. DENARDI, F. & CAMILO, A.P. Fred Hough, nova cultivar de macieira com imunidade à sarna. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 16: 1-6, 1994.
3. ECONOMOU, A.S. & READ, P.E. Light treatments to improve efficiency of *in vitro* propagation systems. *HortScience*, 22:751-754, 1987.



4. FORTES, G.R. de L. & LEITE, G.L. Enraizamento *in vitro* de brotações adventícias de macieira (*Malus domestica*, Borkh). 1. Pré-condicionamento ao escuro e presença de floriglucinol. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 5:101, 1993.
5. GEORGE, E.F. & SHERRINGTON, P.D. *Plant propagation by tissue culture*. Reading, Eversley, Eastern Press, 1984. 709p.
6. GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. (eds.). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília, ABCTP/Embrapa-CNPq, 1990. p. 99-169.
7. HAMMATT, N. Promotion by phloroglucinol of adventitious root formation in micropropagated shoot of adult wild cherry (*Prunus avium* L.). *Plant Growth Regulation*, 14: 127-132, 1994.
8. HANSEN, J. Stock plant lighting and adventitious root formation. *HortScience*, 22: 746-749, 1987.
9. HU, C.Y. & WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R., AMMIRATO, P.V. & YAMADA, Y. (Eds). *Handbook of plant cell culture*. New York, Macmillan Publishing Co., 1983. v.1, p.177-227.
10. JAMES, D.J. Adventitious root formation *in vitro* in apple rootstocks (*Malus pumila*). I. Factors affecting the length of the auxin-sensitive phase in M.9. *Physiologia Plantarum*, 57: 149-157, 1983.
11. JAMES, D.J. & THURBON, I.J. Rapid *in vitro* rooting of the apple rootstock M.9. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 54: 309-311, 1979.
12. JONES, O.P. & HATFIELD, S.G.S. Root initiation in apple shoot cultured *in vitro* with auxins and phenolics compounds. *HortScience*, 54: 495-499, 1976.
13. KORNOVA, K.M. & MICHAILOVA, J. Study of the *in vitro* rooting of Kazanlak Oil-Bearing Rose (*Rosa damascena* Mill.). *Journal of Essential Oil Research*, 6: 485-492, 1994.
14. KRIKORIAN, A.D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W.M. & MROGINSKY, L.A.(ed.). *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Cali, Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. p.41- 77.
15. LANE, W.D. Regeneration of apple plants from shoot meristem tips. *Plant Science Letters*, 13: 281-285. 1978.
16. MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures . *Annual Review of Plant Physiology*, 25: 135-166. 1974.
17. OCHATT, S.J. & CASO, O.M. In vitro meristem of M4 apple (*Malus pumila* Mill.). I. Optimal nutrient medium. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2: 39-48. 1983.
18. RODRIGUEZ, A.C.; ANGRA, C.D.; DOS SANTOS, R.R.; FORTES, G.R. de L.; SANTOS FILHO, B.G. Influência do ácido indolbutírico e floriglucinol no enraizamento *in vitro* de brotações de macieira (*Malus domestica* Borkh.). *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 5: 101, 1993.
19. ROSS, C.W. Hormones and growth regulators: auxins and gibberellins. In: SALISBURY, F.B. & ROSS, C.W. *Plant Physiology*, 4<sup>th</sup> ed. California, Belmont, Wadsworth, 1992. p. 357- 377.
20. RUGINI, E.; BAZZOFFIA, A. & JACOBINI, A. A simple *in vitro* method to avoid the initial dark period and to increase rooting in fruit trees. *Acta Horticulturae*, 227: 438-440. 1988.
21. VILLALOBOS, V.M. & THORPE, T.A. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. In: ROCA, W.M. & MROGINSKY, L.A.(ed.). *Cultivo de tejidos en la*

*agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Cali, Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. p.127-142.

22. WELANDER, M. *In vitro* rooting of the apple rootstock M-26 in adult and juvenile growth phases and acclimatization of the plantlets. *Physiologia Plantarum*, 58: 231-238, 1983.
23. WELANDER, M. & HUNTRIESIER, I. The rooting ability of shoots raised *in vitro* from apple rootstock A2 in juvenile and adult phase. *Physiologia Plantarum*, 53: 301-306, 1981.
24. WERNER, M.E. & BOE, A.A. *In vitro* propagation of Malling 7 apple rootstock. *HortScience*, 15: 509-510, 1980.
25. ZIMMERMAN, R.H. & BROOME, O.C. Phloroglucinol and *in vitro* rooting of the apple cultivar cuttings. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 106: 648-652, 1981.
26. ZIMMERMAN, R.H. Cultivo de tejidos. In: MOORE, N.J. & JANICK, J. (eds.). *Métodos genotécnicos en frutales*. Mexico, AGT, 1988. p.167-182.