

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

**PROPAGAÇÃO *in vitro* DE PORTA-ENXERTOS DE *Prunus*: cultura de embriões, estabelecimento, multiplicação, enraizamento e aclimatização**

MARCELO ROGALSKI

FLORIANÓPOLIS – SC

2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

**PROPAGAÇÃO *in vitro* DE PORTA-ENXERTOS DE *Prunus*: cultura de embriões, estabelecimento, multiplicação, enraizamento e aclimatização**

MARCELO ROGALSKI

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina.

**Orientação:** Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva

**Co-orientação:** Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra

FLORIANÓPOLIS – SC

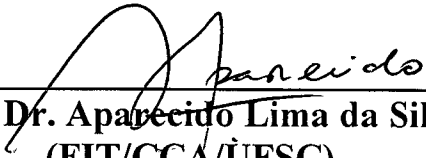
2002

**PROPAGAÇÃO *in vitro* DO PORTA-ENXERTOS DE *Prunus*: CULTURA  
DE EMBRIÕES, ESTABELECIMENTO, MULTIPLICAÇÃO,  
ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO**

**MARCELO ROGALSKI**

**Dissertação julgada e aprovada em sua  
forma final, pelo Orientador e membros  
da Comissão Examinadora.**

**Comissão Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva  
(FIT/CCA/UFSC)**

  
\_\_\_\_\_  
**Pesq. Dr. Jean Pierre Henri Joseph Ducroquet  
(EPAGRI/SC)**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra  
(FIT/CCA/UFSC)**

  
\_\_\_\_\_  
**Pesq. Dr. Marco Antonio Dalbó  
(EPAGRI/SC)**

## AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais, exemplos de dedicação e trabalho, pelo apoio não só nesta etapa, mas no decorrer de toda a minha vida. À minha irmã Juliana, pela grande amizade, paciência, excelente convívio e apoio neste período.

Ao Prof. e Orientador Dr. Aparecido Lima da Silva pela amizade, confiança, dedicação, paciência, simplicidade e pelos conhecimentos transmitidos durante todas as etapas deste Curso.

Ao Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra pela co-orientação e conhecimentos transmitidos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em RGV pela agradável convivência, amizade, disponibilidade e transmissão de conhecimentos.

À Epagri, Estações Experimentais de São Joaquim e Videira, em especial aos Pesquisadores Dr. Jean-Pierre Henri Joseph Ducroquet e Dr. Marco Antônio Dalbó, pelo intercâmbio de germoplasma.

À Vitroplanta – Biotecnologia Ltda, em especial aos Eng<sup>os</sup> Agrônomos Leandro Crestani e Osmar Alberto Crestani, pelo intercâmbio de germoplasma.

À equipe do LMBV, pelo auxílio no trabalhos práticos, pelo ótimo convívio durante esse período e principalmente pela grande amizade.

Aos colegas de Curso, pela troca de idéias, união, excelente convívio e grande amizade. Em especial: Edgar Yugar 'Bolívia', Eduardo Vieira 'Tiô' e Giampaolo Marchesini 'Velho'.

À Secretária do Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Bernadete, pela excelente recepção, simpatia, paciência e trabalho.

Ao pessoal do LFDGV pelo bom convívio, amizade e auxílio nos trabalhos práticos.

Aos professores da Universidade Regional Integrada – Campus de Erechim, Oleg Leontiev-Orlov, Altemir José Mossi e Rogério Luís Cansian, pelas primeiras oportunidades de pesquisa na área durante a graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>CULTURA DE EMBRIÕES E MULTIPLICAÇÃO <i>in vitro</i> DE CLONES DO PORTA-ENXERTO DE <i>Prunus</i> 'CAPDEBOSCQ'</b> .....	07
Introdução.....	08
Material e Métodos.....	10
Resultados e Discussão.....	11
Conclusões.....	13
Referências Bibliográficas.....	14
<b>ESTABELECIMENTO E MULTIPLICAÇÃO <i>in vitro</i> DE PORTA-ENXERTOS DE <i>Prunus</i></b> .....	21
Introdução.....	22
Material e Métodos.....	23
Resultados e Discussão.....	25
Conclusões.....	28
Referências Bibliográficas.....	28
<b>EFEITO DE DIFERENTES CITOCININAS NA MULTIPLICAÇÃO <i>in vitro</i> DO PORTA-ENXERTO DE <i>Prunus</i> 'CAPDEBOSCQ'</b> .....	34
Introdução.....	36
Material e Métodos.....	37
Resultados e Discussão.....	39
Conclusões.....	42
Referências Bibliográficas.....	42

<b>INTERVALO E NÚMERO DE SUBCULTURAS NA MULTIPLICAÇÃO <i>in vitro</i></b>	
<b>DO PORTA-ENXERTO DE <i>Prunus</i> 'CAPDEBOSCQ'</b> .....	49
Introdução.....	50
Material e Métodos.....	51
Resultados e Discussão.....	52
Conclusões.....	55
Referências Bibliográficas.....	56
<b>ENRAIZAMENTO <i>in vitro</i> DE PORTA-ENXERTOS DE <i>Prunus</i></b> .....	62
Introdução.....	63
Material e Métodos.....	64
Resultados e Discussão.....	65
Conclusões.....	69
Referências Bibliográficas.....	69
<b>ACLIMATIZAÇÃO DE PORTA-ENXERTOS DE <i>Prunus</i></b>	
<b>MICROPROPAGADOS</b> .....	80
Introdução.....	81
Material e Métodos.....	83
Resultados e Discussão.....	84
Conclusões.....	86
Referências Bibliográficas.....	86
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	92

## LISTA DE ABREVIATURAS

- BAP - 6-benzilaminopurina;  
KIN - 6-furfurilaminopurina;  
2iP - Isopenteniladenina;  
GA<sub>3</sub> - Ácido giberélico;  
IBA - Ácido indolbutírico;  
NAA - Ácido naftalenoacético;  
Lepoivre - Meio de cultura de Quoirin *et al.* (1977);  
MS - Meio de cultura de Murashige e Skoog (1962);  
a.C. - antes de Cristo;  
μmol - micromol;  
m - metro;  
mm - milímetro;  
cm - centímetro;  
g - grama;  
mg - miligrama;  
l - litro;  
s - segundo;  
pH - potencial hidrogeniônico;  
% - percentagem;  
°C - graus Célsius;  
R<sup>2</sup> - Coeficiente de determinação;  
CV - Coeficiente de Variação;  
SC - Santa Catarina;  
LMBV - Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal;  
LFDGV - Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal;  
CCA - Centro de Ciências Agrárias da UFSC;  
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina;  
Epagri - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A.

## RESUMO

No Brasil, a cultura do pessegueiro apresenta uma grande importância econômica, principalmente nas regiões Sul e Sudeste, ocupando uma área superior a 20 mil hectares e uma produção que supera 150 mil toneladas. Com o crescimento do mercado de frutas, há necessidade de frutos de alta qualidade, preços competitivos e, principalmente alta produtividade. Neste contexto, a muda com controle genético-sanitário é fundamental para a obtenção de pomares uniformes, livres de patógenos e produtivos. Atualmente, no Brasil, a produção de mudas de pessegueiro é feita por enxertia em porta-enxertos obtidos de sementes, causando problemas como desuniformidade genética e, conseqüentemente, de plantas. Neste contexto, os recursos genéticos vegetais e as técnicas de cultura *in vitro* podem auxiliar na seleção varietal, propagação clonal, controle e certificação genética-sanitária. Assim, este trabalho objetivou desenvolver metodologias para a propagação *in vitro* dos porta-enxertos de *Prunus* 'Capdeboscq' e 'GF677', e das seleções do porta-enxerto 'Capdeboscq' 'VP411' e 'VP417'. Foram usados como explantes eixos embrionários, gemas laterais e ápices caulinares, introduzidos em meio de cultura Lepoivre suplementado com BAP, NAA, GA<sub>3</sub> e IBA. Verificou-se que a cultura de embriões mostrou ser uma técnica eficiente para o estabelecimento e multiplicação *in vitro* de novos genótipos (seleções). O GA<sub>3</sub> não demonstrou efeito positivo na germinação dos embriões. No estabelecimento *in vitro*, ápices caulinares e gemas laterais apresentaram, respectivamente, 62,9% e 58,8% de sobrevivência. Os porta-enxertos 'VP411', 'Capdeboscq' e 'GF677' demonstraram um alto potencial para a multiplicação *in vitro*, com taxas, respectivamente de 16,0; 14,7 e 10,5 brotos por explantes. A citocinina BAP foi a mais eficiente para a fase de multiplicação *in vitro*. Intervalos e número de subculturas foram determinantes na fase de multiplicação. Intervalos de 14 dias permitiram as maiores taxas de multiplicação ao longo das subculturas. A hiperhidricidade demonstrou uma alta relação ao aumento do intervalo de subcultura. Na fase de enraizamento *in vitro* a presença de IBA foi determinante, porém o requerimento foi específico para cada porta-enxerto, demonstrando forte efeito do genótipo, com uma variação de 64,7 a 100% de enraizamento. A taxa de sobrevivência das plantas na aclimatização foi de 64 a 92% dependendo do porta-enxerto e da concentração de IBA utilizada na fase de enraizamento.



## ABSTRACT

In Brazil, the peach tree culture presents great economic importance, mainly in the South and Southeast regions, occupying more than 20 thousand hectares of cultivated area, with a yield that overcomes 150 thousand tons. With the growth of the market of fruits, there is need of fruits with high quality, competitive prices and, mainly, high productivity. In this context, the planting stock with adequate control genetic and sanitary is fundamental for the establishment of uniform orchards, free from pathogens and productive. Nowadays, in Brazil, the plant stock production is made by grafting the rootstocks obtained from seeds, causing problems as lack of genetic uniformity. In this context, the plant resources genetics and the techniques of *in vitro* culture may help variety selection, the clonal propagation and the control of genetic-sanitary certification. Thus, this work aimed at to develop methodologies for *in vitro* propagation of *Prunus* rootstocks 'Capdeboscq' and 'GF677', and the selections of 'Capdeboscq' rootstocks 'VP411' and 'VP417'. It was used as explants embryonic axes, lateral buds and vegetative apices established in salts and vitamins of Lepoivre supplemented with growth regulators for each phase. It was verified that the culture of embryos is an efficient technique for the establishment and *in vitro* multiplication of new genotypes (selections). GA<sub>3</sub> didn't showed positive effect on the germination of the embryos. For the rootstocks *in vitro* establishment phase, the largest rate of survival and lowest rate of contamination were observed as vegetative apices were used as explants. The rootstocks 'VP411', 'Capdeboscq' and 'GF677' showed high potential for *in vitro* multiplication, with 16,0; 14,7 and 10,5 shoots/explant, respectively. The cytokinin BAP was the most efficient for *in vitro* multiplication phase. Interval and subculture numbers were decisive in the multiplication phase. Intervals of 14 days allowed the largest multiplication rates along the subcultures. The hyperhydricity demonstrated a high relationship to the increase of the subculture interval. On the *in vitro* rooting, the treatment with IBA was decisive, but the requirement was specific for each rootstock, demonstrating strong genotype effect, with rates of rooting ranging from 64,7 to 100%. The rates of plant survival on acclimatization phase ranged from 64 to 92%, according to the rootstock and IBA concentration used in the rooting phase.

## INTRODUÇÃO

No Brasil, a fruticultura é destaque como alternativa de crescimento e desenvolvimento econômico, pois a produção nacional mostra-se muito aquém das potencialidades. Esse fato é relevante, levando-se em conta que essa atividade é fonte geradora de renda e emprego, além dos aspectos favoráveis, ao social na distribuição de riquezas e terras, permitindo a permanência do agricultor no campo com melhor qualidade de vida (Gonçalves e Souza, 1998).

A fruticultura de clima temperado destaca-se principalmente nas regiões Sul e Sudeste. Entretanto, verifica-se que apesar da alta potencialidade dessas regiões para a produção de frutas, o país ainda apresenta uma produção insuficiente para o abastecimento interno, necessitando da importação de volumes de frutos que somaram US\$ 200 milhões a partir de 1998, contribuindo para um déficit expressivo na balança comercial (Gonçalves e Souza, 1998; SBF, 2000).

A grande maioria das frutas importadas são típicas de clima temperado, para as quais a produção brasileira ainda é insuficiente. Entre estas espécies se destacam as prunáceas (ameixa, nectarina e pêsego), importadas em torno de 23 mil toneladas no ano de 1999, sendo 10% deste volume com pêsego (Marodin e Sartori, 2000; SBF, 2000).

Neste contexto, a cultura do pessegueiro apresenta uma grande importância econômica, ocupando atualmente uma área superior a 20 mil hectares e uma produção acima de 150 mil toneladas (Sachs e Campos, 1998). Na produção brasileira de pêsegos, destaca-se o Estado do Rio Grande do Sul como maior produtor, com uma área de 11,8 mil hectares e uma produção superior a 53 mil toneladas de frutos, seguido por Santa Catarina, São Paulo e Paraná (Epagri, 2001).

O Estado de Santa Catarina, no ano de 2000, apresentou uma área de 4,5 mil hectares com uma produção de 38,9 mil toneladas de frutos, sendo cultivado por 3.164 produtores (Epagri, 2001).

O pessegueiro é uma espécie nativa da China, tendo sido encontrada referências na literatura chinesa 20 séculos a.C. No Brasil, o pessegueiro foi introduzido em 1532 por Martin Afonso de Souza, por meio de mudas trazidas da Ilha da Madeira, plantadas em São Vicente (SP). Na região Sul, a cultura do pessegueiro só passou a ter maior importância a partir da década de 60. Foi, provavelmente, na década de 50 que um agricultor notou que uma planta de pessegueiro oriunda de caroços jogados ao solo apresentava boa adaptação e produção. Essa planta foi multiplicada, recebendo o nome de 'Aldrighi', cultivar que deu grande impulso à expansão da espécie (Sachs e Campos, 1998).

O consumo mundial de frutas cresce a uma taxa de 5% ao ano, sendo isso também verificado no Brasil (Fachinello, 2000). Dentro deste contexto, a muda produzida é de fundamental importância para a obtenção de pomares uniformes, livres de doenças e com alta produtividade.

No Brasil, praticamente 100% das mudas comerciais de pessegueiro são obtidas através da enxertia, os porta-enxertos são obtidos de sementes, geralmente da indústria de conserva, onde, pela falta de controle, ocorrem misturas varietais, desuniformidade de plantas, morte precoce e, principalmente, falta de identidade genética (Fachinello, 2000). Para a obtenção dos porta-enxertos são utilizadas sementes de qualquer cultivar de maturação tardia, que apresente boa adaptabilidade na região (Schuch *et al.*, 1999).

No Sul do Brasil, a maioria dos porta-enxertos utilizados na produção de mudas de pessegueiro e ameixeira são da cultivar 'Capdeboscq' (*Prunus persica* (L.) Batsch), cultivar de ciclo tardio, possibilitando assim, uma boa germinação, e além disso, é cultivada para a industrialização (Fachinello *et al.*, 1995). Esta cultivar é originária da Estação Experimental de Pelotas, obtida por polinização livre de um cruzamento entre 'Lake City' e uma seleção local chamada 'Intermediário' (Finardi, 1998).

No entanto, existe um grande interesse no uso de outros porta-enxertos com adaptação a diferentes ambientes. Os mais conhecidos são os híbridos entre pessegueiro x amendoeira e damasqueiro e ameixeira, como o porta-enxerto GF677 (*Prunus persica* x *Prunus amygdalus*). Este porta-enxerto apresenta como características, a produção de plantas robustas, decorrentes do vigor híbrido, e são compatíveis com ambas as espécies (Finardi, 1998; Fachinello, 2000). Além disso,

tendo demonstrado um bom potencial para a propagação clonal comercial através da estaquia e da micropropagação (Zimmerman, 1991; Marino e Ventura, 1997; Fachinello, 2000).

Desta forma, verifica-se também uma crescente busca de novos porta-enxertos com baixo vigor (ananizantes) para plantios adensados, permitindo facilidade no manejo do pomar e maior produtividade por área. Assim, as seleções ‘VP411’ e ‘VP417’ são porta-enxertos originários da cultivar Capdeboscq, obtidos pela Vitroplanta – Biotecnologia Ltda, e estão sendo testados para a redução do porte e melhor qualidade dos frutos em ameixeira cultivar ‘Letícia’.

Portanto, existe a necessidade de novas alternativas de porta-enxertos em substituição aos tradicionais, de preferência de origem clonal, permitindo, assim, a captura e fixação de ganhos genéticos (Fachinello, 2000). A tecnologia de cultura *in vitro* vem apresentando um papel de extrema importância nas pesquisas básicas e aplicadas, principalmente em relação à genética e fitossanidade de plantas cultivadas (Zilkah, 1993; Santarém e Astarita, 1999).

Na cultura do pessegueiro, como outras espécies do gênero *Prunus*, verifica-se que a cultura *in vitro* tem apresentado grandes progressos, através do uso dos recursos genéticos vegetais adequados para o avanço científico e tecnológico associado à aspectos de genética, fisiologia, fitossanidade e propagação (Burgos e Ledbetter, 1993; Scorza *et al.*, 1994 e 1995; Pérez-Tornero *et al.*, 1999; Pérez-Tornero e Burgos, 2000). A micropropagação de prunáceas é uma técnica empregada tanto para a produção clonal de porta-enxertos, como uma técnica auxiliar na indexação de matrizes (Hammerschlag, 1982; Zilkah, 1993; Pérez-Tornero *et al.*, 2000).

Segundo O’Riordain, citado por Lovato *et al.* (1998), na Europa, anualmente são produzidas em torno de 200 milhões de plantas através da técnica de micropropagação. Estima-se que em torno de 15% deste valor são com espécies frutíferas e, somente na Itália, são produzidas mais de 10 milhões de unidades/ano de porta-enxertos de *Prunus* por propagação *in vitro*.

Entretanto, a variabilidade do comportamento *in vitro* faz com que seja necessário determinar as condições de cultura para cada genótipo. Para otimizar o potencial biológico destas culturas *in vitro*, torna-se necessário o conhecimento de

concentrações e reguladores de crescimento (Leontiev-Orlov *et al.*, 2000; Pérez-Tornero *et al.*, 2000), intervalo e número de subculturas (Borkowska, 1985; Marino *et al.*, 1985), potencial genotípico *in vitro* (Pérez-Tornero *et al.*, 1999; Pérez-Tornero e Burgos, 2000), entre outros.

Desta forma, este trabalho objetivou estabelecer, avaliar e otimizar metodologias para a propagação *in vitro*, em suas diferentes fases: cultura de embriões, estabelecimento, multiplicação, enraizamento e aclimatização dos porta-enxertos de *Prunus* 'Capdeboscq', 'GF677' e das seleções 'VP411' e 'VP417'.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORKOWSKA, B. Micropropagation of sour cherry, cultivar Schattenmorelle, **Acta Horticulturae**, Leuven, v.169, p.329-333, 1985.
- BURGOS, L.; LEDBETTER, C.A. Improved efficiency in apricot breeding: Effects of embryo development and nutrient media on *in vitro* germination and seedling establishment, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.38, p.217-222, 1993.
- EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA S.A. (Epagri). **Frutas de Clima Temperado: Situação da safra 1999/2000, Previsão da safra 2000/2001**. Videira: Epagri, 2001. 21p.
- FACHINELLO, J.C. Problemática das mudas de plantas frutíferas de caroço. In: I SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE FRUTAS DE CAROÇO: PÊSSEGOS, NECTARINAS E AMEIXAS, 1., 2000, Porto Alegre. **Anais...** p.25-40.
- FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; FORTES, G.R. de L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária da UFPEL, 1995.178p.
- FINARDI, N.L. Métodos de propagação e descrição de porta-enxertos, In: MEDEIROS, C.A.B.; RASEIRA, M.C.B. **A cultura do pessegueiro**. 1 ed. Pelotas: Embrapa-CPACT, 1998, volume único, 1, p.100-129.

- GONÇALVES, J.S.; SOUZA, S. A. M. Porque o Chile exporta mais frutas frescas que o Brasil? **Revista Informações Econômicas**, v.28, p.54-57, 1998.
- HAMMERSCHLAG, F. Factors influencing *in vitro* multiplication and rooting of the plum rootstock Myrobalan (*Prunus cerasifera* Ehrh.), **Journal American Society for Horticultural Science**, v.107, p. 44-47, 1982.
- LEONTIEV-ORLOV, O.; MOSSI, A. J.; CANSIAN, R.L.; ROGALSKI, M.; VENDRUSCOLO, T. Diferentes reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de ameixeira (*Prunus domestica* L.) cultivar Kantimirovskaja, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n.2, p.268-271, 2000.
- LOVATO, P.E., SCHUEPP, H.; TROUVELOT, A.; GIANINAZZI, S. Application of mycorrhizas to orchard and ornamental plants. In: VARMA, A.; HOCK, B. (eds.) **Mycorrhizas: structure, function, molecular biology and biotechnology**, 2 ed. Heidelberg: Springer Verlag, 1998, p.443-467.
- MARINO, G.; ROSATI, P.; SAGRATI, F. Storage of *in vitro* cultures of *Prunus* rootstocks, **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.5, p.73-78, 1985.
- MARINO, G.; VENTURA, M. The influence of ethylene on *in vitro* rooting of GF 677 (*Prunus persica* x *Prunus amygdalus*) hybrid peach rootstock, **In Vitro Cell. Biol. – Plant.**, v.33, p.26-29, 1997.
- MARODIN, G.A.B.; SARTORI, I.A. Situação das frutas de caroço no Brasil e no Mundo. In: I SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE FRUTAS DE CAROÇO: PÊSSEGOS, NECTARINAS E AMEIXAS, 1., 2000, Porto Alegre. **Anais...** p.25-40.
- PÉREZ-TORNERO, O.; BURGOS, L. Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.63, p.133-141, 2000.
- PÉREZ-TORNERO, O.; BURGOS, L.; EGEA, J. Introduction and establishment of apricot *in vitro* through regeneration of shoots from meristem tips, **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, v.35, p.249-253, 1999.
- PÉREZ-TORNERO, O.; LÓPEZ, J.M.; EGEA, J.; BURGOS, L. Effect of basal media and growth regulators on the *in vitro* propagation of apricot (*Prunus armenica* L.) cv. Canino, **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 75, n.3, p.283-286, 2000.

- SACHS, S.; CAMPOS, A.D. O Pessegueiro, In: MEDEIROS, C.A.B.; RASEIRA, M.C.B. **A cultura do pessegueiro**. 1 ed. Pelotas: Embrapa-CPACT, 1998, volume único, 1, p.13-19.
- SANTARÉM, E.R.; ASTARITA, L.V. Biotecnologia Vegetal: Cultura de tecidos vegetais, **Revista Científica UNICRUZ**, Cruz Alta, v.1, n.1, p.18-26, 1999.
- SCHUCH, M.W.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; FACHINELLO, J.C. Desenvolvimento de porta-enxertos de pessegueiro: comparação entre repicagem e semeadura direta no viveiro, **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.5, n.1, p.4-6, 1999.
- SCORZA, R.; HAMMERSCHLAG, F.A.; ZIMMERMAN, T.W.; CORDTS, J.M. Genetic transformation in *Prunus persica* (Peach) and *Prunus domestica* (Plum). In Bajaj Y.P.S. (ed.) **Biotechnology in Agriculture and Forestry, Trees 1**. Springer-Verlag, 1995, v.34, p.255-268.
- SCORZA, R.; RAVELONANDRO, M.; CALLAHAN, A.M.; CORDTS, J.M.; FUCHS, M.; DUNEZ, J.; GONSALVES, D. Transgenic plums (*Prunus domestica* L.) express the plum pox virus coat protein gene. **Plant Cell Reports**, v.14, p. 18-22, 1994.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE FRUTICULTURA (SBF). **Informativo da Sociedade Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, n. 1, Março, 8p, 2000.
- ZILKAH, S. *In vitro* micropropagation of indicator plants for indexing *Prunus* necrotizing ring sport virus, **Acta Horticulturae**, Leuven, v.336, p.121-125, 1993.
- ZIMMERMAN, R.H. Micropropagation of temperate zone fruit and nut crops. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H., ed. **Micropropagation**. The Netherlands:Kluwer Publishers; p.231-246, 1991.

## CULTURA DE EMBRIÕES E MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE CLONES DO PORTA-ENXERTO DE *Prunus* 'CAPDEBOSCQ'

**RESUMO** - No gênero *Prunus*, a cultura de embriões é uma técnica muito utilizada para trabalhos de fisiologia e melhoramento genético, com destaque para a transformação genética e propagação *in vitro*. Com o objetivo de avaliar a germinação, o desenvolvimento organogenético de embriões e a taxa de multiplicação *in vitro* de clones do porta-enxerto de *Prunus* 'Capdeboscq', foram inoculados eixos embrionários em tubos de ensaio (25x150mm) contendo 10 ml de meio de cultura de Lepoivre, suplementado com BAP (0,1 mg.l<sup>-1</sup>), NAA (0,1 mg.l<sup>-1</sup>) e GA<sub>3</sub> (0,0; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 mg.l<sup>-1</sup>). Após a germinação dos embriões, gemas apicais foram submetidas à fase de multiplicação em meio de cultura de Lepoivre, suplementado de BAP (0,5 mg.l<sup>-1</sup>). Após três subculturas, avaliou-se o potencial de multiplicação *in vitro* de quatro clones escolhidos ao acaso. Nesta última subcultura utilizou-se o método de multiplicação em meio *dupla-fase*, com fase sólida constituída do meio de Lepoivre, suplementado com BAP (0,5 mg.l<sup>-1</sup>), e fase líquida apenas subtraiu-se o BAP. Os resultados mostraram uma percentagem média de germinação *in vitro* de 70,7%. Os diferentes tratamentos utilizados não apresentaram diferenças significativas quanto a taxa de germinação. A presença de GA<sub>3</sub> induziu um maior alongamento da parte aérea dos embriões, no entanto inibiu o desenvolvimento do sistema radicular. Os clones obtidos da cultura de embriões demonstraram alto potencial para a multiplicação *in vitro*, com taxas de 6,8 a 14,9 brotos por explante.

**Termos para indexação:** Fruticultura, pessegueiro, germinação *in vitro*, ácido giberélico.



## EMBRYO CULTURE AND *in vitro* MULTIPLICATION OF *Prunus* ROOTSTOCKS CLONES 'CAPDEBOSCQ'

**ABSTRACT** – In the genus *Prunus*, the embryo culture is a technique commonly used for studies in physiology and genetic breeding, with emphasis in *in vitro* propagation and genetic transformation. With the objective of to evaluate the germination, embryo organogenetic development and *in vitro* multiplication of 'Capdeboscq' peach clones, embryonic axis were inoculated in glass tubes (25x150 mm) containing 10 ml of Lepoivre's medium, supplemented with sucrose (20,0 g.l<sup>-1</sup>), agar (7,0 g.l<sup>-1</sup>), BAP (0,1 mg.l<sup>-1</sup>), NAA (0,1 mg.l<sup>-1</sup>) and GA<sub>3</sub> (0,0; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 mg.l<sup>-1</sup>). Following embryo germination, apexes were submitted to *in vitro* multiplication phase in Lepoivre's medium supplemented with BAP (0,5 mg.l<sup>-1</sup>). After three subcultures, the *in vitro* multiplication potential of four clones randomly chose was evaluated. In the later subculture, it was used the method of multiplication in *double-phase* medium, with solid phase constituted of Lepoivre's medium with BAP (0,5 mg.l<sup>-1</sup>) and the liquid phase subtracted of that growth regulator. The results showed a germination rate of 70,7% and the treatments didn't show differences as to germination rate. GA<sub>3</sub> induced larger shoot elongation, but inhibited root system development. The clones resulting of embryo culture showed high potential for *in vitro* multiplication, with a range of 6,8 to 14,9 shoots/explant.

**Index terms:** Fruit crop, peach tree, *in vitro* germination, giberellic acid.

### INTRODUÇÃO

No Brasil, a cultura do pessegueiro apresenta importância econômica principalmente nas regiões Sul e Sudeste. O principal Estado produtor é o Rio Grande do Sul, com uma área de 11,9 mil hectares e uma produção de 53 mil toneladas. Santa Catarina é o segundo Estado em área e o terceiro em produção, respectivamente com 4,5 mil hectares e 38,9 mil toneladas de frutos (Epagri, 2001).

No Brasil, o processo de produção de mudas de pessegueiro é feito unicamente por enxertia, em porta-enxertos obtidos de sementes originárias da indústria de conserva. Verifica-se que, pela falta de controle e seleção de materiais para propagação, ocorrem problemas de misturas varietais, desuniformidade de plantas, incompatibilidade, morte precoce e, principalmente, falta de uniformidade genética (Fachinello, 2000).

As novas tecnologias de propagação de plantas frutíferas, especialmente de porta-enxertos, estão, muitas vezes, embasadas nos métodos de cultura *in vitro* que permitem propagar espécies para a obtenção de matrizes e mudas de alta qualidade genética e sanitária.

A cultura de embriões tem sido utilizada no Brasil, principalmente em hibridações entre genitores de variedades de pessegueiro de maturação precoce, onde não há um completo desenvolvimento do embrião na fase de maturação do fruto, reduzindo, assim, sua germinação em condições normais (Feliciano e Assis, 1989; Navarro *et al.*, 1992; Raseira, 1998; Quezeda *et al.*, 1998). No entanto, embriões devido à juvenilidade e ao alto potencial regenerativo, têm demonstrado serem excelentes fontes de explantes para culturas *in vitro*, principalmente para estudos de fisiologia e melhoramento vegetal (Burgos e Ledbetter, 1993; Ye *et al.*, 1994; Pooler e Scorza, 1995).

Desta forma, a cultura de embriões é uma alternativa para desenvolver protocolos de estabelecimento e propagação *in vitro*, metodologias para otimização de meios de cultura, testar concentrações e reguladores de crescimento e, avaliar e selecionar genótipos de prunáceas, entre outros.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) na germinação *in vitro*, e no desenvolvimento organogênico de embriões do porta-enxerto de *Prunus* 'Capdeboscq', e também, verificar as taxas de multiplicação *in vitro* dos clones obtidos a partir da cultura de embriões.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados caroços da cultivar de pessegueiro 'Capdeboscq' provenientes da Epagri - Estação Experimental de Videira. As sementes desprovidas dos endocarpos foram mantidas por 6 meses a temperatura de 4-5°C, e posteriormente, submetidas ao processo de desinfestação em etanol 70% (2 min), tetraciclina (Tetrex ®) 750 mg.l<sup>-1</sup> (24 h), benomyl (Benlate®) 1g.l<sup>-1</sup> (10 min), hipoclorito de sódio 1,25% (40 min).

Em câmara de fluxo laminar, após três lavagens em água destilada esterilizada, os eixos embrionários foram extraídos e inoculados em tubos de ensaio (25x150 mm) contendo 10 ml de meio de cultura de Lepoivre (Quoirin *et al.*, 1977), suplementado com sacarose (20,0 g.l<sup>-1</sup>), ágar (7,0 g.l<sup>-1</sup>), BAP - benzilaminopurina (0,1 mg.l<sup>-1</sup>), NAA - ácido naftalenoacético (0,1 mg.l<sup>-1</sup>) e GA<sub>3</sub> - ácido giberélico (0,0; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 mg.l<sup>-1</sup>). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,2-5,3 antes da autoclavagem, a 121°C, durante 15 minutos.

Após 30 dias, os embriões foram avaliados quanto à percentagem de germinação, altura da parte aérea, percentagem de desenvolvimento do sistema radicular e número de raízes por embrião. Foram considerados germinados, os embriões que desenvolveram a parte aérea. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso, com cinco eixos embrionários por repetição e cinco repetições por tratamento.

Após a germinação, a parte aérea dos embriões foi removida e submetida à fase de multiplicação no mesmo meio de cultura citado anteriormente, porém com apenas o regulador de crescimento BAP (0,5 mg.l<sup>-1</sup>). Após duas subculturas, a cada 21 dias, foram selecionados ao acaso quatro clones para multiplicação *in vitro*, denominados: CB1, CB3, CB4 e CB5. Na terceira subcultura, segmentos nodais com 1-2 cm (4-5 gemas) destes clones foram submetidos à cultura *in vitro* em meio de cultura *dupla-fase*, com a fase sólida constituída do mesmo meio citado anteriormente, porém com apenas o regulador BAP (0,5 mg.l<sup>-1</sup>). Após 15 dias de cultura foi adicionado meio líquido igual ao anterior, porém com ausência de BAP. Após 30 dias, as culturas foram avaliadas quanto ao número de brotos por explante, altura média das brotações (mm) e

número de brotos >20 (mm). O delineamento experimental adotado foi o inteiramente ao acaso, com cinco explantes por repetição e três repetições por tratamento.

Para as diferentes fases *in vitro*, as culturas foram mantidas em câmara de crescimento com temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de  $40\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fornecidas por lâmpadas fluorescentes brancas frias.

Todos os dados foram submetidos à Análise da Variância (ANOVA) e ao teste de separação de médias SNK (Sokal e Rohlf, 1995).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No processo de estabelecimento *in vitro* verificou-se uma taxa média de 14% de embriões contaminados. Os resultados obtidos demonstram que o processo de introdução *in vitro* de embriões foi eficaz. Resultados semelhantes foram obtidos por Navarro *et al.* (1992), que obtiveram uma taxa de 0 a 14 % de contaminação na cultura de embriões de pessegueiro. Segundo estes autores, no tratamento com ausência do tegumento a taxa de contaminação foi de 12 %.

Os resultados para percentagem de germinação dos embriões atingiram valores médios de 70,7% (**Figura 1**). Os resultados obtidos neste trabalho foram semelhantes àqueles de Burgos e Ledbetter (1993), que obtiveram taxas de germinação entre 76,9 a 89,6 % na cultura de embriões de damasco; as diferenças encontradas nos valores foram determinadas ao tamanho do embrião. Quezeda *et al.* (1998) avaliaram a taxa de germinação de embriões *in vitro* de nove cultivares de pessegueiro, utilizando frutos maduros, e verificaram uma variação entre as cultivares de 9,5 a 92,6 % de embriões germinados. Ainda, deve-se salientar que as sementes utilizadas no presente trabalho permaneceram estocadas por seis meses a  $4-5^{\circ}\text{C}$ , o que pode ter influenciado na capacidade de germinação.

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos quanto à taxa de germinação (**Figura 1**). Entretanto, observou-se um decréscimo nas taxas de germinação com o aumento da concentração de  $\text{GA}_3$  presente no meio cultura. Para Cicero (1986), a germinação depende de fatores fisiológicos e da relação entre os

reguladores de crescimento presentes no embrião. Os resultados não efetivos do GA<sub>3</sub> na germinação, podem ser explicados pela utilização de apenas o eixo embrionário. Os fatores (promotores e inibidores) responsáveis pela dormência do embrião estariam presentes no tegumento e não no embrião. Resultados similares foram relatados por Toit (1979), salientando que o tegumento possui efeito inibidor na germinação de pessegueiro. Navarro *et al.* (1992), também destacaram que a manutenção do tegumento na cultura de embriões de pessegueiro determinou uma baixa taxa de germinação e uma redução no comprimento da parte aérea das plântulas.

No entanto, os resultados demonstraram um efeito positivo do GA<sub>3</sub> no crescimento da parte aérea dos embriões, ocorrendo um aumento desta variável proporcional à concentração de GA<sub>3</sub> utilizada (**Figura 2 e 5**). O alongamento da parte aérea é um dos efeitos mais conhecidos do GA<sub>3</sub> no processo de cultura *in vitro*. As giberelinas ocasionam alongamento celular e divisão celular, sendo evidenciadas pelo aumento no tamanho celular e no número de células (Taiz e Zeiger, 1998). A altura da parte aérea dos embriões é um fator importante para o estabelecimento e multiplicação *in vitro*, pois este pode facilitar o processo de repicagens. Reeves *et al.* (1985), observaram resultados positivos do GA<sub>3</sub> no alongamento de brotações do porta-enxerto de *Prunus* 'St. Julien A'. Para estes autores, concentrações de GA<sub>3</sub> inferiores a 12,5 mg.l<sup>-1</sup> não foram eficientes para esta finalidade.

Verificou-se no presente trabalho que em relação ao desenvolvimento do sistema radicular e número de raízes por embrião, a presença de GA<sub>3</sub> apresentou um efeito negativo. Foram observadas diferenças significativas para a percentagem de embriões com sistema radicular e no número de raízes por embrião, entre a testemunha e as diferentes concentrações de GA<sub>3</sub> (**Figuras 3, 4 e 5**). Resultados semelhantes são mencionados na literatura, onde a presença de GA<sub>3</sub> inibiu o processo de enraizamento. Para Reeves *et al.* (1985), o uso de GA<sub>3</sub> (12,5 mg.l<sup>-1</sup>) para o alongamento de partes aéreas de *Prunus insititia*, causou uma inibição do processo de enraizamento.

Apesar do efeito negativo do GA<sub>3</sub> no desenvolvimento do sistema radicular dos embriões, não é raro o crescimento da parte aérea e ausência de raízes na cultura de embriões de pessegueiro (Feliciano e Assis, 1989).

Os resultados para a fase de multiplicação *in vitro* dos clones CB1, CB3, CB4 e CB5 são apresentados na **Tabela 1**. Os valores observados foram de 6,8 a 14,9 brotos por explante, com superioridade para os clones CB3 e CB4. Verifica-se que estes resultados são superiores aos obtidos por Parfitt e Almehti (1986) e Hammerschlag *et al.* (1987), com avaliações *in vitro* de 56 e 8 variedades de pessegueiro, respectivamente. Esta superioridade pode estar relacionada ao genótipo e a formulação do meio de cultura, sendo que estes autores utilizaram, respectivamente, os meios AP e MS. Para o número de brotos >20 mm também ocorreram diferenças significativas entre os clones com valores de 1,1 a 3,7 brotos por explante. O clone CB3 novamente mostrou-se superior aos demais, seguido pelo CB4. Para a altura das brotações não ocorreram diferenças significativas entre os clones. Os valores médios observados foram de 10,9 a 14,2 mm (**Figura 5**). Estes resultados são similares aos de Parfitt e Almehti (1986) em experimentos com 56 variedades de pessegueiro *in vitro*. Para estes autores, os valores de altura média dos brotos apresentaram variação de 13,6 a 19,1 mm, com multiplicação em meio de cultura AP com BAP (6,0 mg.l<sup>-1</sup>) e IBA (0,01 mg.l<sup>-1</sup>).

Verificou-se um efeito significativo do genótipo para a taxa de multiplicação *in vitro*. Confirmando, desta forma, que o genótipo é um dos fatores que tem demonstrado uma grande influência no processo da micropropagação de Prunáceas (Parfitt e Almehti, 1986; Quezeda *et al.*, 1998; Pérez-Tornero e Burgos, 2000; Silveira *et al.*, 2001).

## CONCLUSÕES

- 1 A técnica de cultura de embriões demonstrou ser eficaz para o estabelecimento e multiplicação *in vitro*.
- 2 Eixos embrionários de pessegueiro apresentaram alta viabilidade para germinação *in vitro*.

- 3 A utilização de GA<sub>3</sub> não demonstrou efeito positivo na taxa de germinação de eixos embrionários. No entanto, ativou o crescimento da parte aérea e reduziu o desenvolvimento *in vitro* do sistema radicular.
- 4 Os clones de 'Capdeboscq' originários de cultura de embriões apresentaram variação nas taxas de multiplicação *in vitro*.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BURGOS, L.; LEDBETTER, C.A. Improved efficiency in apricot breeding: Effects of embryo development and nutrient media on *in vitro* germination and seedling establishment, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.38, p.217-222, 1993.
- CICERO, S.M. Dormência de sementes. In: SEMANA DE ATUALIZAÇÃO EM PRODUÇÃO DE SEMENTES, 1986, Piracicaba, **Resumos...**,Cap.3.
- EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA S.A. (Epagri). **Frutas de Clima Temperado: Situação da safra 1999/2000, Previsão da safra 2000/2001**. Videira: Epagri, 2001. 21p.
- FACHINELLO, J.C. Problemática das mudas de plantas frutíferas de caroço. In: I SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE FRUTAS DE CAROÇO: PÊSSEGOS, NECTARINAS E AMEIXAS, 1., 2000, Porto Alegre. **Anais...** p.25-40.
- FELICIANO, A.J.; ASSIS, M. *In vitro* rooting of shoot from embryocultured peach seedling. **HortScience**, v.18, p.705-706, 1989.
- HAMMERSCHLAG, F.A.; BAUCHAN, G.R.; SCORZA, R. Factors influencing *in vitro* multiplication and rooting of peach cultivars, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.8, p.235-242, 1987.

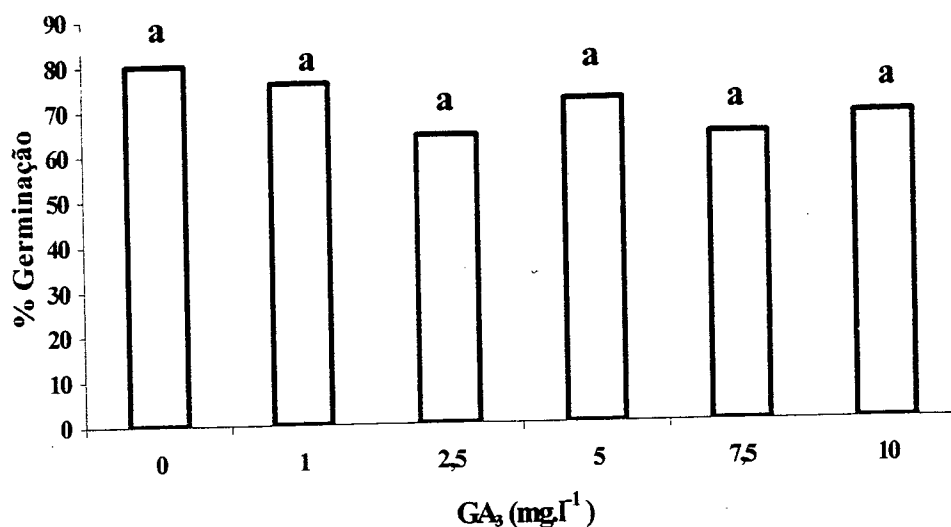
- NAVARRO, Z.C.; PETERS, J.A.; RASEIRA, M. do C.B. Embriocultura e cultura de óvulos em pessegueiro, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.14, n.1, p.181-186, 1992.
- PARFITT, D.E.; ALMEHDI, A.A. *In vitro* propagation of peach: II. A medium for *in vitro* multiplication of 56 peach cultivars, **Fruit Varieties Journal**, v.40, n.2, p.46-47, 1986.
- PÉREZ-TORNERO, O.; BURGOS, L. Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.63, p.133-141, 2000.
- POOLER, M.R.; SCORZA, R. Regeneration of Peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] Rootstock Cultivars from Cotyledons of Mature Stored Seed. **HortScience**, Alexandria, v.30, p.355-356, 1995.
- QUEZEDA, A.C.; RASEIRA, M. do C.B.; CITADIN, I.; SILVA, J.B. da. Parâmetros indicativos da necessidade do uso de embriocultura em cultivares precoces de pessegueiro (*Prunus persica*, L., Batsch.), **Agropecuária Clima Temperado**, Pelotas, v.1, n.1, p. 55-59, 1998.
- QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P.; BOXUS, P. Un premier bilan de 10 années de recherches sur les cultures de méristèmes et la multiplication *in vitro* de fruitiers ligneux. **C.R. Rech. Agron.** Gembloux, p.93-117, 1977.
- RASEIRA, M.C.B. Meios para cultivo de embriões imaturos de pessegueiro, *Prunus persica* L. Batsch, **Agropecuária Clima Temperado**, Pelotas, v.1, n.1, p.47-53, 1998.
- REEVES, D.W.; COUVILLON, G.A.; HORTON, B.D. Effect of gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) on elongation and rooting of 'St. Julien A' rootstock *in vitro*, **Scientiae Horticulturae**, Amsterdam, v.26, p.253-259, 1985.
- SILVEIRA, C.A.P.; FACHINELLO, J.C.; FORTES, G.R. de L.; CITADIN, I.; RODRIGUES, A.C.; QUEZADA, A.C.; SILVA, J.B. da. Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos do gênero *Prunus* sob diferentes concentrações de BAP em dois meios de cultura, **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, n.3, p.488-492, 2001.
- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**. New York: W.H. Freeman and Company, 1995.



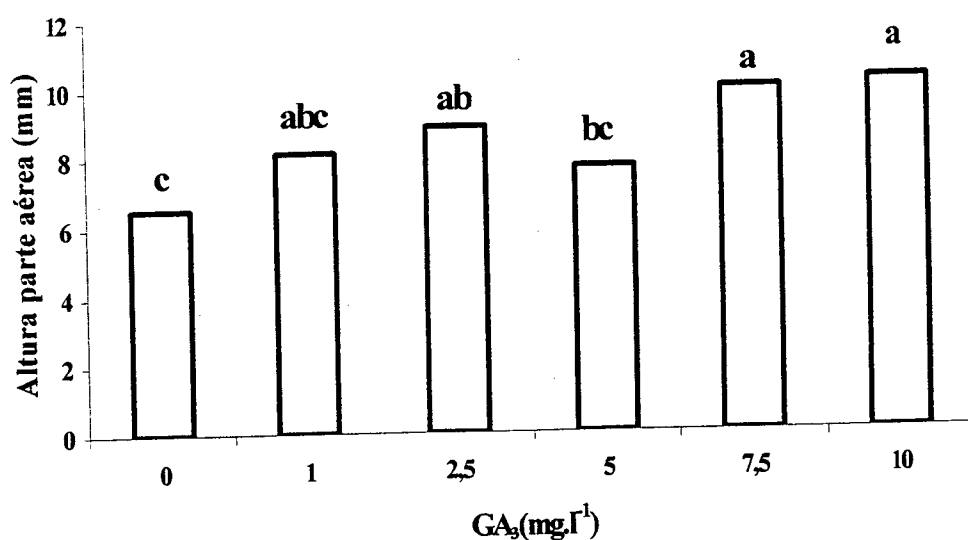
TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Redwood City: Benjamin, Cummings, Cap.20, 1998. 792p.

TOIT, H.J. du, JACOBS, G.; STRYDOM, D.K. Role of the various seed parts in peach seed dormancy and initial seedling growth. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.104, n.64, p.430-92, 1979.

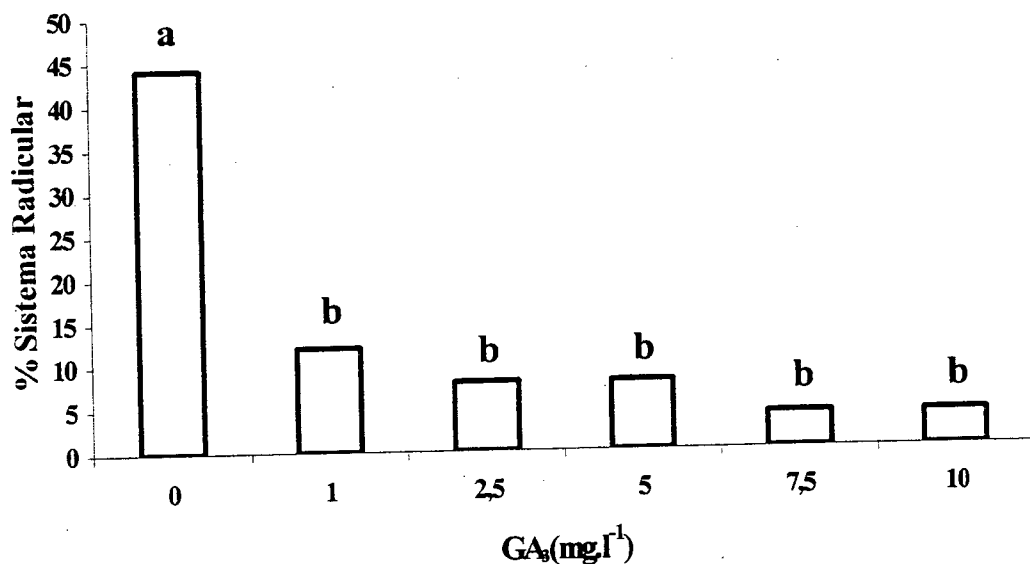
YE, X.; BROWN, S.K.; SCORZA, R.; CORDTS, J.; SANFORD, J.C. Genetic transformation of peach tissue by particle bombardment, **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.119, n.2, p.367-373, 1994.



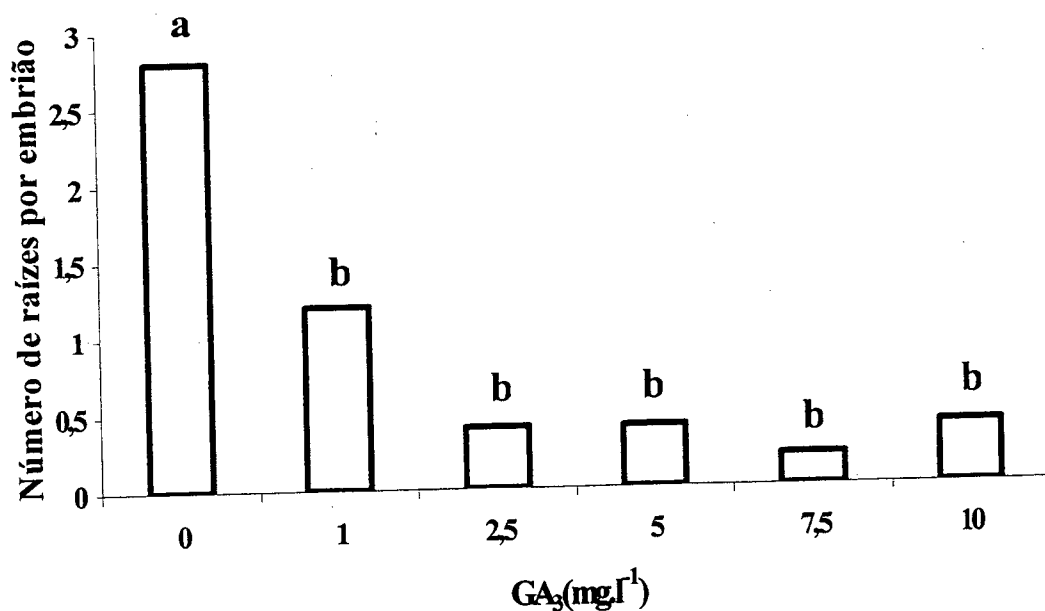
**FIGURA 1.** Valores médios para a percentagem de germinação *in vitro* de embriões do porta-enxerto de *Prunus* 'Capdeboscq', após 30 dias em meio de cultura de Lepoivre suplementado com BAP (0,1 mg.l<sup>-1</sup>), NAA (0,1 mg.l<sup>-1</sup>) e diferentes níveis de GA<sub>3</sub> (n=5). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.



**FIGURA 2.** Valores médios para a altura média da parte aérea (mm) de embriões *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* 'Capdeboscq', após 30 dias em meio de cultura de Lepoivre suplementado com BAP (0,1 mg.l<sup>-1</sup>), NAA (0,1 mg.l<sup>-1</sup>) e diferentes níveis de GA<sub>3</sub> (n=5). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.



**FIGURA 3.** Valores médios para a percentagem de desenvolvimento do sistema radicular *in vitro* de embriões do porta-enxerto de *Prunus* 'Capdeboscq', após 30 dias em meio de cultura de Lepoivre suplementado com BAP (0,1 mg.l<sup>-1</sup>), NAA (0,1 mg.l<sup>-1</sup>) e diferentes níveis de GA<sub>3</sub> (n=5). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.

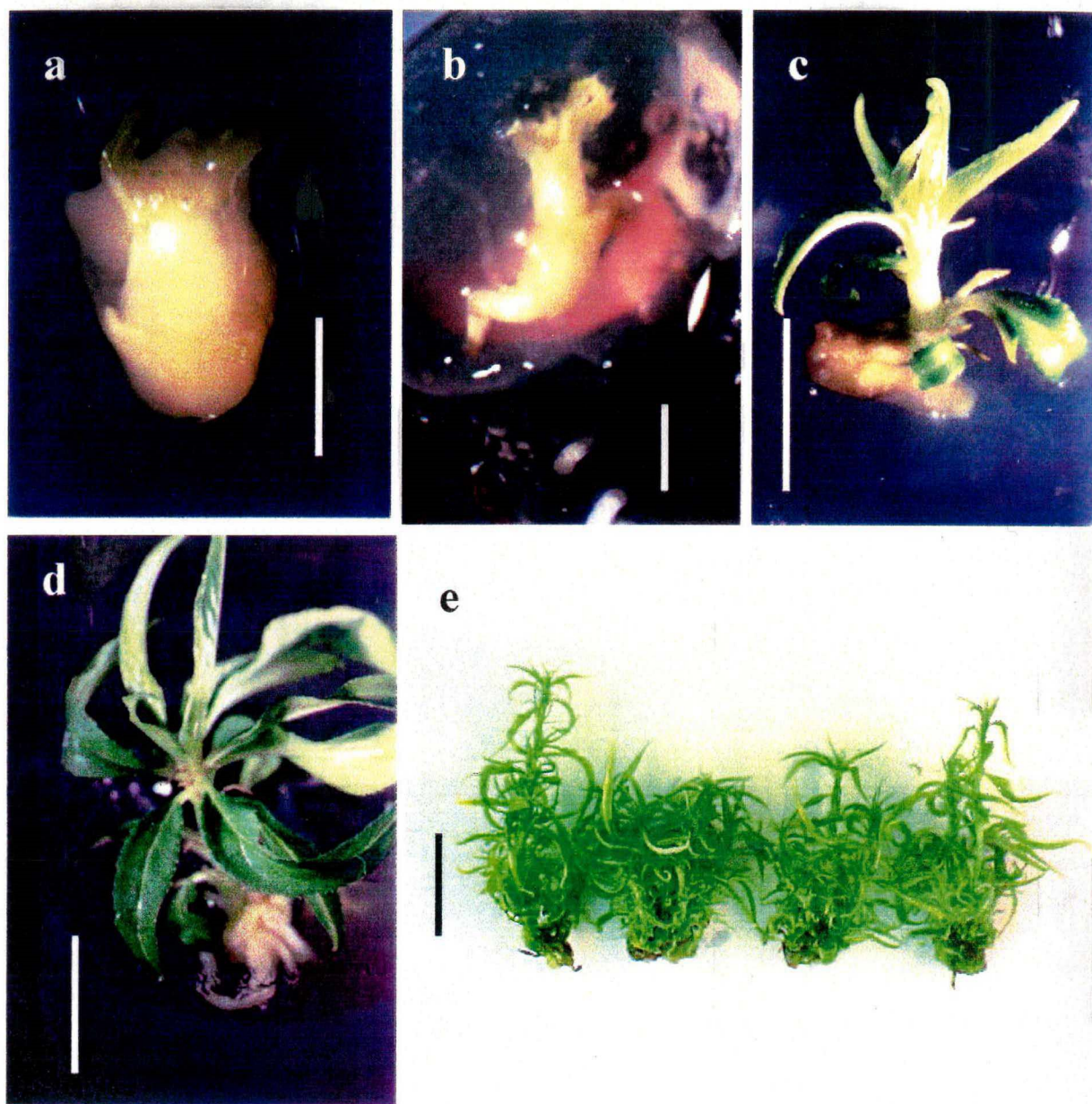


**FIGURA 4.** Valores médios para o número de raízes *in vitro* de embriões do porta-enxerto de *Prunus* 'Capdeboscq', após 30 dias em meio de cultura de Lepoivre suplementado com BAP (0,1 mg.l<sup>-1</sup>), NAA (0,1 mg.l<sup>-1</sup>) e diferentes níveis de GA<sub>3</sub> (n=5). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.

**TABELA 1.** Valores médios do número de brotos, altura média dos brotos (mm) e número de brotos >20 (mm) de clones do porta-enxerto de *Prunus* ‘Capdeboscq’, na multiplicação *in vitro* após 30 dias em meio de cultura de Lepoivre *dupla-fase*. (n=3). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.

Clones	Número de brotos	Altura média dos brotos (mm)	Número de brotos > 20 mm
CB1	9,9 b	12,6 a	1,6 c
CB3	14,9 a	14,3 a	3,7 a
CB4	13,1 a	13,2 a	2,8 b
CB5	6,9 c	10,9 a	1,1 c
CV(%)	11,0	12,5	16,5

Médias seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem significativamente pelo teste SNK a 5%.



**FIGURA 5.** Aspectos morfogênicos do desenvolvimento *in vitro* de embriões do porta-enxerto de *Prunus* 'Capdeboscq'. a) eixo embrionário estabelecido *in vitro* (barra 1mm). b) eixo embrionário em desenvolvimento bipolar, 7 dias *in vitro*, (barra 3 mm). c) embrião com apenas o desenvolvimento da parte aérea, 15 dias *in vitro* (barra 10 mm). d) embrião com o desenvolvimento bipolar, 30 dias *in vitro* (barra 10 mm). e) ápices caulinares de embriões em fase de multiplicação *in vitro* (barra 10 mm). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.

## ESTABELECIMENTO E MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE PORTA-ENXERTOS DE *Prunus*

**RESUMO** – Na fruticultura tecnificada, a qualidade genética e sanitária das mudas é de fundamental importância para o sucesso da atividade. Para a cultura do pessegueiro, a micropropagação tem permitido a produção clonal de plantas, com matrizes e mudas de qualidade genética-sanitária comprovada. Este trabalho teve como objetivo avaliar a taxa de sobrevivência de explantes no estabelecimento *in vitro*, bem como verificar o potencial de multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus*. Os porta-enxertos ‘Capdeboscq’, ‘GF677’ e ‘VP411’ foram introduzidos *in vitro* empregando-se ápices caulinares e gemas laterais como explantes e, submetidos as fases de estabelecimento e multiplicação *in vitro* em meio de cultura de Lepoivre suplementado com BAP (0,5 mg.l<sup>-1</sup>). Verificou-se que a percentagem média de sobrevivência para os porta-enxertos foi 62,9% para ápices caulinares e 58,8% para gemas laterais. Ápices caulinares apresentaram 14,8% de contaminação e gemas laterais 29,8% para os porta-enxertos avaliados. O genótipo afetou significativamente as taxas de multiplicação *in vitro*. Os porta-enxertos ‘Capdeboscq’ e ‘VP411’ foram superiores ao ‘GF677’ em relação à variável número de brotos por explante, respectivamente com 14,7; 16,0 e 10,5. Para a variável altura média dos brotos os porta-enxertos ‘Capdeboscq’ e ‘GF677’ foram superiores a ‘VP411’, respectivamente com 9,3; 8,9 e 7,8 mm. O porta-enxerto ‘Capdeboscq’ foi superior a ‘GF677’ e ‘VP411’ na variável número de brotos > 20 mm.

**Termos para indexação:** fruticultura, *Prunus*, micropropagação, mudas.

## *IN VITRO* ESTABLISHMENT AND MULTIPLICATION OF *Prunus* ROOTSTOCKS

**ABSTRACT** – In the modern fruit production, the genetic and sanitary quality is very important to the success of the activity. For the peach tree culture, the

micropropagation techniques allow the clonal production of plants with high genetic quality. The present study aimed at to evaluate the explant survival rate during *in vitro* establishment period, as well to evaluate the *in vitro* multiplication potential of *Prunus* rootstocks. The rootstocks 'Capdeboscq', 'GF677' and 'VP411' were introduced *in vitro* using as explants apices and lateral buds, and Lepoivre's medium supplemented with BAP (0,5 mg.l<sup>-1</sup>). The mean values of explant survival for the rootstocks were 62,9% and 58,8%, for apices and lateral buds, respectively. Cultures of apices showed 14,8% and lateral buds 29,8% of contamination. The genotype significantly affected the *in vitro* multiplication rates. The rootstocks 'Capdeboscq', 'VP411' and 'GF677' showed respectively 14,7; 16,0 and 10,5 shoots/explant. As mean values for shoot height of the rootstocks 'Capdeboscq', 'GF677' and 'VP411' it was observed 9,3; 8,9 and 7,8 mm, respectively. The rootstock 'Capdeboscq' showed superior behavior as to the number of shoots larger than 20mm in respect to 'GF677' and 'VP411' rootstocks.

**Index terms:** fruit crop, peach tree, micropropagation, plant cuttings.

## INTRODUÇÃO

No Brasil, a cultura do pessegueiro apresenta uma grande importância econômica principalmente nas regiões Sul e Sudeste, ocupando uma área superior a 20 mil hectares, com uma produção estimada de 150 mil toneladas (Sachs e Campos, 1998). O Estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor nacional, com uma área de 11,86 mil hectares e uma produção de 53 mil toneladas de frutos. Santa Catarina é o segundo Estado em área e o terceiro em produção, com aproximadamente 4,5 mil hectares e 39 mil toneladas de frutos (Epagri, 2001).

Na cultura do pessegueiro, um sistema de manejo moderno e tecnificado pode ser determinante para a produção, qualidade dos frutos, e conseqüentemente, uma alta produtividade. Neste contexto, a muda é um insumo básico de fundamental importância para a obtenção de pomares uniformes, adaptados ao ambiente e com alta

produtividade (Fachinello, 2000).

No sistema de produção de mudas de pessegueiro utilizado no Brasil, o porta-enxerto é obtido de semente, geralmente da indústria de conserva. Desta forma, ocorrem misturas varietais, ocasionando desuniformidade de plantas, morte precoce e, principalmente falta de uniformidade genética (Fachinello, 2000).

Na propagação vegetativa por estaquia, a principal limitação é a baixa capacidade de enraizamento para a maioria das cultivares de pessegueiro (Chalfun e Hoffmann, 1997), aliada ao forte efeito genotípico, com resultados variáveis de acordo com as cultivares utilizadas (Fachinello *et al.*, 1994; Rufato e Kersten, 2000).

As tecnologias de cultura *in vitro* permitem propagar espécies de difícil multiplicação pelos métodos clássicos, com obtenção de um material de alta qualidade genética e sanitária (Sansavini, 1989). Para o gênero *Prunus*, o sucesso no estabelecimento e multiplicação *in vitro* foi descrito por vários autores, entre eles, Hammerschlag *et al.* (1987); Radice *et al.* (1999); Pérez-Tornero e Burgos, (2000).

No entanto, a nível de Brasil, poucos são os trabalhos desenvolvidos para a micropropagação do gênero *Prunus*, especialmente para o pessegueiro. Recentemente, Rodrigues *et al.* (1999) e Silveira *et al.* (2001) demonstraram as dificuldades em estabelecer e multiplicar *in vitro* diferentes porta-enxertos de *Prunus*.

Este trabalho objetivou desenvolver metodologias de estabelecimento e multiplicação *in vitro*, visando a propagação clonal dos porta-enxertos de *Prunus* 'Capdeboscq', 'GF677' e a seleção 'VP411'.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

Os porta-enxertos 'Capdeboscq' (*Prunus persica* (L.) Batsch), 'GF677' (*Prunus amygdalus* x *Prunus persica*) e a seleção da variedade de Capdeboscq 'VP411' (porta-enxerto obtido pela Vitroplanta – Biotecnologia Ltda) foram estabelecidos *in vitro* de plantas matrizes mantidas em casa de vegetação no Departamento de Fitotecnia, CCA/UFSC e na sede da Vitroplanta em Videira (SC).



### **Estabelecimento *in vitro***

Os experimentos de cultura *in vitro* foram realizados no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, Departamento de Fitotecnia, CCA, UFSC. Das plantas matrizes foram coletados brotos com crescimento ativo, seccionados em segmentos de três a quatro gemas, sendo submetidos ao seguinte processo de desinfestação: lavagem em água e detergente (10 gotas.l<sup>-1</sup>-Tween 20), posteriormente, sob agitação por 1 minuto em etanol 70%, 15 minutos em hipoclorito de sódio (1,25%) e, finalmente, em câmara de fluxo laminar, três lavagens com água destilada autoclavada.

Os ápices caulinares e gemas laterais foram inoculados em tubos de ensaio (25x150 mm) contendo 10 ml de meio de cultura composto de sais e vitaminas de Lepoivre (Quoirin *et al.*, 1977), suplementado com sacarose (20 g.l<sup>-1</sup>), ágar (7 g.l<sup>-1</sup>) e benzilaminopurina (BAP) (0,5 mg.l<sup>-1</sup>).

Após 30 dias, ápices caulinares e gemas laterais foram avaliados quanto ao índice de sobrevivência e contaminação.

### **Multiplicação *in vitro***

O material vegetal foi multiplicado, com subculturas a cada 21 dias, através de segmentos nodais com 4-5 gemas (1-2 cm), desprovidos dos ápices caulinares, no mesmo meio de cultura citado anteriormente na fase de estabelecimento.

Na terceira subcultura *in vitro*, após 28 dias de cultivo, os dados referentes à multiplicação *in vitro* dos porta-enxertos foram avaliados quanto ao número de brotos por explante, altura média das brotações (mm) e número de brotos >20 (mm) por explante.

### **Condições de cultura *in vitro***

Para as diferentes fases da cultura, todos os componentes do meio de cultura foram adicionados antes da autoclavagem à 121°C durante 15 minutos. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,2-5,3 antes da autoclavagem. O material vegetal foi mantido em câmara de crescimento com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 16

horas e intensidade luminosa de  $40\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , fornecidas por lâmpadas fluorescentes brancas frias.

### **Análises estatísticas**

O delineamento experimental foi o inteiramente ao acaso, com cinco explantes por repetição e cinco repetições por tratamento. Os dados da fase de multiplicação *in vitro* foram submetidos à análise de Variância (ANOVA) e ao teste de separação de médias SNK (5%), de acordo com Sokal e Rohlf (1995).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Estabelecimento *in vitro***

Os valores observados para os diferentes explantes no estabelecimento *in vitro* dos três porta-enxertos estão apresentados na **Tabela 1**. As percentagens médias de sobrevivência de ápices caulinares e gemas laterais foram, respectivamente, de 62,9% e 58,8%. Estes resultados podem ser considerados eficientes para o estabelecimento *in vitro* de *Prunus* e estão dentro das faixas de sobrevivência de 27% a 93% obtidas por Hammerschlag (1982), no estabelecimento *in vitro* de 11 cultivares de pessegueiro.

Ápices caulinares e gemas laterais apresentaram, respectivamente, 14,8% e 29,8% de contaminação (**Tabela 1**). Os índices de contaminação observados podem ser considerados inferiores a outros estudos já realizados. Rodrigues *et al.* (1999), obtiveram taxas de 50 a 95,8% de contaminação no estabelecimento *in vitro* de seis porta-enxertos de *Prunus*. Estes autores constataram também maior contaminação de gemas laterais e um efeito significativo da resposta do genótipo na fase de estabelecimento *in vitro*. Hammerschlag (1982) observou maior ocorrência de contaminação (70%) em gemas dormentes, enquanto para brotos com crescimento ativo, a taxa de contaminação foi de 27%, no estabelecimento *in vitro* de duas cultivares de pêssego.

Pode-se destacar que a metodologia usada neste trabalho para introdução e estabelecimento *in vitro* com explantes originários de plantas matrizes mantidas em

casa de vegetação, com controle sanitário e nutricional, tem permitido bons resultados no estabelecimento *in vitro* para Prunáceas e outras fruteiras lenhosas, com baixos índices de agentes contaminantes (Figuras 4a e b).

### **Multiplicação *in vitro***

Foi observado que os explantes, já na primeira subcultura, apresentaram alto potencial de multiplicação *in vitro*. O genótipo apresentou efeito altamente significativo em relação ao número de brotos, altura média dos brotos e ao número de brotos > 20 mm por explante (Figura 4).

Os porta-enxertos 'VP411', 'Capdeboscq' e 'GF677' apresentaram 16,0; 14,7 e 10,5 brotos por explantes, respectivamente. Observou-se que os porta-enxertos 'VP411' e 'Capdeboscq' não diferiram significativamente entre si, mas foram diferentes e superiores ao 'GF677' (Figura 1). Estes resultados foram superiores aos obtidos por Parfitt e Almehdi (1986), que avaliaram a taxa de multiplicação *in vitro* de 56 cultivares e observaram uma variação de 1,3 a 9,9 brotos por explante, com a utilização do meio de cultura AP suplementado com 6,0 mg.l<sup>-1</sup> de BAP e 0,01 mg.l<sup>-1</sup> de IBA. A utilização do meio de cultura de Lepoivre mostrou-se adequada para a multiplicação destes porta-enxertos. O meio de cultura, o tipo e a concentração dos reguladores tem sido determinantes nas taxas de multiplicação *in vitro* de diferentes genótipos do gênero *Prunus* (Arena e Caso, 1992; Pérez-Tornero e Burgos, 2000, Pérez-Tornero *et al.*, 2000).

Para a altura média dos brotos (mm), os porta-enxertos 'Capdeboscq' (9,3 mm) e 'GF677' (8,9 mm) demonstraram maior crescimento, diferindo significativamente da seleção 'VP411' (7,8 mm) (Figura 2). A altura média dos brotos é uma variável determinada principalmente pela concentração e tipo do regulador de crescimento (Harada e Murai, 1996; Leontiev-Orlov *et al.*, 2000a), meios de cultura (Arena e Caso, 1992), genótipo (Parfitt e Almehdi, 1986; Arena e Caso, 1992; Leontiev-Orlov *et al.*, 2000b), entre outros.

Em relação ao número de brotos maiores que 20 mm por explante, o porta-enxerto 'Capdeboscq' apresentou 2,04 brotos, sendo significativamente superior aos porta-enxertos 'VP411' com 1,3 e 'GF677' com 1,0 (Figura 3). Esta variável é de

grande importância para a próxima fase da micropropagação (enraizamento), porém a obtenção de brotos aptos para o enraizamento, maiores que 20 mm, têm sido um problema para algumas espécies do gênero *Prunus* (Harada e Murai, 1996; Leontiev-Orlov *et al.*, 2000a e b). Entretanto, para outros (Arena e Caso, 1992; Pérez-Tornero, 2000), como em nosso estudo, este problema não ocorreu. Além disso, a utilização, em nosso estudo, do meio de cultura *dupla-fase* elevou o número de brotos aptos ao enraizamento (dados não apresentados).

Os resultados obtidos demonstraram e confirmaram estudos prévios de uma resposta dependente do genótipo para porta-enxertos de pessegueiro e outras espécies de *Prunus*, com respeito ao meio de cultura (Hammerschlag, 1982; Parfitt e Almehti, 1986; Leontiev-Orlov *et al.*, 2000b; Pérez-Tornero e Burgos, 2000). Isto pode ser devido à necessidade de diferentes níveis de reguladores, interações entre reguladores e sais no meio de cultura (Rogalski *et al.*, 1999; Pérez-Tornero e Burgos, 2000, Pérez-Tornero *et al.*, 2000). Algumas cultivares podem ter maior necessidade de hormônios endógenos, e apresentar menor eficiência na absorção do meio de cultura ou diferentes níveis de produção de hormônios em cultura (Parfitt e Almehti, 1986). Porém, os resultados obtidos mostraram que estes porta-enxertos podem ser multiplicados e mantidos no meio de cultura utilizado nesse estudo.

Em ensaios preliminares (dados não apresentados) revelaram que a formulação salina de Lepoivre (Quoirin *et al.*, 1977) mostrou-se superior ao meio MS (Murashige e Skoog, 1962) para os parâmetros avaliados. As principais diferenças entre as duas formulações estão associadas a redução da concentração de nitrogênio total, a redução de íons  $\text{NH}_4^+$ , o aumento de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e a ausência de íons  $\text{Cl}^-$  no meio de cultura de Lepoivre. Estes aspectos tem demonstrado resultados positivos para a cultura *in vitro* de diferentes espécies do gênero *Prunus*, como aumento das taxas de multiplicação e diminuição de brotos hiperhídricos (Bouza *et al.*, 1992; Murai *et al.*, 1997; Pérez-Tornero *et al.*, 1999; Pérez-Tornero e Burgos, 2000; Pérez-Tornero *et al.*, 2000).

## CONCLUSÕES

- 1 O meio de cultura de Lepoivre mostrou-se eficaz para as fases de estabelecimento e multiplicação *in vitro* dos porta-enxertos testados.
- 2 O estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* pôde ser realizado com ápices caulinares, bem como com gemas laterais.
- 3 O genótipo apresentou efeito altamente significativo.
- 4 Os porta-enxertos 'Capdeboscq' 'VP411' e 'GF677' demonstraram alto potencial para a propagação *in vitro*, apresentando 14,7 16,0 e 10,5 brotos por explantes, respectivamente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARENA, M.E.; CASO, O.H. Factores que afectan la multiplicación *in vitro* de los brotes de portainjertos de *Prunus*, *PHYTON*, Buenos Aires, v.53, p.29-38, 1992.
- BOUZA, L.; JACQUES, M.; MAZIÈRE, Y.; ARNAUD, Y. *In vitro* propagation of *Prunus tenella* Batsch. cv. 'Firehill': control of vitrification; increase of the multiplication rate and growth by chilling, *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.52, p.143-155, 1992.
- CHALFUN, N.N.G.; HOFFMANN, A. Propagação do pessegueiro e da ameixeira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, p.23-29, 1997.
- EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA S.A. (Epagri). **Frutas de Clima Temperado: Situação da safra 1999/2000, Previsão da safra 2000/2001**. Videira: Epagri, 2001. 21p.
- FACHINELLO, J.C. Problemática das mudas de plantas frutíferas de caroço. In: I SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE FRUTAS DE CAROÇO: PÊSSEGOS, NECTARINAS E AMEIXAS, 1., 2000, Porto Alegre. **Anais...** p.25-40.
- FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; FORTES, G.R. de L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Pelotas/RS: Editora UFPel, 1994.179p.

- HAMMERSCHLAG, F. Factors affecting establishment and growth of peach shoots *in vitro*, **HortScience**, v.17, n.1, p.85-86, 1982.
- HAMMERSCHLAG, F.A.; BAUCHAN, G.R.; SCORZA, R. Factors influencing *in vitro* multiplication and rooting of peach cultivars, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.8, p.235-242, 1987.
- HARADA, H.; MURAI, Y. Micropropagation of *Prunus mume*, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.46, p.265-267, 1996.
- LEONTIEV-ORLOV, O.; MOSSI, A. J.; CANSIAN, R.L.; ROGALSKI, M.; VENDRUSCOLO, T. Diferentes reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de ameixeira (*Prunus domestica* L.) cultivar Kantimirovskaja, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n.2, p.268-271, 2000a.
- LEONTIEV-ORLOV, O.; ROGALSKI, M.; MOSSI, A.J.; CANSIAN, R.L. 6-Benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de prunáceas (*Prunus* sp.). **Revista Brasileira de Agrocência**, Pelotas, v.6, p.63-67, 2000b.
- MURAI, Y.; HARADA, H.; YAMASHITA, H. *In vitro* propagation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cv. 'Bakuoh Junkyou', **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Tokyo, v.66, p. 475-480, 1997.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- PARFITT, D.E.; ALMEHDI, A.A. *In vitro* propagation of peach: II. A medium for *in vitro* multiplication of 56 peach cultivars, **Fruit Varieties Journal**, v.40, n.2, p.46-47, 1986.
- PÉREZ-TORNERO, O.; BURGOS, L. Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.63, p.133-141, 2000.
- PÉREZ-TORNERO, O.; BURGOS, L.; EGEA, J. Introduction and establishment of apricot *in vitro* through regeneration of shoots from meristem tips, **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, v.35, p.249-253, 1999.
- PÉREZ-TORNERO, O.; LÓPEZ, J.M.; EGEA, J.; BURGOS, L. Effect of basal media and growth regulators on the *in vitro* propagation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cv.

Canino, **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 75, n.3, p.283-286, 2000.

QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P.; BOXUS, P. Un premier bilan de 10 années de recherches sur les cultures de méristèmes et la multiplication *in vitro* de fruitiers ligneux. **C.R. Rech. Agron.** Gembloux, p.93-117, 1977.

RADICE, S.; PERELMAN, P.E.; CASO, O.H. Propagación clonal de tres portainjertos del género *Prunus* para la Pampa Deprimida, **ΦYTON**, Buenos Aires, v.64, p.149-156, 1999.

RODRIGUES, A.C.; FACHINELLO, J.C.; STRELOW, E.; FORTES, G.R. de L. Estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* sp., **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.21, n.2, p.229-231, 1999.

ROGALSKI, M.; LEONTIEV-ORLOV, O.; MOSSI, A.J.; CANSIAN, R.L. Efeito de diferentes concentrações de benziladenina (BA) e macroíons na multiplicação *in vitro* de ameixeira (*Prunus domestica* L. – var. Kantimirovskaja). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 45., 1999, Gramado. **Anais...**p.714.

RUFATO, L.; KERSTEN, E. Enraizamento de estacas de pessegueiro (*Prunus persica* (L.) Batsch), cvs esmeralda e Br2, submetidas à estratificação e ao ácido indolbutírico, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.22, n.2, p.191-194, 2000.

SACHS, S.; CAMPOS, A.D. O Pessegueiro, In: MEDEIROS, C.A.B.; RASEIRA, M.C.B. **A cultura do pessegueiro**. 1 ed. Pelotas: Embrapa-CPACT, 1998, volume único, 1, p.13-19.

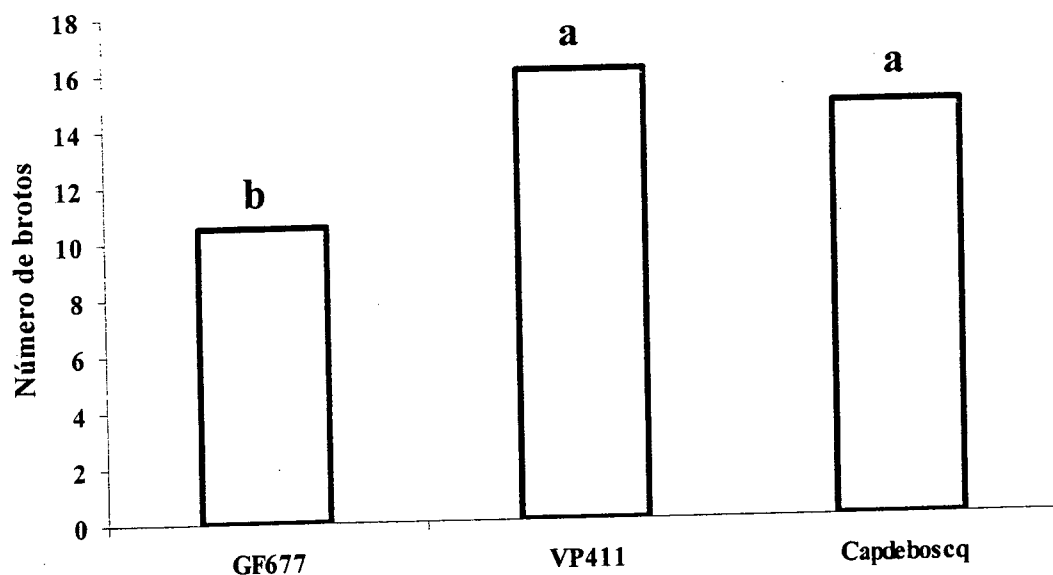
SANSAVINI, S. Biotechnology and fruit growing. **Fruit Varieties Journal**, v.43, n.2, p.75-84, 1989.

SILVEIRA, C.A.P.; FACHINELLO, J.C.; FORTES, G.R. de L.; CITADIN, I.; RODRIGUES, A.C.; QUEZADA, A.C.; SILVA, J.B. da. Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos do género *Prunus* sob diferentes concentrações de BAP em dois meios de cultura, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.3, p.488-492, 2001.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**. New York: W.H. Freeman and Company, 1995.

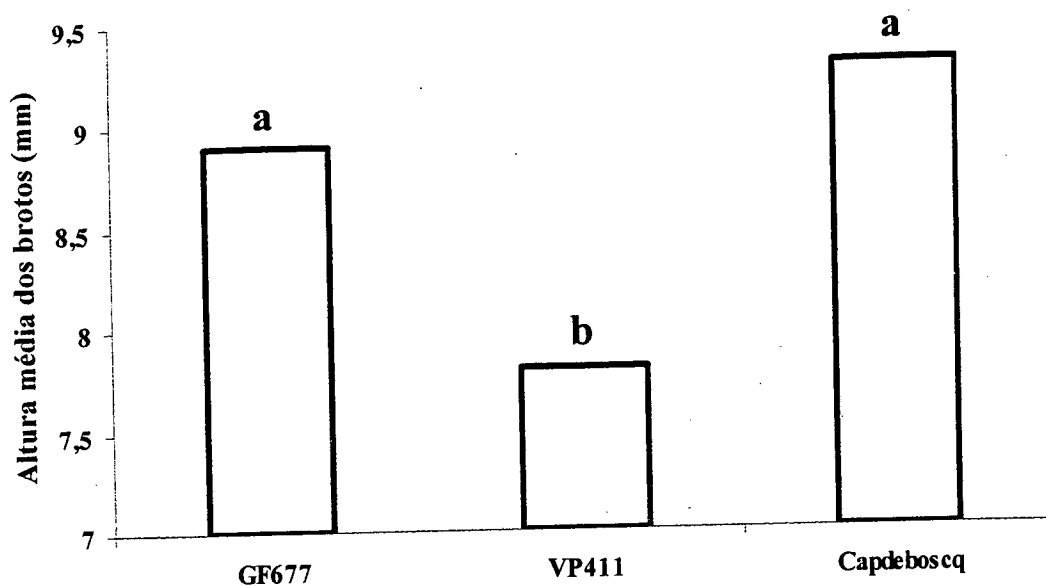
**TABELA 1.** Valores observados para o estabelecimento *in vitro* dos porta-enxertos de *Prunus* ‘GF677’, ‘VP411’ e ‘Capdeboscq’. Efeito do explante na percentagem de sobrevivência e contaminação. UFSC, Florianópolis-SC, 2002.

Porta-enxertos	Total		Sobrevivência (%)		Contaminação (%)	
	Ápices caulinares	Gemas laterais	Ápices caulinares	Gemas laterais	Ápices caulinares	Gemas laterais
GF677	5	17	100,0	58,8	0,0	41,2
VP411	3	24	33,3	54,2	33,3	41,6
Capdeboscq	9	30	55,5	63,3	11,1	6,6
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>71</b>	<b>62,9</b>	<b>58,8</b>	<b>14,8</b>	<b>29,8</b>

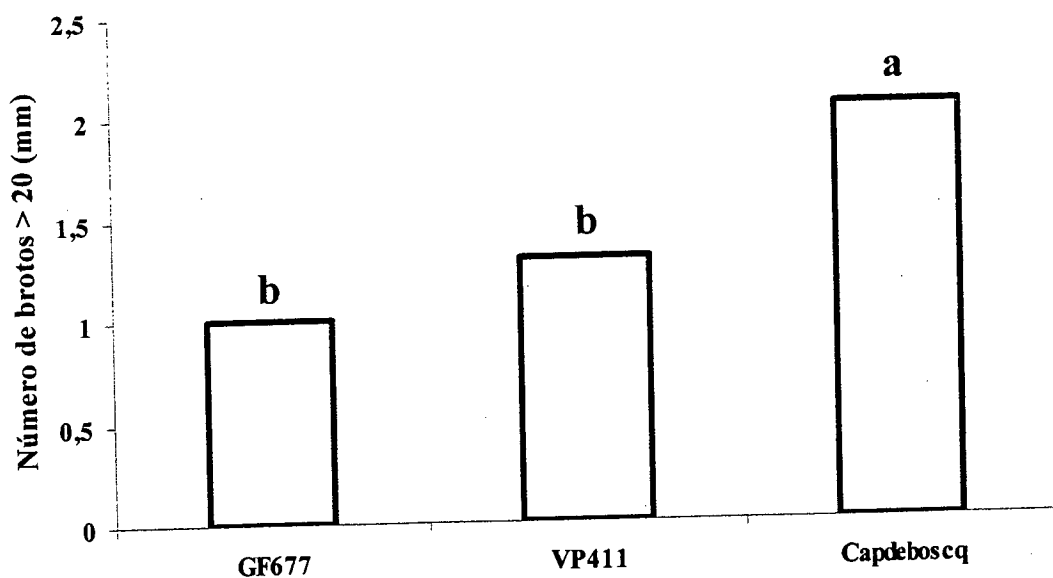


**FIGURA 1.** Número de brotos por explante para os porta-enxertos de *Prunus* ‘GF677’, ‘VP411’ e ‘Capdeboscq’, após 28 dias de cultura em meio de cultura de Lepoivre suplementado com BAP (0,5 mg.l<sup>-1</sup>), n=5 e SNK (0,05). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.

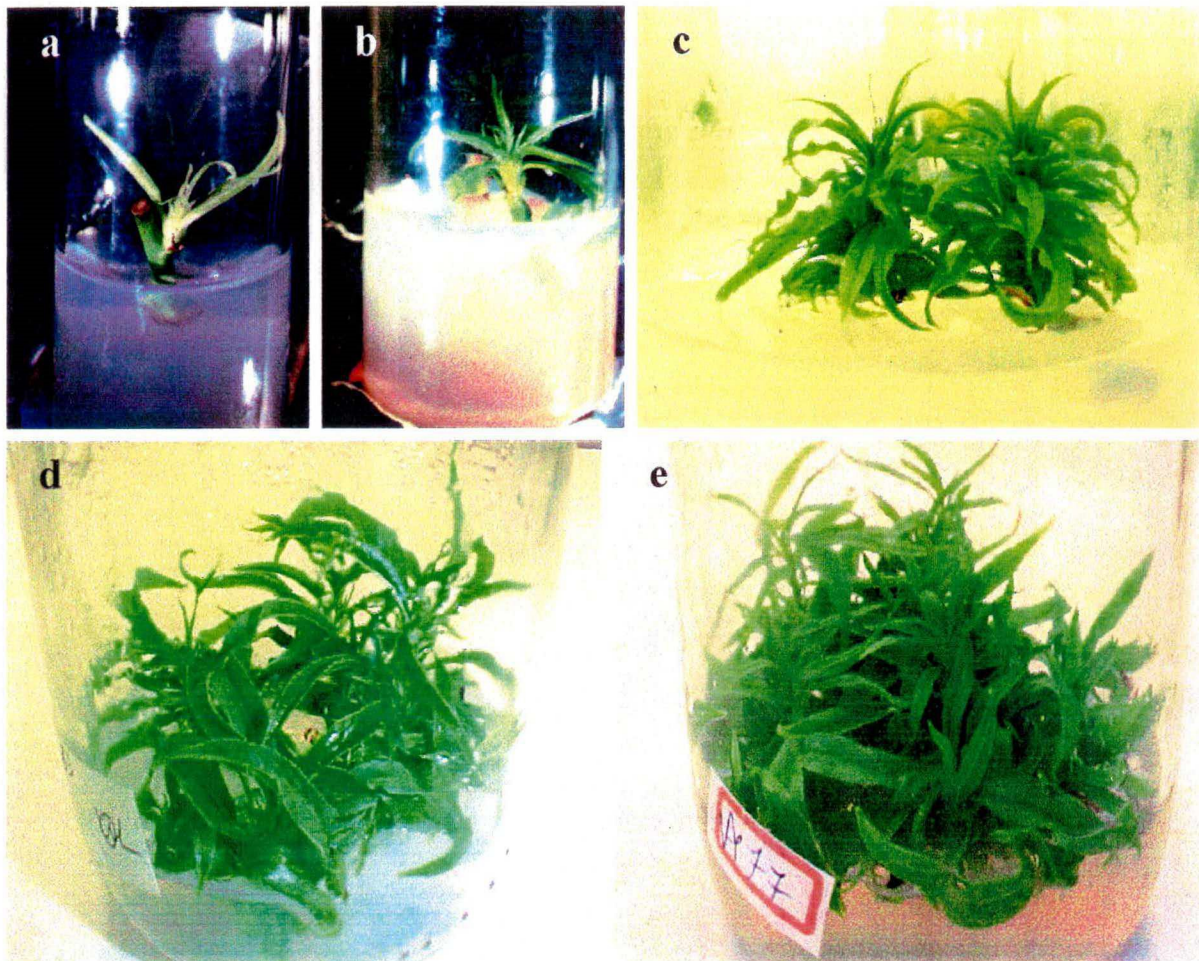




**FIGURA 2.** Altura média dos brotos (mm), para os porta-enxertos de *Prunus* 'GF677', 'VP411' e 'Capdeboscq', após 28 dias de cultura em meio de cultura de Lepoivre suplementado com BAP ( $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ ),  $n=5$  e SNK (0,05). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.



**FIGURA 3.** Número de brotos > 20 mm para os porta-enxertos de *Prunus* 'GF677', 'VP411' e 'Capdeboscq', após 28 dias em meio de cultura de Lepoivre suplementado com BAP ( $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ ),  $n=5$  e SNK (0,05). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.



**FIGURA 4.** Aspectos morfogênicos no estabelecimento e multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus*. a) gema lateral. b) ápice caulinar. c) primeira subcultura. d) segunda subcultura. e) explante em multiplicação. UFSC, Florianópolis-SC, 2002.

## EFEITO DE DIFERENTES CITOCININAS NA MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DO PORTA-ENXERTO DE *Prunus* 'CAPDEBOSCQ'

**RESUMO** – No Brasil, os porta-enxertos para prunáceas são obtidos de sementes, geralmente originários da indústria de conserva, sem uniformidade genética. A micropropagação permite a obtenção de mudas geneticamente uniformes, porém, torna-se necessário otimizar as condições de cultura *in vitro*. As citocininas são indispensáveis para a quebra de dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares, influenciando no sucesso da fase de multiplicação *in vitro*. O objetivo deste estudo foi avaliar o índice de sobrevivência de ápices caulinares e gemas laterais no estabelecimento *in vitro* e, verificar o efeito de diferentes citocininas na multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de *Prunus* 'Capdeboscq'. Ápices caulinares e gemas laterais foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura de Lepoivre, suplementado de BAP ( $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Após duas subculturas do processo de estabelecimento *in vitro*, segmentos nodais com 1-2 cm foram submetidos aos tratamentos com KIN, 2iP e BAP, nas concentrações de 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0  $\text{mg.l}^{-1}$ . Os resultados mostraram que na fase de estabelecimento *in vitro*, ápices caulinares apresentaram maior sobrevivência, menor contaminação e ausência de hiperhidricidade. A citocinina BAP proporcionou as maiores taxas de multiplicação. O maior número de brotos por explante foi obtido na concentração de  $1,5 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP. As diferentes citocininas não apresentaram diferenças quanto à altura, porém os melhores resultados foram obtidos na concentração de  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ . Para o número de brotos  $> 20 \text{ mm}$ , os melhores resultados foram obtidos com BAP na concentração de  $0,8 \text{ mg.l}^{-1}$ .

**Termos para indexação:** Fruticultura, pessegueiro, multiplicação *in vitro*, reguladores de crescimento, citocininas.

## EFFECT OF DIFFERENT CYTOKININS ON *in vitro* MULTIPLICATION OF *Prunus* ROOTSTOCK 'CAPDEBOSQ'

**ABSTRACT** – In Brazil, the *Prunus* rootstocks are obtained from seeds generally originated from the peach industry, without genetic fidelity. The micropropagation techniques allow to obtain plantlets genetically equals. However, it is necessary to improve the *in vitro* culture conditions. The cytokinins are indispensable to break apical dominance as well as for the induction of axial bud proliferation, influencing in the success on *in vitro* multiplication. This work aimed at to evaluate the survival rate of apexes and lateral buds as explants during *in vitro* establishment phase and to verify the effect of cytokinins on *in vitro* multiplication of the *Prunus* rootstock 'Capdeboscq'. Apexes and lateral buds were inoculated in glass tubes (25x150mm) containing 10 ml of Lepoivre's medium supplemented with BAP (0,5 mg.l<sup>-1</sup>). After two subcultures, nodal segments (1-2 cm long) were transferred to culture media supplemented with KIN, 2iP e BAP (0,1; 0,5; 1,0 and 2,0 mg.l<sup>-1</sup>). The results showed that in the establishment phase, apexes showed high survival rate, low contamination and hyperhydricity. The cytokinin BAP was the best one for multiplication presenting the highest shoots rate proliferation. The highest number of shoots/explant resulted from the level of 1,5 mg.l<sup>-1</sup> of BAP. The cytokinins treatments didn't present differences regarding the shoot height, but the best results were obtained with the concentration of 0,1 mg.l<sup>-1</sup> BAP. In respect to the number of shoots larger than 20mm, the best results were obtained as the culture medium was supplemented with BAP (0,8 mg.l<sup>-1</sup>).

**Index terms:** fruit crop, peach tree, *in vitro* multiplication, growth regulators, cytokinins.

## INTRODUÇÃO

A cultura do pessegueiro ocupa uma área no Brasil superior a 20 mil hectares, com produção anual que ultrapassa a 150 mil toneladas (Sachs e Campos, 1998).

No Brasil, o processo de produção de mudas para prunáceas é feito por enxertia sobre porta-enxertos obtidos de sementes provenientes da indústria de conserva. Neste processo, pela falta de controle ocorrem misturas varietais, ocasionando desuniformidade de plantas, morte precoce e principalmente falta de garantia de identidade genética (Fachinello, 2000).

O sucesso da fruticultura moderna e tecnificada depende da utilização de mudas de boa qualidade (Fachinello, 2000). Segundo Sansavini (1989), as tecnologias de cultura *in vitro* permitem clonar espécies de difícil multiplicação, obtendo assim materiais de propagação com alta qualidade genética e sanitária.

Para Pérez-Tornero *et al.* (2000), a micropropagação tem sido utilizada para produção de mudas frutíferas desde o final da década de 70. Inicialmente, para poucas culturas, como o morango e a amora, e posteriormente para várias fruteiras lenhosas, como porta-enxertos de pessegueiro (Zimmerman e Debergh, 1991). O sucesso na utilização da técnica de micropropagação em prunáceas é relatado por vários autores (Quoirin *et al.*, 1977; Ambrozic-Turk *et al.*, 1991; Radice *et al.*, 1999; Pérez-Tornero e Burgos, 2000; Pérez-Tornero *et al.*, 2000).

Apesar de existirem protocolos para propagação de diversas espécies de interesse comercial, é necessário otimizar as condições de cultura *in vitro* para a maioria delas, especialmente as lenhosas. Para otimizar o potencial biológico da cultura, é necessário investigar sob todos os aspectos as condições *in vitro*. Os reguladores de crescimento são de grande importância para o sucesso da micropropagação e, na fase de multiplicação, as citocininas são indispensáveis para a quebra de dominância apical, indução e proliferação de gemas axilares.

Na micropropagação do gênero *Prunus*, o tipo e a concentração de citocinina são fatores determinantes, principalmente em relação aos parâmetros de taxa de multiplicação (Pérez-Tornero *et al.*, 2000), alongamento de brotações (Leontiev-Orlov

*et al.*, 2000a), resposta genotípica (Leontiev-Orlov *et al.*, 2000b; Pérez-Tornero e Burgos, 2000) e hiperhidricidade (Ambrozic-Turk *et al.*, 1991).

O objetivo deste estudo foi avaliar as taxas de sobrevivência no estabelecimento *in vitro*, assim como, avaliar as taxas de multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* (*Prunus persica* (L.) Batsch) ‘Capdeboscq’ em resposta a diferentes tipos e níveis de citocininas adicionadas ao meio de cultura.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Material vegetal

Os explantes foram coletados de plantas matrizes de pessegueiro ‘Capdeboscq’ (obtidas da Estação Experimental da Epagri, Videira –SC), mantidas e controladas através de um sistema de fertirrigação em casa de vegetação, no viveiro de mudas do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias da UFSC.

### Estabelecimento *in vitro*

Brotações em crescimento ativo foram coletadas, seccionadas em segmentos com três a quatro gemas e submetidas ao processo de desinfestação. Essas brotações foram lavadas com água e detergente (Tween 20 – 10 gotas.l<sup>-1</sup>), posteriormente submetidas, sob agitação, por 1 minuto em etanol 70%, 15 minutos em hipoclorito de sódio (1,25%) e, finalmente, em câmara de fluxo laminar a três lavagens com água destilada autoclavada.

Ápices caulinares e gemas laterais foram inoculados em tubos de ensaio (25x150 mm) contendo 10 ml de meio de cultura, sais e vitaminas de Lepoivre (Quoirin *et al.*, 1977), suplementado com sacarose 20,0 g.l<sup>-1</sup>, ágar 7,0 g.l<sup>-1</sup> e 0,5 mg.l<sup>-1</sup> de benzilaminopurina (BAP). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,2-5,3 antes da autoclavagem realizada a 121°C durante 15 minutos.

Após 30 dias de cultura, gemas laterais e ápices caulinares foram avaliados quanto a percentagem de sobrevivência, hiperhidricidade e contaminação. O

delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso, com cinco ápices caulinares e gemas laterais por repetição e cinco repetições por tratamento.

### **Multiplicação *in vitro***

Para avaliar a multiplicação *in vitro*, três citocininas foram testadas: 6-furfurilaminopurina (KIN), isopenteniladenina (2iP) e 6-benzilaminopurina (BAP) nas concentrações de 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 mg.l<sup>-1</sup>. Após duas subculturas, a cada 21 dias, segmentos nodais com 1-2 cm (4-5 gemas), desprovidos dos ápices caulinares, foram inoculados no meio de cultura de Lepoivre modificado, descrito na fase de estabelecimento.

Após 30 dias de cultivo, o experimento foi avaliado quanto ao número de brotos por explante, altura média das brotações (mm) e número de brotos maiores que 20 mm. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente ao acaso, com cinco explantes por repetição e cinco repetições por tratamento.

### **Condições de cultura *in vitro***

O material vegetal foi mantido em câmara de crescimento com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, fornecidas por lâmpadas fluorescentes brancas frias.

### **Análises estatísticas**

Os dados médios totais referentes ao efeito das citocininas e concentrações foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), teste de separação de médias SNK (5%), e os dados do efeito das concentrações dentro de cada citocinina foram submetidos à Análise de Regressão Polinomial, de acordo com Sokal e Rohlf (1995).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Estabelecimento *in vitro*

Os resultados do efeito do tipo de explante no estabelecimento *in vitro* do pessegueiro 'Capdeboscq' são apresentados na **Figura 1**. Verificou-se que taxa de sobrevivência e contaminação foram afetadas significativamente pelo tipo de explante utilizado. Ápices caulinares apresentaram maior taxa de sobrevivência (52%) e menor taxa de contaminação (12 %) em relação às gemas laterais com sobrevivência de 20% e contaminação de 28 %. Estes resultados podem ser considerados eficazes para o estabelecimento *in vitro* de *Prunus* e estão de acordo, com as taxas de sobrevivência (27% a 93%), obtidas por Hammerschlag (1982), no estabelecimento *in vitro* de 11 cultivares de pessegueiro. Os valores de contaminação para o gênero *Prunus* são semelhantes aos citados na literatura, 4,5 a 27,1% (Pevalek-Kozlina e Jelaska, 1987). Estas autoras observaram efeitos significativos do genótipo, idade da planta matriz, tipo e origem do explante e composição do meio de cultura. Para a variável percentagem de hiperhidricidade não ocorreram diferenças significativas entre ápices caulinares e gemas laterais, porém ápices caulinares não apresentaram hiperhidricidade, e em gemas laterais esta ocorreu em 8% dos explantes.

O método mais amplamente utilizado para o estabelecimento *in vitro* é o uso de segmentos nodais, porém, em prunáceas esta técnica normalmente resulta em uma alta taxa de contaminação, existindo em alguns casos, a necessidade do uso da cultura de meristemas para solucionar ou amenizar este problema (Rodrigues *et al.*, 1999; Pérez-Tornero *et al.*, 1999).

O processo utilizado neste trabalho, mantendo as plantas matrizes em casa de vegetação, com controle sistemático de patógenos, permitiu com sucesso o estabelecimento *in vitro* do pessegueiro 'Capdeboscq' (**Figura 7**). Esta metodologia, já em uso prático no LBMV/CCA/UFSC, tem diminuído expressivamente as taxas de contaminação e morte de explantes no estabelecimento *in vitro* de diferentes espécies de frutíferas.



### Efeito de citocininas na multiplicação *in vitro*

O número de brotos por explante foi significativamente afetado pelo tipo de citocinina, pela concentração e pela interação citocinina x concentração. O BAP foi superior, diferindo significativamente de KIN e 2iP, que não diferiram significativamente entre si (**Figura 2**). Observa-se um acréscimo no número de brotos por explante com o aumento da concentração de citocininas (**Figura 3**). Resultados superiores de BAP na indução de brotos, em relação a outras citocininas, tem sido relatados em outras espécies do gênero *Prunus* (Ambrozic-Turk *et al.*, 1991; Leontiev-Orlov *et al.*, 2000a).

O maior número de brotos (25,9) foi obtido com a concentração de 1,5 mg.l<sup>-1</sup> de BAP (**Figura 3**). Estes resultados foram semelhantes aos observados por Arena e Caso (1992), que obtiveram uma variação de 5,0 a 37 brotos por explantes utilizando concentrações de 0,5 a 1,0 mg.l<sup>-1</sup> de BAP, na multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus*. Estes autores salientaram ainda, um efeito significativo da composição orgânica do meio de cultura, da concentração e associação de reguladores de crescimento, e do genótipo. Conforme Zimmerman e Scorza (1994), a concentração de 2,27 mg.l<sup>-1</sup> de BAP resultou na maior taxa de multiplicação de brotos em três genótipos de pessegueiro. No entanto, Hammerschlag *et al.* (1987) obtiveram uma maior taxa de multiplicação *in vitro* de pessegueiros com o uso de 4,0 mg.l<sup>-1</sup> de BAP, porém com a presença de necrose apical. Para estes autores, a redução da concentração de BAP para 2,0 mg.l<sup>-1</sup> permitiu o crescimento normal dos brotos.

A altura média dos brotos foi afetada somente pelo fator concentração. Observou-se que a altura média das brotações reduziu-se de 9,36 à 6,82 mm com o aumento da concentração das diferentes citocininas utilizadas (**Figura 2**), sendo este efeito observado nas diferentes citocininas (**Figura 4**). Estes resultados são similares aos de Ambrozic-Turk *et al.* (1991), Leontiev-Orlov *et al.* (2000a e b), Pérez-Tornero e Burgos (2000), Pérez-Tornero *et al.* (2000), que observaram que concentrações crescentes de citocininas inibiram o alongamento das brotações em Prunáceas. Para Leontiev-Orlov *et al.* (2000a) concentrações superiores a 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de BAP inibiram o tamanho das brotações em ameixeira. Entretanto, a utilização de diferentes concentrações de 2iP (0,1 a 1,5 mg.l<sup>-1</sup>) promoveu acréscimo na altura das brotações,

porém com formação de somente 1 a 2 brotos por explante. Porém, Harada & Murai (1996), para *Prunus mume*, observaram que o tamanho médio das brotações não foi influenciado pela concentrações de BAP, utilizada até 1,125 mg.l<sup>-1</sup>.

O número médio total de brotos >20 mm foi afetado somente pelo tipo de citocinina. BAP foi significativamente superior a KIN e 2iP, que não diferiram significativamente entre si (**Figura 3**). O maior número de brotos > 20 mm foi obtido através da equação de regressão na concentração de 0,8 mg.l<sup>-1</sup> de BAP com a presença de 1,39 brotos por explante (**Figura 6**). Estes resultados podem estar relacionados ao alto número de brotos (21,7) nesta concentração. No entanto, estão de acordo com os resultados de Arena e Caso (1992), que observaram um maior número de brotos com altura superior a 15 mm na concentração de 0,5 mg.l<sup>-1</sup> de BAP.

Observa-se que a citocinina BAP tem sido a mais utilizada para a multiplicação de *Prunus* (Hammerschlag, 1982; Harada e Murai, 1996; Radice *et al.*, 1999; Pérez-Tornero e Burgos, 2000; Leontiev-Orlov *et al.*, 2000b; Pérez-Tornero *et al.*, 2000). A maior atividade desta pode estar relacionada a estrutura química (Taiz e Zeiger, 1998). Entretanto, altas concentrações de BAP podem induzir à redução de alongamentos de brotos e hiperhidricidade em prunáceas (Ambrozic-Turk *et al.*, 1991; Arena e Caso, 1992; Harada e Murai, 1996; Pérez-Tornero e Burgos (2000).

Além disso, a concentração ótima de uma citocinina é altamente dependente do genótipo. Para Pérez-Tornero *et al.* (1999); Pérez-Tornero e Burgos, (2000), Pérez-Tornero *et al.* (2000), Leontiev-Orlov *et al.* (2000b), existe um efeito altamente significativo entre a concentração de BAP e o genótipo, na multiplicação *in vitro* de diferentes espécies do gênero *Prunus*. Outros fatores importantes na multiplicação *in vitro* são: a composição salina do meio de cultura e o tipo, a concentração do regulador utilizado (Bouza *et al.*, 1992; Rogalski *et al.*, 1999; Leontiev-Orlov *et al.*, 2000; Pérez-Tornero e Burgos, 2000; Pérez-Tornero *et al.*, 2000).

## CONCLUSÃO

- 1 A metodologia de estabelecimento e multiplicação *in vitro* mostrou-se eficaz para o porta-enxerto de *Prunus* 'Capdeboscq'.
- 2 BAP foi a citocinina mais eficaz para a multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* 'Capdeboscq' e o maior número de brotos (25,9) foi obtido na concentração de 1,5 mg.l<sup>-1</sup>.
- 3 O aumento da concentração das citocininas inibiu o alongamento das brotações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBROZIC-TURK, B.; SMOLE, J.; SIFTAR, A. Micropropagation of a plum ecotype (*Prunus domestica* L.) as rootstock for apricots, **Acta Horticulturae**, Leuven, v.300, p.111-114, 1991.
- ARENA, M.E.; CASO, O.H. Factores que afectan la multiplicación *in vitro* de los brotes de portainjertos de *Prunus*, **PHYTON**, Buenos Aires, v.53, p.29-38, 1992.
- BOUZA, L.; JACQUES, M.; MAZIÈRE, Y.; ARNAUD, Y. *In vitro* propagation of *Prunus tenella* Batsch. cv. 'Firehill': control of vitrification; increase of the multiplication rate and growth by chilling, **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.52, p.143-155, 1992.
- FACHINELLO, J.C. Problemática das mudas de plantas frutíferas de caroço. In: I SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE FRUTAS DE CAROÇO: PÊSSEGOS, NECTARINAS E AMEIXAS, 1., 2000, Porto Alegre. **Anais...** p.25-40.
- HAMMERSCHLAG, F. Factors affecting establishment and growth of peach shoots *in vitro*, **HortScience**, Alexandria, v.17, n.1, p.85-86, 1982.
- HAMMERSCHLAG, F.A.; BAUCHAN, G.R.; SCORZA, R. Factors influencing *in vitro* multiplication and rooting of peach cultivars, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.8, p.235-242, 1987.
- HARADA, H.; MURAI, Y. Micropropagation of *Prunus mume*, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.46, p.265-267, 1996.

LEONTIEV-ORLOV, O.; MOSSI, A. J.; CANSIAN, R.L.; ROGALSKI, M.; VENDRUSCOLO, T. Diferentes reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de ameixeira (*Prunus domestica* L.) cultivar Kantimirovskaja, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n.2, p.268-271, 2000a.

LEONTIEV-ORLOV, O.; ROGALSKI, M.; MOSSI, A.J.; CANSIAN, R.L. 6-Benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de prunáceas (*Prunus* sp.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.6, p.63-67, 2000b.

PÉREZ-TORNERO, O.; BURGOS, L. Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.63, p.133-141, 2000.

PÉREZ-TORNERO, O.; BURGOS, L.; EGEA, J. Introduction and establishment of apricot *in vitro* through regeneration of shoots from meristem tips, **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, v.35, p.249-253, 1999.

PÉREZ-TORNERO, O.; LÓPEZ, J.M.; EGEA, J.; BURGOS, L. Effect of basal media and growth regulators on the *in vitro* propagation of apricot (*Prunus armenica* L.) cv. Canino, **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 75, n.3, p.283-286, 2000.

PEVALEK-KOZLINA, B.; JELASKA, S. Microclonal propagation of *Prunus avium* L. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 212, p.599-602, 1987.

QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P.; BOXUS, P. Un premier bilan de 10 années de recherches sur les cultures de méristèmes et la multiplication *in vitro* de fruitiers ligneux. **C.R. Recherches. Agronomiques**. Gembloux, p.93-117, 1977.

RADICE, S.; PERELMAN, P.E.; CASO, O.H. Propagación clonal de tres portainjertos del género *Prunus* para la Pampa Deprimida, **PHYTON**, Buenos Aires, v.64, p.149-156, 1999.

RODRIGUES, A.C.; FACHINELLO, J.C.; STRELOW, E.; FORTES, G.R. de L. Estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* sp., **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.21, n.2, p.229-231, 1999.

ROGALSKI, M.; LEONTIEV-ORLOV, O.; MOSSI, A.J.; CANSIAN, R.L. Efeito de diferentes concentrações de benziladenina (BA) e macroíons na multiplicação *in vitro*

de ameixeira (*Prunus domestica* L. – var. Kantimirovskaja). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 45., 1999, Gramado. **Anais...**p.714.

SACHS, S.; CAMPOS, A.D. O Pessegueiro, In: MEDEIROS, C.A.B.; RASEIRA, M.C.B. **A cultura do pessegueiro**. 1 ed. Pelotas: Embrapa-CPACT, 1998, volume único, 1, p.13-19.

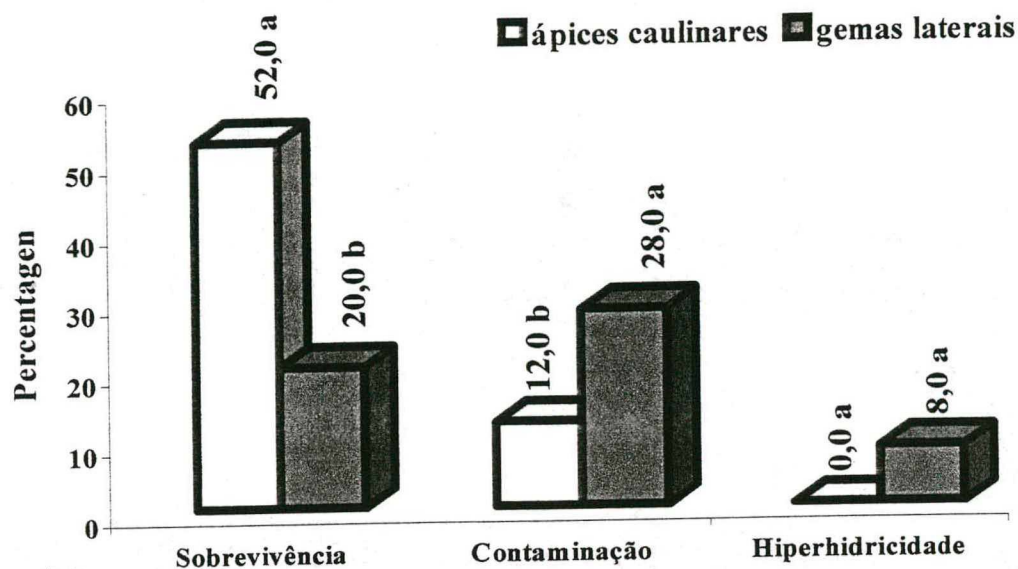
SANSAVINI, S. Biotechnology and fruit growing. **Fruit Varieties Journal**, v.43, n.2, p.75-84, 1989.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**. New York: W.H. Freeman and Company, 1995.

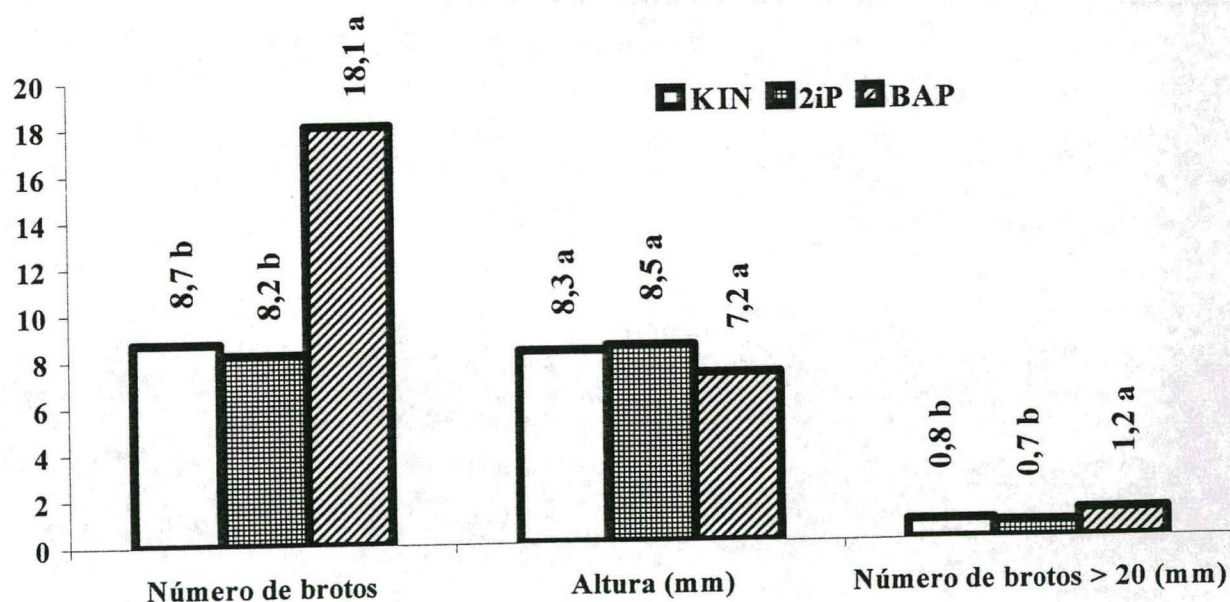
TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Redwood City: Benjamin, Cummings, Cap.20, 1998. 792p.

ZIMMERMAN, R.H.; DEBERGH, P.C. Micropropagation of temperate zone fruit and nut crops. In: **Micropropagation: Technology and application**. (Zimmerman, R.H. e Debergh, P., Eds). Kluwer Academic, 1991, Boston, USA, p.231-246.

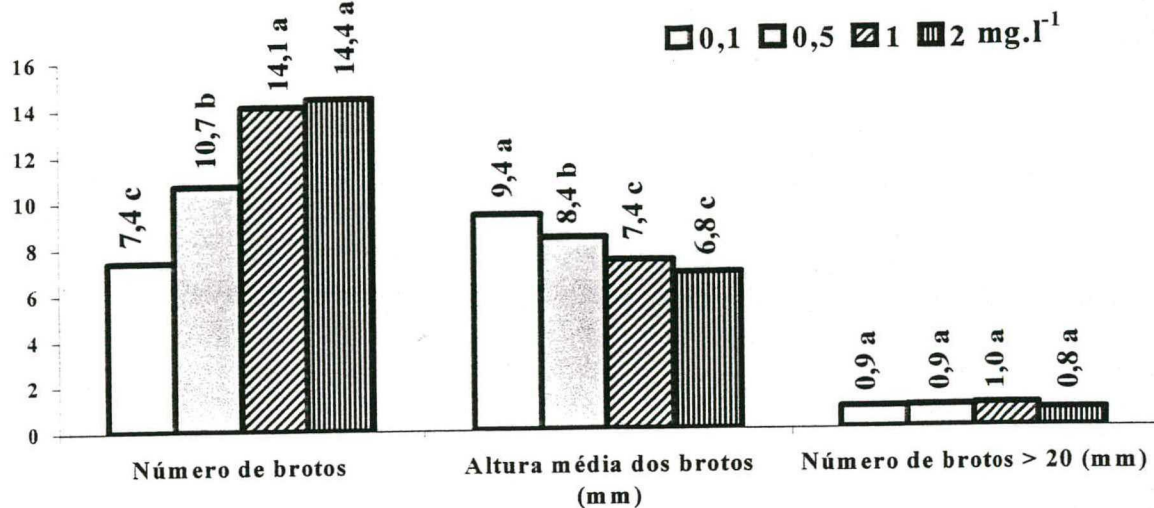
ZIMMERMAN, T.W.; SCORZA, R. Benzyladenine and shortened light/dark cycles improve *in vitro* shoot proliferation of peach. **HortScience**, Alexandria, v.29, n.6, p.698, 1994.



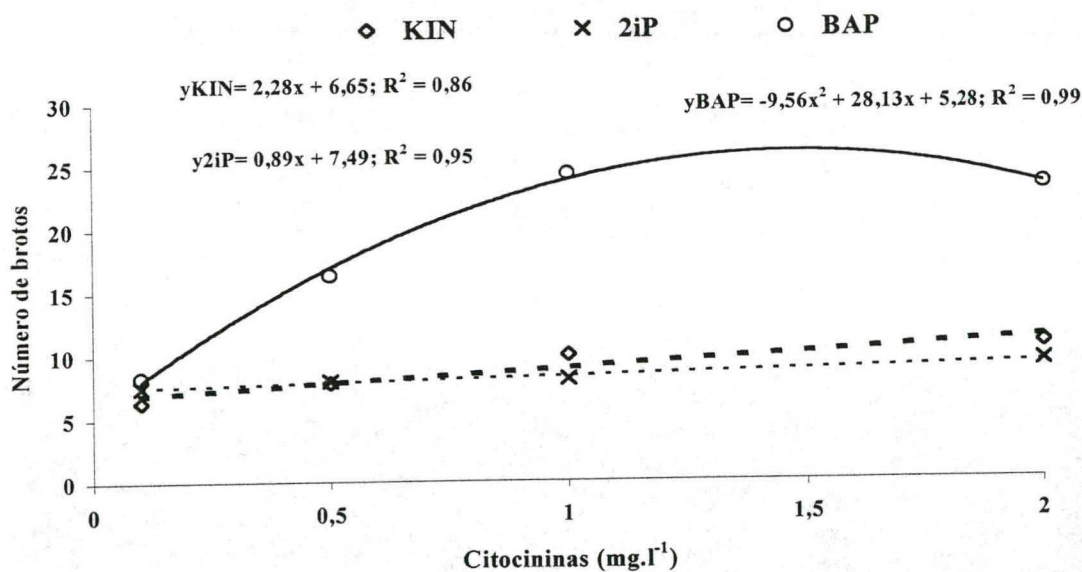
**FIGURA 1.** Efeito do tipo de explante na sobrevivência, contaminação e hiperhidricidade no estabelecimento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* 'Capdeboscq', após 30 dias em meio de cultura de Lepoivre (n=5), SNK (0,05). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.



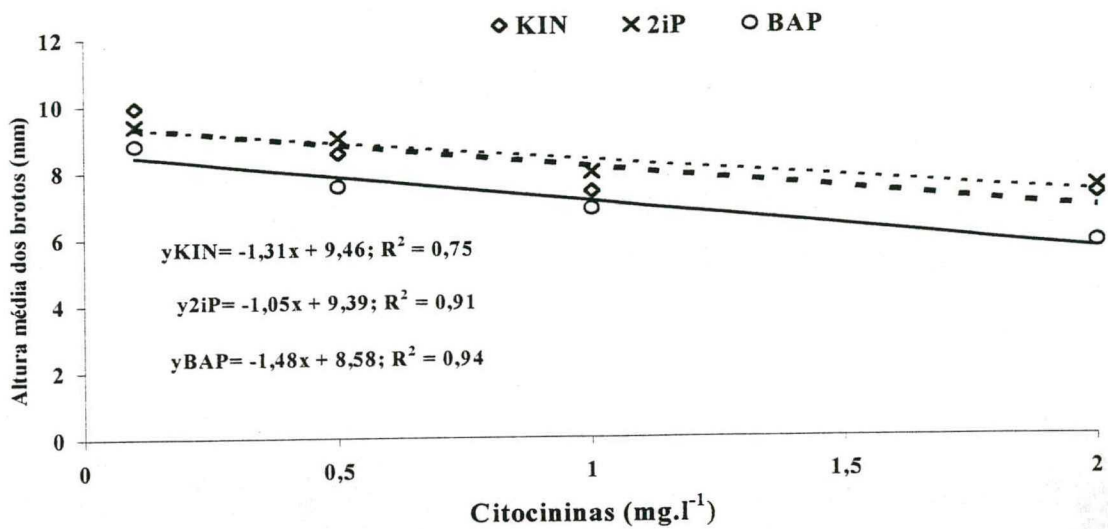
**FIGURA 2.** Valores médios totais do efeito de diferentes citocininas no número de brotos por explante, altura média dos brotos (mm) e número de brotos >20 mm na multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* 'Capdeboscq', após 28 dias em meio de cultura de Lepoivre (n=20), SNK (0,05). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.



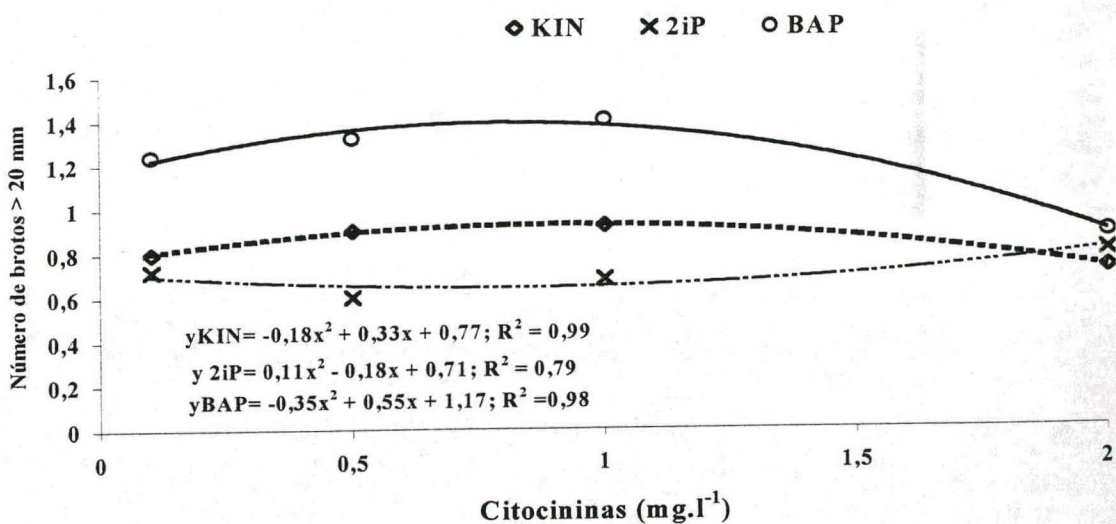
**FIGURA 3.** Valores médios totais do efeito de concentrações de citocininas no número de brotos por explante, altura média dos brotos (mm) e número de brotos >20 mm na multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* 'Capdeboscq', após 28 dias em meio de cultura de Lepoivre (n=15), SNK (0,05). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.



**FIGURA 4.** Efeito de diferentes citocininas no número de brotos por explante na multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* 'Capdeboscq', após 28 dias em meio de cultura de Lepoivre (n=5), SNK (0,05). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.

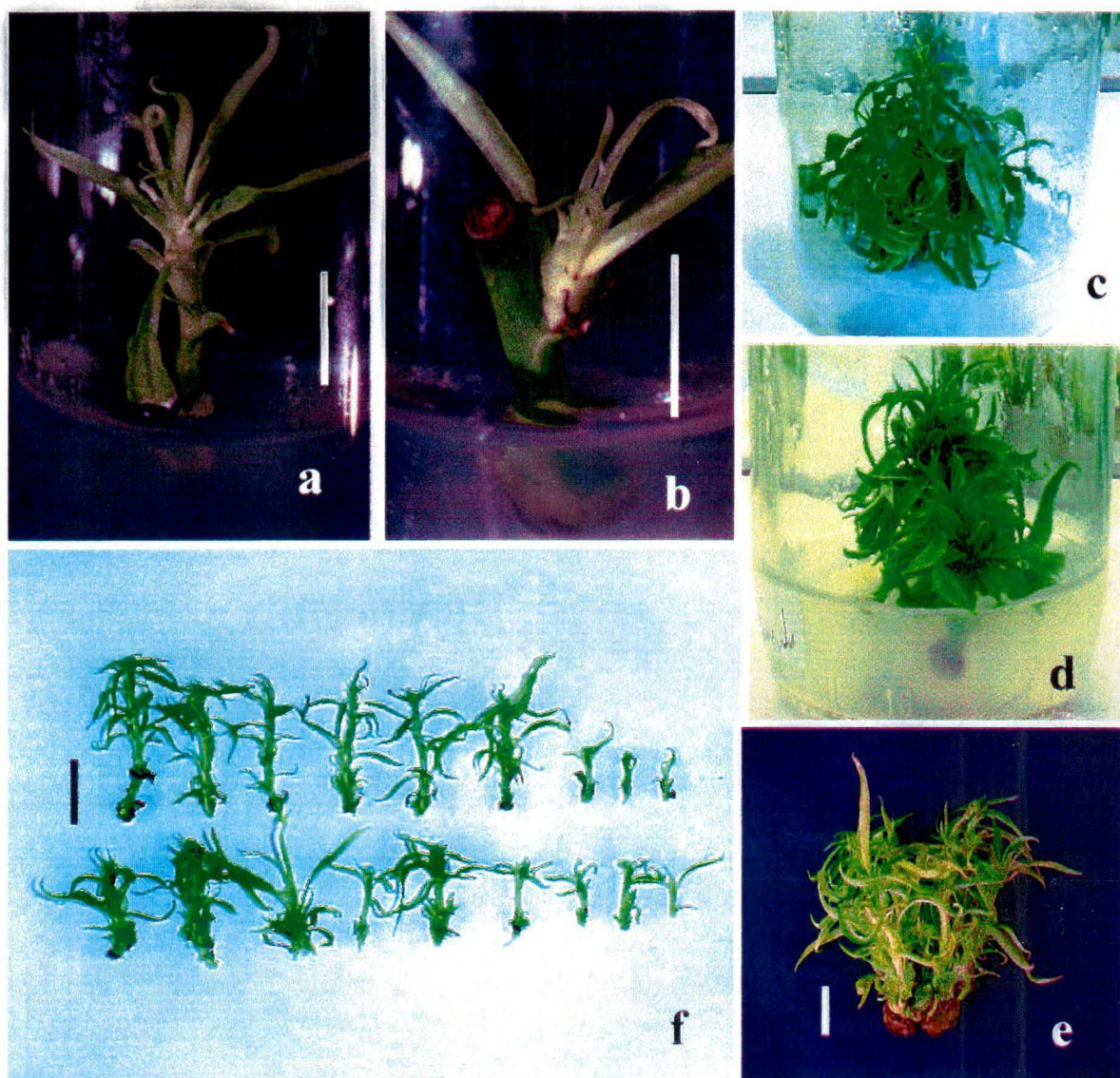


**FIGURA 5.** Efeito de diferentes citocininas na altura média das brotações (mm) na multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* 'Capdeboscq' após 28 dias em meio de cultura de Lepoivre (n=5), SNK (0,05). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.



**FIGURA 6.** Efeito de citocininas no número de brotos >20 mm na multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* 'Capdeboscq', após 28 dias em meio de cultura de Lepoivre (n=5), SNK (0,05). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.





**FIGURA 7.** Aspectos morfogênicos no estabelecimento e multiplicação *in vitro* de pessegueiro 'Capdeboscq'. a) ápice caulinar, 15 dias *in vitro* (barra 1cm). b) gema lateral, 15 dias *in vitro* (barra 1 cm). c) primeira subcultura, 21 dias *in vitro*. d) segunda subcultura, 15 dias *in vitro*. e) explante cultivado no experimento em meio de cultura de Lepoivre suplementado e BAP ( $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ ), 28 dias *in vitro* (barra 1,0 cm). f) dissecação do explante da figura anterior com detalhe das brotações (barra 1,5 cm). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.

## INTERVALO E NÚMERO DE SUBCULTURAS NA MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DO PORTA-ENXERTO DE *Prunus* 'CAPDEBOSQ'

**RESUMO** – O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do intervalo e do número de subculturas na multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* 'Capdeboscq'. Segmentos nodais com 1-2 cm, desprovidos dos ápices caulinares, foram inoculados em meio de cultura de Lepoivre suplementado com BAP (0,5 mg.l<sup>-1</sup>). Durante 4 subculturas, com intervalos de 14, 21, 28 e 35 dias, o experimento foi avaliado quanto ao número de brotos por explante, percentagem de hiperhidricidade, altura média das brotações (mm) e número de brotos > 20 mm por explante. Os resultados mostraram que o número de brotos por explante e a percentagem de brotos hiperhídricos foram significativamente afetados pelo intervalo, número de subculturas e pela interação intervalo x número de subculturas. O intervalo de 14 dias entre as subculturas proporcionou maior número de brotos ao longo das subculturas. A percentagem de brotos hiperhídricos elevou-se com o aumento do intervalo e do número de subculturas. A altura média dos brotos e o número de brotos > 20 mm foram afetados significativamente pelo intervalo e pela interação intervalo x número de subculturas. Maior altura média dos brotos e maior número de brotos > 20 mm foram obtidos com intervalos de 28 dias. Para os intervalos de 14 e 21 dias ocorreram acréscimos na altura média dos brotos e no número de brotos > 20 mm ao longo das subculturas.

**Termos para indexação:** Pessegueiro, propagação *in vitro*, mudas, hiperhidricidade.

## INTERVAL AND SUBCULTURE NUMBERS ON *in vitro* MULTIPLICATION OF *Prunus* ROOTSTOCK 'CAPDEBOSQ'

**ABSTRACT** – The objective of this work was to evaluate the effect of the interval of time and subculture numbers on *in vitro* multiplication of *Prunus* rootstock 'Capdeboscq'. For that, nodal segments (1-2 cm long) without apical bud, were cultured in Lepoivre's medium supplemented with BAP (0,5 mg.l<sup>-1</sup>). The experiment

was carried out over 4 subcultures, with intervals of 14, 21, 28 and 35 days, where it was evaluated the number of shoots/explant, shoot average length (mm), number of shoots larger than 20 mm/explant, and percentage of hyperhydric shoots. The results showed that the number of shoots/explant and the percentage of shoots showing hyperhydricity was significantly affected by the interval time, subculture number and interval time x subculture number interaction. The average shoot length and number of shoots larger than 20mm were significantly affected by the interval time and interval time x number subculture interaction. Intervals of 14 days in the subcultures resulted in the largest number of shoots during the subcultures. The percentage of shoots showing hyperhydricity was enhanced with the increase of interval time and subculture number. The best results for average shoot length and highest number of shoots larger than 20mm were obtained for the interval of 28 days. Intervals of 14 and 21 days enhanced the average shoot length and number of shoots larger than 20mm during the subcultures.

**Index terms:** peach tree, *in vitro* propagation, plant cuttings, hyperhydricity.

## INTRODUÇÃO

A técnica de propagação *in vitro* tem sido utilizada para produção comercial de espécies frutíferas desde o final da década de 70 (Pérez-Tornero *et al.*, 2000). No início esta técnica foi empregada apenas para algumas culturas, como morango e amora, mas posteriormente estendeu-se para várias fruteiras lenhosas, como porta-enxertos de pessegueiro (Zimmerman e Debergh, 1991).

Para Marino *et al.* (1985), das três fases da micropropagação: estabelecimento, multiplicação e enraizamento, a segunda fase é a mais longa e permite através de sucessivas subculturas, a obtenção de um grande número de brotos, com a introdução *in vitro* de um único explante.

Os intervalos de subculturas, geralmente utilizados entre as espécies lenhosas, são de três a quatro semanas (Marino *et al.*, 1985; Arena e Caso, 1992; Harada e

Murai, 1996; Radice *et al.*, 1999). No entanto, poucos são os estudos relacionados com o intervalo e o número de subculturas ótimos para uma taxa eficiente de multiplicação.

A otimização do protocolo de multiplicação com relação ao intervalo e número de subculturas permite maior taxa de multiplicação e redução de problemas decorrentes da cultura *in vitro*, como por exemplo, a hiperhidricidade.

A hiperhidricidade pode ser o resultado de várias reações de stress devido às condições ambientais anormais impostas simultaneamente: altas concentrações de citocininas (Arena e Caso, 1992; Bouza *et al.*, 1992; Pérez-Tornero *et al.*, 2001), composição salina do meio de cultura (Quoirin *et al.*, 1977; Bouza *et al.*, 1992), alta umidade relativa na atmosfera do frasco (Bouza *et al.*, 1992), acúmulo de gases na atmosfera do frasco (De Proft *et al.*, 1985; Debergh *et al.*, 1992), entre outros.

Quando o intervalo e o número de subculturas excedem o limite ideal, o crescimento torna-se lento, causando uma redução nas taxas de multiplicação *in vitro* (Borkowska, 1985; Marino *et al.*, 1985; Theiler-Hedtrich e Feucht, 1985; López-Aranda *et al.*, 1994).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do intervalo e do número de subculturas na micropropagação do porta-enxerto de *Prunus* (*Prunus persica* (L.) Batsch) 'Capdeboscq', visando a obtenção de uma máxima taxa de multiplicação.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal e estabelecimento da cultura *in vitro*

O pessegueiro 'Capdeboscq' foi estabelecido *in vitro* em meio de cultura com sais e vitaminas de Lepoivre (Quoirin *et al.*, 1977), suplementado com sacarose (20,0g.l<sup>-1</sup>), ágar (7,0g.l<sup>-1</sup>) e BAP - benzilaminopurina (0,5 mg.l<sup>-1</sup>), através da cultura de gemas laterais e ápices caulinares de brotos em crescimento, retirados de plantas matrizes mantidas em casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da UFSC.

### **Efeito do intervalo e do número de subculturas na multiplicação *in vitro***

Os explantes, segmentos nodais com 1-2 cm (4-5 gemas) desprovidos dos ápices, foram inoculados no mesmo meio de cultura citado anteriormente na fase de estabelecimento *in vitro* da cultura. O pH foi ajustado para 5,2-5,3 antes da autoclavagem à 121°C durante 15 minutos.

O experimento foi realizado durante 4 subculturas, comparando-se intervalos de 14, 21, 28 e 35 dias e, avaliado quanto ao número de brotos por explante, percentagem de brotos hiperhídricos, altura média das brotações (mm) e número de brotos >20 mm por explante. A seleção de explantes para cada subcultura foi baseada na eliminação de todos os brotos hiperhídricos.

### **Condições de cultura *in vitro***

O material vegetal foi mantido em câmara de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de  $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , fornecidas por lâmpadas fluorescentes brancas frias.

### **Análises estatísticas**

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente ao acaso, com cinco explantes por repetição e cinco repetições por tratamento. Os dados referentes ao intervalo e ao número de subculturas foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e ao teste de separação de médias SNK (5%). Os valores para número de subculturas dentro do fator intervalo foram submetidos à análise de Regressão Polinomial, conforme Sokal e Rohlf (1995).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O número de brotos e a percentagem de explantes hiperhídricos foram significativamente afetados pelo intervalo, número de subculturas e pela interação intervalo x número de subculturas.

Os valores médios totais para o número de brotos por explante diminuíram com o aumento do intervalo e do número de subculturas (**Figuras 1 e 2**). No intervalo de 14 dias ocorreu um acréscimo no número de brotos com o aumento das subculturas, porém nos intervalos de 21, 28 e 35 dias ocorreu uma redução do número de brotos (**Figura 3**). No entanto, na primeira subcultura, o intervalo de 35 dias, apresentou o maior número de brotos por explante, sendo significativamente superior aos demais. Estes resultados são similares aos de Borkowska (1985), que obteve um aumento no número médio de brotos por explante até a oitava semana, avaliando somente por uma subcultura. No entanto, na multiplicação *in vitro* de *Prunus cerasus*, Theiler-Hedtrich e Feucht (1985), observaram um maior número de brotos, entre a terceira e a quinta subcultura, com intervalo de cultura de 35 a 42 dias. Outro fator relacionado com a taxa de multiplicação *in vitro* durante várias subculturas, é a utilização de um meio de cultura adequado para a espécie. López-Aranda *et al.* (1994), na multiplicação *in vitro* de morangueiro, notaram que a formulação do meio MS (Murashige e Skoog, 1962) ocasionou fortes reduções nas taxas de multiplicação a partir da quinta subcultura; já com a formulação N45K (Margara, 1984), as taxas se mantiveram constantes até a oitava subcultura. Acredita-se que no decorrer do processo da cultura *in vitro* podem ocorrer desequilíbrios nutricionais na planta, estimulados pelo aumento do intervalo e do número de subculturas, devido a formulações de sais inadequadas para a espécie.

A percentagem de explantes hiperhídricos foi mais elevada com o aumento do intervalo e do número de subculturas (**Figuras 1 e 2**). Verificou-se que nos intervalos de 28 e 35 dias ocorreram elevações das taxas de hiperhidricidade ao longo das subculturas. Nos intervalos de 14 e 21 dias, surgiram brotos hiperhídricos, respectivamente, a partir da terceira e da segunda subculturas, porém, não apresentaram diferenças significativas entre as subculturas (**Figura 4**). Estes resultados são semelhantes aos observados por Barghchi e Alderson (1985), que obtiveram a eliminação de explantes hiperhídricos e com ápices necróticos com o aumento na frequência de subculturas. E também, na multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus*, Radice *et al.* (1999), verificaram o aparecimento de folhas escamiformes, ápices necróticos e hiperhídricos a partir de cinco subculturas com intervalos de 28 dias em meio de cultura MS.

A hiperhidricidade é um desequilíbrio fisiológico freqüentemente relacionado à altas concentrações de citocininas, baixa intensidade luminosa, composição salina do meio de cultura, alta umidade relativa na atmosfera do frasco, acúmulo de gases na atmosfera do frasco, entre outros. Estes fatores podem explicar o forte acréscimo da percentagem de explantes hiperhídricos com o aumento do número de subculturas (Quoirin *et al.*, 1977; De Proft *et al.*, 1985; Bouza *et al.*, 1992; Arena e Caso, 1992; Debergh *et al.*, 1992; Harada e Murai, 1996; Pérez-Tornero *et al.*, 2001). Teoricamente, este conjunto de fatores causadores da hiperhidricidade aumentariam seus efeitos com o aumento do tempo de permanência da cultura *in vitro*.

A possível causa da alta percentagem de brotos hiperhídricos, com o aumento do intervalo entre as subculturas, poderia ser determinada pelo sistema de cultura onde os frascos ficam fechados por maior tempo, sem trocas gasosas, com uma alta umidade do ar e ocorrência do aumento da concentração de etileno. Da mesma forma, a hiperhidricidade poderia estar relacionada com o aumento da umidade relativa e limitação de trocas gasosas na cultura *in vitro* (Hakkaart e Versluijs, 1983). A alta umidade relativa produz um stress com aumento da produção de etileno (Kevers *et al.*, 1984; Pérez-Tornero *et al.*, 2001). Isto afeta o processo de lignificação através de mudanças no balanço entre isoenzimas de peroxidases, favorecendo a absorção de água nos diferentes tecidos, gerando células hiperhídricas (Bouza *et al.*, 1992; Olmos *et al.*, 1997; Pérez-Tornero *et al.*, 2001).

A altura média dos brotos e o número de brotos por explante >20 mm foram significativamente afetados pelo intervalo e pela interação intervalo x número de subculturas. Os melhores resultados para altura média dos brotos e número de brotos >20 mm foram obtidos com intervalos de 28 dias (**Figura 1**). Estes resultados indicam que, possivelmente, os explantes que permaneceram mais tempo em cultura, apresentaram um maior crescimento. Porém, esta prática causa redução nas taxas de multiplicação ao longo das subculturas, com elevação de brotos hiperhídricos (**Figuras 5 e 6**). Assim como, Borkowska (1985), observou que culturas de *Prunus* em fase de multiplicação *in vitro* apresentaram um aumento, até a oitava semana, no número de brotos, percentagem de matéria seca e peso das culturas, porém somente em uma subcultura.

Para o número de subculturas, os dados referentes aos valores médios totais para a altura média dos brotos e número de brotos >20 mm não diferiram significativamente (**Figura 2**). Verificou-se um forte efeito da interação entre o intervalo e o número de subculturas para as variáveis altura média dos brotos e número de brotos >20 mm (**Figura 5 e 6**). Estas duas variáveis apresentaram um aumento nos valores em intervalos de 14 e 21 dias e um decréscimo nos intervalos de 28 e 35 dias ao longo das subculturas. Diferenças significativas para a altura média dos brotos ao longo das subculturas são relatadas na literatura. Oliveira *et al.* (2000) na multiplicação *in vitro* de *Manihot esculenta* obtiveram um crescimento na altura das plantas até a quarta subcultura e a partir desta um decréscimo. Estes autores utilizaram intervalos de subculturas de 30 dias. Em nosso trabalho este efeito somente foi observado com intervalos de 14 e 21 dias, acima destes ocorreu uma redução da altura das plantas já na Segunda subcultura. Estas diferenças observadas podem estar relacionadas ao comportamento diferencial de crescimento *in vitro* de cada espécie.

## CONCLUSÕES

- 1 O intervalo e o número de subculturas influenciaram significativamente na taxa de multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* 'Capdeboscq'.
- 2 Para o processo de multiplicação *in vitro* do pessegueiro 'Capdeboscq' deve-se subcultivar as brotações com intervalos de 14 a 21 dias. Porém, para a fase de alongamento das brotações, se necessário, intervalos maiores (28 a 35 dias) demonstraram resultados positivos.
- 3 A hiperhidricidade demonstrou estar relacionada ao intervalo de cultura sendo estimuada pelo aumento do número de subculturas e a interação da espécie a estes dois fatores.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARENA, M.E.; CASO, O.H. Factores que afectan la multiplicación *in vitro* de los brotes de portainjertos de *Prunus*, **ΦYTON**, Buenos Aires, v.53, p.29-38, 1992.
- BARGHCHI, M., ALDERSON, P.G. *In vitro* propagation of *Pistacia vera* L. and the comercial cultivars Ohadi and Kalleghochi, **Journal Horticulturae Science**, v.60, n.3, p. 423-430, 1985.
- BORKOWSKA, B. Micropropagation of sour cherry, cultivar Schattenmorelle, **Acta Horticulturae**, Leuven, v.169, p.329-333, 1985.
- BOUZA, L.; JACQUES, M.; MAZIÈRE, Y.; ARNAUD, Y. *In vitro* propagation of *Prunus tenella* Batsch. cv. 'Firehill': control of vitrification; increase of the multiplication rate and growth by chilling, **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.52, p.143-155, 1992.
- DE PROFT, M.; MAENE, L.J.; DEBERGH, P. Carbon dioxide and ethylene evolution in the culture atmosphere of *Magnolia soulangeana* cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.65, p.375-379, 1985.
- DEBERGH, P.; AITKEN-CHRISTIE, J.; COHEN, D.; GROUT, B.; VON-ARNOLD, S.; ZIMMERMAN, R.; ZIV, M. Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.30, p.135-140, 1992.
- HAKKAART, F.A.; VERSLUIJS, J.M.A. Some factors affecting glassiness in carnation meristem tip cultures, **Netherlands Journal Plant Pathology**, v.89, p.47-53, 1983.
- HARADA, H.; MURAI, Y. Micropropagation of *Prunus mume*, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.46, p.265-267, 1996.
- KEVERS, C.; COUMANS, M.; COUMANS-GILLÈS, M.F.; GASPAR, T. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.61, p. 69-74, 1984.
- LÓPEZ-ARANDA, J.M.; PLIEGO-ALFARO, E.; LÓPEZ-NAVIDAD, I.; BARCELÓ-MUÑOZ, M. Micropropagation of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). Effect of mineral salts, benzyladenine levels and number of subcultures on the

*in vitro* and field behaviour of the obtained microplants and the fruiting capacity of their progeny, **Journal of Horticultural Science**, Málaga, v.69, n.4, p.625-637, 1994.

MARGARA, J. **Bases de la multiplicación vegetativa**, INRA, Versailles, Paris, 1984.

MARINO, G.; ROSATI, P.; SAGRATI, F. Storage of *in vitro* cultures of *Prunus* rootstocks, **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.5, p.73-78, 1985.

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

OLIVEIRA, R.P. de; GOMES, T. da S.; VILARINHOS, A.D. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.12, p.2329-2334, 2000.

OLMOS, E.; PIQUERAS, A.; MARTÍNEZ-SOLANO, J.R.; HELLÍN, E. The subcellular localization of peroxidase and the implication of oxidative stress in hyperhydrated leaves of regenerated carnation plants. **Plant Science**, v.130, p. 97-105, 1997.

PÉREZ-TORNERO, O.; EGEA, J.; OLMOS, E.; BURGOS, L. Control of hyperhydricity in micropropagated apricot cultivars, **In Vitro Cellular Development Biology-Plant**, v.37, p.250-254, 2001.

PÉREZ-TORNERO, O.; LÓPEZ, J.M.; EGEA, J.; BURGOS, L. Effect of basal media and growth regulators on the *in vitro* propagation of apricot (*Prunus armenica* L.) cv. Canino, **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 75, n.3, p.283-286, 2000.

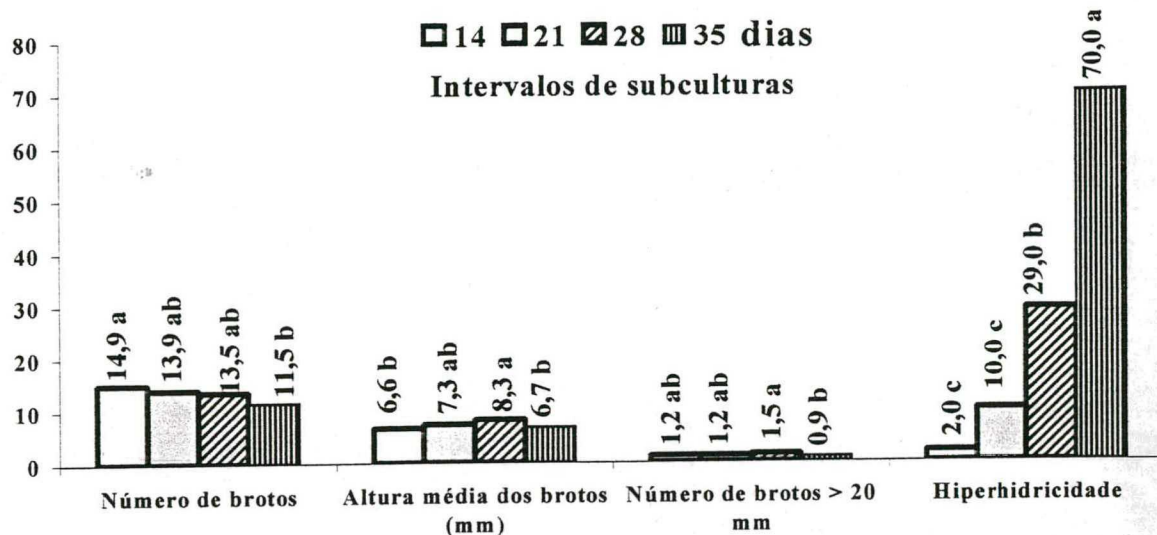
QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P.; BOXUS, P. Un premier bilan de 10 années de recherches sur les cultures de méristèmes et la multiplication *in vitro* de fruitiers ligneux. **C.R. Rech. Agron. Gembloux**, p.93-117, 1977.

RADICE, S.; PERELMAN, P.E.; CASO, O.H. Propagación clonal de tres portainjertos del género *Prunus* para la Pampa Deprimida, **PHYTON**, Buenos Aires, v.64, p.149-156, 1999.

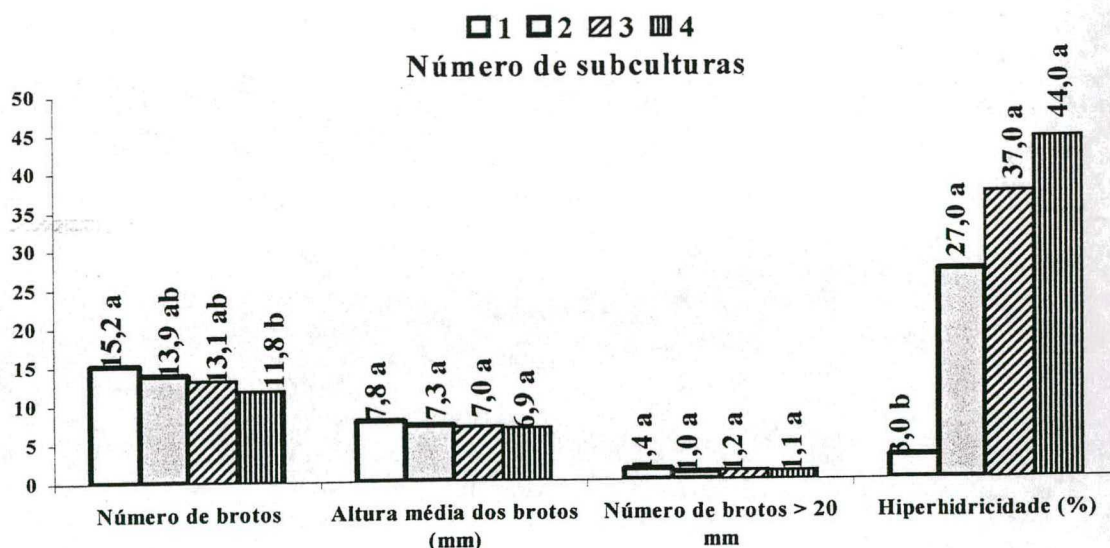
SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**. New York: W.H. Freeman and Company, 1995.

THEILER-HEDTRICH, C.M.; FEUCHT, W. Micropropagation of *Prunus Cerasus* rootstocks – Influence of culture medium constituents on growth in stage I and II, **Acta Horticulturae**, Leuven, v.169, p.335-340, 1985.

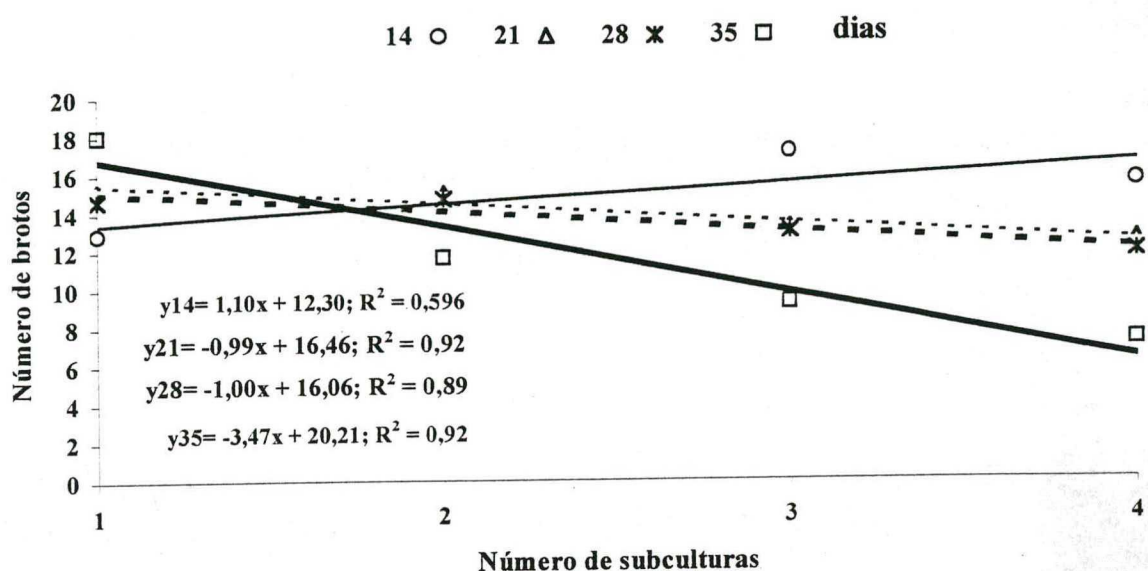
ZIMMERMAN, R.H.; DEBERGH, P.C. Micropropagation of temperate zone fruit and nut crops. In: **Micropropagation: Technology and Application**. (Zimmerman, R.H. e Debergh, P., Eds). Kluwer Academic, 1991, Boston, USA, p.231-246.



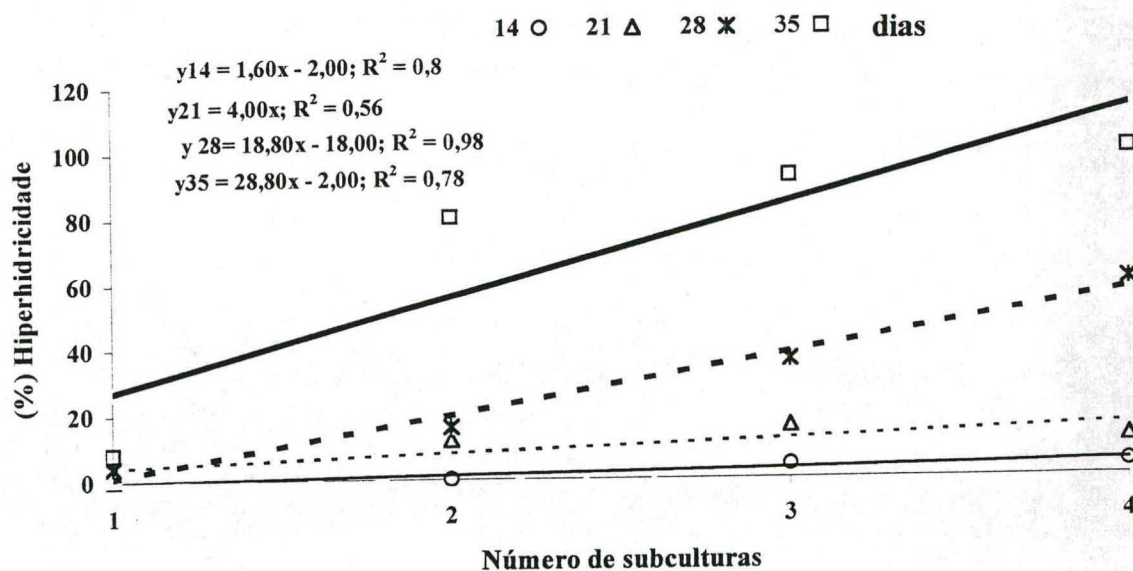
**FIGURA 1.** Valores médios totais do efeito do tempo de intervalo de cultura (dias) no número de brotos por explante, altura média dos brotos (mm), número de brotos >20 mm e percentagem de hiperhidricidade na multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* 'Capdeboscq', (n=20), SNK (0,05). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.



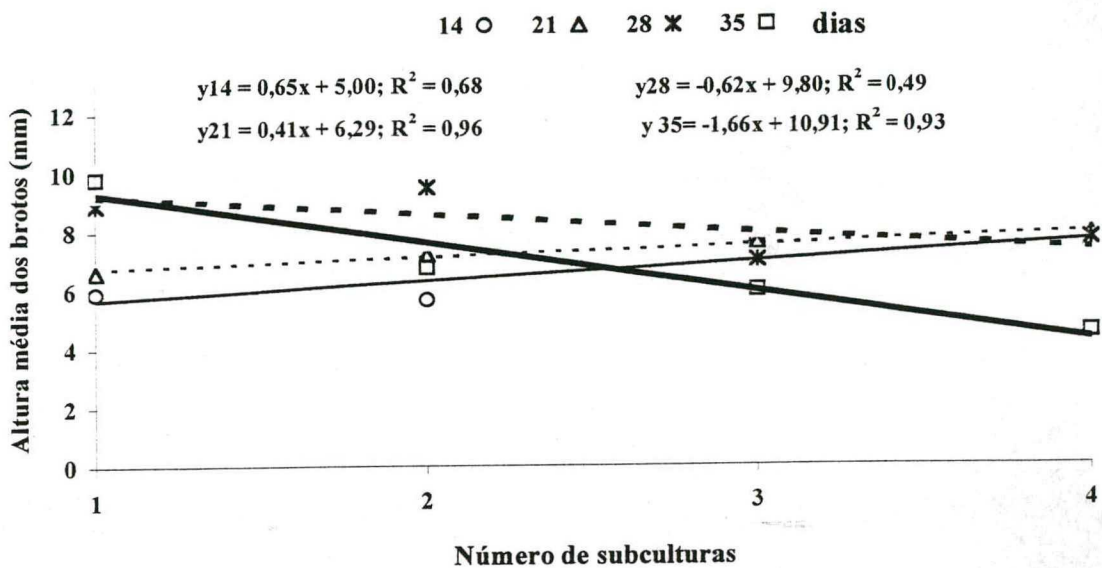
**FIGURA 2.** Valores médios totais do efeito do número de subculturas no número de brotos por explante, altura média dos brotos (mm), número de brotos >20 mm e percentagem de hiperhidricidade na multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* 'Capdeboscq', (n=20), SNK (0,05). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.



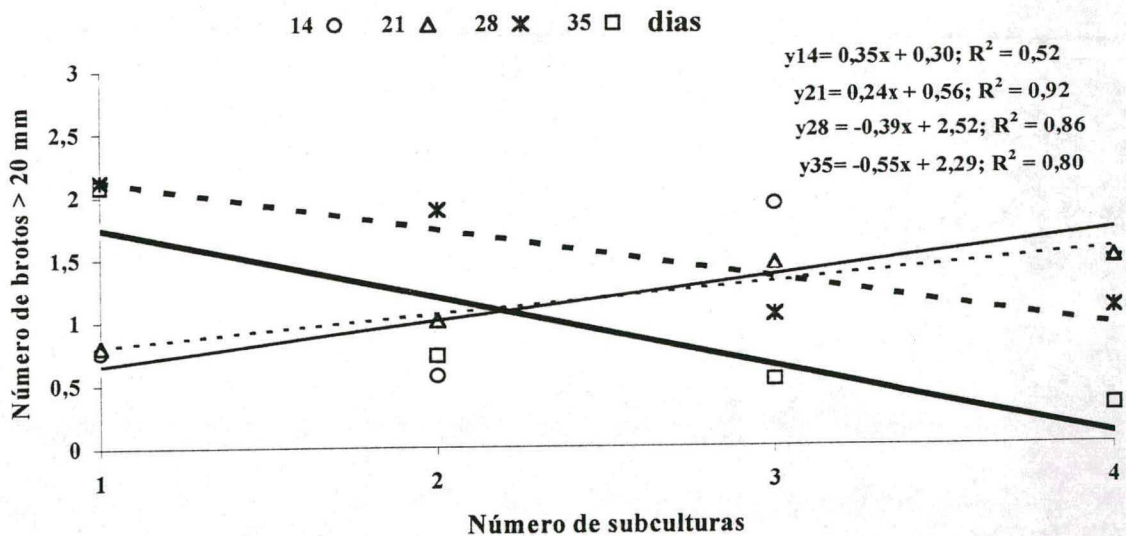
**FIGURA 3.** Efeito do número de subculturas no número de brotos por explante com diferentes intervalos na multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* ‘Capdeboscq’, (n=5). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.



**FIGURA 4.** Efeito do número de subculturas na porcentagem de hiperhidricidade com diferentes intervalos na multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* ‘Capdeboscq’, (n=5). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.



**FIGURA 5.** Efeito do número de subculturas na altura média dos brotos (mm) com diferentes intervalos na multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* ‘Capdeboscq’, (n=5). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.



**FIGURA 6.** Efeito do número de subculturas no número de brotos maiores que 20 mm com diferentes intervalos na multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* ‘Capdeboscq’, (n=5). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.

## ENRAIZAMENTO *in vitro* DE PORTA-ENXERTOS DE *Prunus*

**RESUMO** – A rizogênese é uma fase crítica da micropropagação, pois determina o sucesso na sobrevivência das plantas na etapa de aclimatização. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de IBA no enraizamento *in vitro* dos porta-enxertos de *Prunus* ‘Capdeboscq’, ‘GF677’, e das seleções de ‘Capdeboscq’ ‘VP411’ e ‘VP417’. A multiplicação e alongamento das brotações foi realizado em meio de cultura *dupla-fase* constituído de sais e vitaminas de Lepoivre com BAP ( $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ ) para o meio sólido e posterior meio líquido com ausência de BAP. Para o enraizamento *in vitro*, brotos com 2-3 cm foram introduzidos em meio de Lepoivre suplementado com IBA, nas seguintes concentrações de 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0  $\text{mg.l}^{-1}$ . Os resultados demonstraram que a percentagem de enraizamento e o número de raízes por explante foram afetados significativamente pela concentração de IBA, pelo genótipo e pela interação concentração x genótipo. A presença de IBA foi fundamental para enraizamento e a concentração mais eficaz foi  $1,4 \text{ mg.l}^{-1}$  em média. Observou-se um forte efeito do genótipo, com variações 64,7 a 100% de brotos enraizados e 3,6 a 9,3 raízes por brotos.

**Termos para indexação:** Fruticultura, pessegueiro, micropropagação, rizogênese, auxina, IBA.

### *In vitro* ROOTING OF *Prunus* ROOTSTOCKS

**ABSTRACT** – The rhizogenesis is a critical phase of the micropropagation, because it determines the plant survival on acclimatization phase. The objective of this work was to evaluate the effect of different IBA concentrations on *in vitro* rooting of the *Prunus* rootstocks ‘Capdeboscq’ e ‘GF677’, and ‘Capdeboscq’ selections ‘VP411’ and ‘VP417’. The multiplication and elongation phases were realized in *double phase* medium constituted of salts and vitamins of Lepoivre, supplemented with BAP ( $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ ). For the *in vitro* rooting, shoots with 2-3 cm long were inoculated in Lepoivre’s

medium supplemented with IBA (0,1; 0,5; 1,0 and 2,0 mg.l<sup>-1</sup>). The results showed that IBA concentration, genotype and IBA concentration x genotype interaction significantly affected the rooting percentage and the number of roots/explant. The presence of IBA was fundamental for the rooting and the concentration more efficient was 1,4 mg.l<sup>-1</sup>. It was also observed a strong effect of the genotype, with values ranging from 64,7 to 100% of rooting and from 3,6 to 9,3 roots per shoot.

**Index terms:** fruit crop, peach tree, micropropagation, rhizogenesis, auxin, IBA.

## INTRODUÇÃO

Na fruticultura comercial, a qualidade genética e sanitária das mudas é fator determinante para o aumento da produtividade e sucesso na atividade. Dentre os fatores que atualmente afetam negativamente a produtividade das prunáceas, estão a falta de mudas certificadas com padrão genético-sanitário comprovado e a inexistência de sistemas de controle na produção de materiais básicos, certificados e mudas, possibilitando a infecção e disseminação de vírus e assemelhados nos pomares (Fachinello, 2000).

Neste contexto, o conhecimento e a definição de porta-enxertos torna-se prioridade, principalmente para a produção de mudas livres de doenças e pragas, com variedades adaptadas às condições de solo e clima, de vigor definido e crescimento uniforme. Assim, é fundamental o desenvolvimento de novas alternativas de porta-enxertos em substituição aos tradicionais, de preferência de origem clonal (Rodrigues *et al.*, 1999; Rufato e Kersten, 2000; Rufato *et al.*, 2000; Fachinello, 2000).

Para prunáceas, a micropropagação é uma técnica empregada tanto para a produção clonal de porta-enxertos quanto como uma ferramenta auxiliar para a indexação de matrizes (Hammerschlag, 1982; Pietropaolo e Reisch, 1984; Zilkah, 1993; Campana *et al.*, 1994; Dimassi-Theriou, 1995; Pérez-Tornero *et al.*, 2000).

Na micropropagação, a rizogênese é uma fase crítica pois determina o sucesso na aclimatização, ou seja, a transferência das condições *in vitro* para *ex vitro*. O



enraizamento *in vitro* tem sido considerado como uma fase difícil e as falhas neste processo podem ser atribuída ao fato de que raízes formadas *in vitro* são normais morfológicamente mas não fisiologicamente. Assim, somente as plantas capazes de formar novas raízes no ambiente *ex vitro* sobrevivem (Filiti *et al.* 1987).

A indução de raízes é afetada por uma ampla interação de fatores: genótipo (Skirvin *et al.*, 1982; Pevalek-Kozlina e Jelaska, 1987; Radice *et al.*, 1999), compostos fenólicos (Borkowska, 1985; Hammatt, 1994), cofatores (Hammerschlag, 1982), meio de cultura (Skirvin *et al.*, 1982; Morini e Concetti, 1985; Dimassi-Theriou, 1995; Druart, 1997), concentração de ágar (Marín e Gella, 1987), entre outros. No entanto, o tipo e a concentração de auxinas são os fatores que determinam o sucesso no enraizamento *in vitro* de Prunáceas (Hammerschlag, 1982; Pietropaolo e Reisch, 1984; Reeves *et al.*, 1985; Campana *et al.*, 1994; Pérez-Tornero *et al.*, 2000).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de ácido indolbutírico (IBA) no enraizamento *in vitro* dos porta-enxertos de *Prunus* ‘Capdeboscq’, ‘GF677’ e as seleções ‘VP411’ e ‘VP417’.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

Os porta-enxertos ‘Capdeboscq’ (*Prunus persica* (L.) Batsch), ‘GF677’ (*Prunus amygdalus* x *Prunus persica*) e as seleções da variedade de Capdeboscq ‘VP411’ e ‘VP417’ (porta-enxertos obtidos pela Vitroplanta – Biotecnologia Ltda) foram estabelecidos *in vitro* a partir de plantas matrizes mantidas em casa de vegetação no Departamento de Fitotecnia, CCA/UFSC e na sede da Vitroplanta em Videira (SC).

### Multiplicação e alongamento *in vitro*

Para a multiplicação e alongamento das brotações foi utilizado o meio de cultura *dupla-fase*. O meio sólido foi constituído de sais e vitaminas de Lepoivre (Quoirin *et al.*, 1977) suplementado com sacarose (20,0 g.l<sup>-1</sup>), ágar (7,0 g.l<sup>-1</sup>) e BAP (0,5 mg.l<sup>-1</sup>). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,2-5,3 antes da autoclavagem

à 121°C durante 15 minutos. Após 15 dias de cultura *in vitro*, foi adicionado o meio líquido de composição igual à citada anteriormente, porém isento de BAP.

### **Enraizamento *in vitro***

Após 25 dias de cultura *in vitro*, brotos dos porta-enxertos com 2 a 3 cm foram introduzidos em meio de enraizamento contendo sais e vitaminas de Lepoivre (Quoirin *et al.*, 1977) suplementado com sacarose (20,0 g.l<sup>-1</sup>), ágar (7,0 g.l<sup>-1</sup>) e ácido indolbutírico (IBA) nas concentrações de 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 mg.l<sup>-1</sup>.

Após 15 dias de cultura, o experimento foi avaliado quanto a percentagem de enraizamento e ao número de raízes por explante.

### **Condições de cultivo**

O material vegetal foi mantido em câmara de crescimento com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, fornecidas por lâmpadas fluorescentes brancas frias.

### **Análises estatísticas**

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente ao acaso, com cinco explantes por repetição e cinco repetições por tratamento. Os dados referentes ao efeito do genótipo foram submetidos à análise de Variância (ANOVA) com teste de separação de médias SNK (5%), e os valores médios totais para o efeito de diferentes concentrações de IBA e o efeito do IBA dentro do fator genótipo à análise de regressão polinomial, de acordo com Sokal e Rohlf (1995).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A percentagem de enraizamento e o número de raízes por explante foram afetados significativamente pela concentração de IBA, pelo genótipo e pela interação concentração x genótipo.

Observou-se uma variação nos valores médios totais para percentagem de enraizamento de 43 a 81 % e no número de raízes de 2,75 a 5,99, para os diferentes porta-enxertos (Figuras 1 e 4). O porta-enxerto 'Capdeboscq' apresentou a maior percentagem de enraizamento e o maior número de raízes, demonstrando um maior potencial de enraizamento *in vitro*. O porta-enxerto 'GF677', e as seleções VP417 e VP411 não diferiram entre si, tanto para percentagem de enraizamento quanto para o número de raízes (Figuras 2 e 5).

Para os valores médios totais, em relação à percentagem de enraizamento, a concentração de IBA mais eficaz foi 1,0 mg.l<sup>-1</sup>, com 71%. Entretanto, a concentração ótima obtida para os valores médios totais foi de 1,4 mg.l<sup>-1</sup>, com 75,3 % de enraizamento (Figura 1).

Os dados do efeito das concentrações de IBA para cada genótipo, em relação a percentagem de enraizamento *in vitro* revelaram que os porta-enxertos apresentaram uma percentagem de enraizamento considerada ótima em diferentes concentrações de IBA, quando se consideram os dados obtidos através da equação de regressão (Figura 3). 'Capdeboscq' com 100% e 'GF677' com 69,7% em 1,4 mg.l<sup>-1</sup>; 'VP417' com 65,3% em 1,8 mg.l<sup>-1</sup> e 'VP411' com 64,9 % em 1,1 mg.l<sup>-1</sup>, foram os resultados obtidos para esta variável.

Para os valores médios totais, os porta-enxertos mostraram aumento no número de raízes com o aumento da concentração de IBA. A concentração ótima estimada através da equação de regressão foi de 2,0 mg.l<sup>-1</sup> com a formação de 5,4 raízes por explante (Figura 4). Em relação ao número de raízes nas diferentes concentrações de IBA, para cada porta-enxerto, verificou-se que 'Capdeboscq', 'GF677' e 'VP417' apresentaram um maior número de raízes na concentração de 2,0 mg.l<sup>-1</sup>, respectivamente com 9,3; 5,7; 3,9 raízes por explante, enquanto que o porta-enxerto 'VP411' apresentou um maior número de raízes (3,6) na concentração de 0,9 mg.l<sup>-1</sup> de IBA (Figura 6).

O processo de rizogênese mostrou-se rápido; cinco dias após o início do experimento pôde-se visualizar protuberâncias na base dos explantes e, com sete dias, pequenas raízes. Estes resultados são similares aos de Filiti *et al.* (1987) com brotações de *Prunus domestica* x *Prunus spinosa*. Segundo estes autores, dois dias após a

transferência dos brotos para o meio de enraizamento observou-se a diferenciação de células para a formação de raízes, bem como intensa atividade mitótica na área do floema, e após cinco dias surgiram os primórdios radiculares.

No presente trabalho, o processo de enraizamento não foi uniforme no decorrer do tempo para os porta-enxertos avaliados. Observou-se explantes formando raízes muito precocemente e outros apenas no final da fase experimental. No entanto, verificou-se que as concentrações de IBA (0,5, 1,0 e 2,0 mg.l<sup>-1</sup>) aceleraram a emissão do sistema radicular, enquanto que os brotos na concentração de 0,1 mg.l<sup>-1</sup> apresentaram retardamento na emissão de raízes. Segundo Gebhardt (1985), a auxina exerce seu principal efeito no estágio inicial de formação dos primórdios; sua concentração e o tempo de permanência dos explantes no meio determinam o número de raízes e a velocidade de crescimento dos primórdios radiculares.

A predisposição ao enraizamento, da espécie ou cultivar, é um comportamento genético que tem sido bastante discutido. Skirvin *et al.* (1982) obtiveram sucesso no enraizamento de pessegueiro e ameixeira com um meio de cultura, porém, para cerejeira este meio não foi eficiente, sugerindo que as predisposições entre espécies poderiam ser atribuídas a certos ingredientes do meio que podem auxiliar ou prejudicar o mesmo. Para Filiti *et al.* (1987), o enraizamento *in vitro* pode estar relacionado com a capacidade que os genótipos possuem de desenvolvimento do sistema radicular *ex vitro*; assim, os genótipos que possuem uma maior capacidade de formar sistema radicular *ex vitro* podem enraizar mais facilmente *in vitro*.

A maior capacidade de enraizamento demonstrada pelo porta-enxerto 'Capdeboscq' pode estar relacionada ao número de subculturas, já que foi cultivado *in vitro* por mais tempo (6-8 subculturas). Webster e Jones (1989), em macieira, obtiveram uma maior capacidade de enraizamento com o aumento do número de subculturas. Em damasqueiro, o aumento das taxas de enraizamento *in vitro* foi observado por Murai *et al.* (1997), após várias subculturas, e atribuído a um rejuvenescimento. No entanto, em *Prunus avium*, foi observado um efeito significativo do genótipo, com uma variação de 11 a 90,5% de explantes enraizados, entre diferentes genótipos (Pevalek-Kozlína e Jelaska, 1987).

O genótipo também demonstrou um efeito significativo em relação à sensibilidade dos porta-enxertos ao IBA. Verificou-se que os porta-enxertos 'VP417' e 'VP411' apresentaram uma intensa formação de calos na base dos explantes a partir da concentração de 1,0 mg.l<sup>-1</sup> de IBA, enquanto que no porta-enxerto 'Capdeboscq' somente ocorreu a formação de calos com 2,0 mg.l<sup>-1</sup> e no porta-enxerto 'GF677' não ocorreu formação de calos nas concentrações testadas (Figuras 7, 8, 9 e 10). Para Filiti *et al.* (1987) e Campana *et al.* (1994), este efeito é determinado por uma excessiva concentração de auxina no meio de cultura e, certamente, a concentração ideal de IBA no meio de cultura não só previne a formação de calos mas também promove rapidamente a formação e o desenvolvimento de raízes adventícias. Em várias espécies, a utilização de altas concentrações de IBA e NAA produziu calos e raízes anormais, que afetaram a sobrevivência durante a aclimatização (Welander, 1983; Al-Maarri *et al.*, 1994; Yepes e Aldwinckle, 1994). Foi demonstrado que raízes formadas na presença de calos apresentam descontinuidade do sistema vascular com a parte aérea e/ou falhas nas conexões, com efeitos negativos em sua funcionalidade (Filiti *et al.*, 1987).

O uso de auxina tem demonstrado ser fundamental para uma elevação nas taxas de enraizamento *in vitro* de *Prunus* (Pietropaolo e Reisch, 1984; Reeves *et al.*, 1985; Campana *et al.*, 1994; Pérez-Tornero *et al.*, 2000). O fator mais importante é o uso de reguladores de crescimento, que afeta positivamente a rizogênese nas diferentes fases de indução, formação e diferenciação de tecidos (Filiti *et al.*, 1987). Sciutti e Morini (1993) utilizaram 0,5 mg.l<sup>-1</sup> de IBA no enraizamento de *Prunus cerasifera*, obtendo uma taxa de 97% de enraizamento e a formação de 4,4 raízes por explante. Harada e Murai (1996) não observaram formação de raízes em explantes presentes no meio de enraizamento com ausência de auxinas; no entanto com apenas 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de NAA, 54,5% dos explantes formaram sistema radicular. Estes mesmos autores também verificaram uma superioridade do NAA em relação ao IBA no processo de enraizamento.

Verificou-se que a concentração de IBA afetou o crescimento das raízes, ocorrendo redução no comprimento com o aumento das concentrações, nos diferentes porta-enxertos (Figuras 7, 8, 9 e 10). Para Campana *et al.* (1994), a auxina favorece a

diferenciação celular dando origem aos primórdios radiculares, porém, para o alongamento de raízes geralmente não é necessária, sendo na maioria dos casos inibitória.

## CONCLUSÕES

- 1 O genótipo influenciou significativamente no enraizamento *in vitro*.
- 2 A presença de IBA foi fundamental para um adequado enraizamento, porém o requerimento foi específico para cada porta-enxerto.
- 3 A presença de IBA influenciou positivamente na formação de raízes, porém, inibiu o crescimento destas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-MAARRI, K.; ARNAUD, Y.; MIGINIAC, E. Micropropagation of *Pyrus communis* cultivar Passe Crassane seedlings and cultivar Williams: Factors affecting root formation *in vitro* and *ex vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.58, p. 207-214, 1994.
- BORKOWSKA, B. Micropropagation of sour cherry, cultivar Schattenmorelle, **Acta Horticulturae**, Leuven, v.169, p.329-333, 1985.
- CAMPANA, B.M.; CASTAGNARI, F.; COVATTA, F.; HENNINGS, M.; POLERO, H.J. Enraizamiento *in-vitro* del portainjerto Damas GF 1869 (*Prunus insititia* x *Prunus spinosa*), **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.16, n.3, p. 85-94, 1994.
- DIMASSI-THERIOU, K. *In vitro* rooting of rootstock GF-677 (*Prunus amygdalus* x *P. persica*) as influenced by mineral concentration of the nutrient medium and type of culture tube sealing material, **Journal of Horticultural Science**, Washington, v. 70, n.1, p.105-108, 1995.

- DRUART, P. Optimization of culture media for *in vitro* rooting of *Malus domestica* Borkh. cv. Compact Spartan, **Biologia Plantarum**, Praga, v.39, n.1, p.67-77, 1997.
- FACHINELLO, J.C. Problemática das mudas de plantas frutíferas de caroço. In: I SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE FRUTAS DE CAROÇO: PÊSSEGOS, NECTARINAS E AMEIXAS, 1., 2000, Porto Alegre. **Anais...** p.25-40.
- FILITI, N.; MONTUSCHI, N.; ROSATI, P. *In vitro* rhizogenesis: histo-anatomical aspects on *Prunus* rootstock, **Advances in Horticultural Science**, v.1, p. 34-38, 1987.
- GEBHARDT, K. Self-rooted sour cherries *in vitro*: auxin effects on rooting and isoperoxidases, **Acta Horticulturae**, Leuven, v.169, p. 341-349, 1985.
- HAMMATT, N. Promotion by phloroglucinol of adventitious root formation in micropropagated shoots of adult wild cherry (*Prunus avium* L.), **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.14, p. 127-132, 1994.
- HAMMERSCHLAG, F. Factors influencing *in vitro* multiplication and rooting of the plum rootstock Myrobalan (*Prunus cerasifera* Ehrh.), **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.107, p. 44-47, 1982.
- HARADA, H.; MURAI, Y. Micropropagation of *Prunus mume*, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.46, p.265-267, 1996.
- MARÍN, J.A.; GELLA, R. Acclimatization of the micropropagated cherry rootstock 'Masto de Montañana' (*Prunus cerasus* L.), **Acta Horticulturae**, Leuven, v.212, p. 603-606, 1987.
- MORINI, S.; CONCETTI, S. *In vitro* propagation of P.S. B2 peach rootstock, **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 173, p. 205-210, 1985.
- MURAI, Y.; HARADA, H.; YAMASHITA, H. *In vitro* propagation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cv. 'Bakuoh Junkyou', **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Tokyo, v.66, p. 475-480, 1997.
- PÉREZ-TORNERO, O.; LÓPEZ, J.M.; EGEEA, J.; BURGOS, L. Effect of basal media and growth regulators on the *in vitro* propagation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cv. Canino, **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 75, n.3, p.283-286, 2000.
- PEVALEK-KOZLINA, B.; JELASKA, S. Microclonal propagation of *Prunus avium* L. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 212, p .599-602, 1987.

- PIETROPAOLO, P.A.; REISCH, B.I. Micropropagation of 'Stanley' plum, **HorScience**, Alexandria, v.19, n.4, p. 535-536, 1984.
- QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P.; BOXUS, P. Un premier bilan de 10 années de recherches sur les cultures de méristèmes et la multiplication *in vitro* de fruitiers ligneux. **C.R. Rech. Agron.**, Gembloux, p.93-117, 1977.
- RADICE, S.; PERELMAN, P.E.; CASO, O.H. Propagación clonal de tres portainjertos del género *Prunus* para la Pampa Deprimida, **PHYTON**, Buenos Aires, v.64, p.149-156, 1999.
- REEVES, D.W.; COUVILLON, G.A.; HORTON, B.D. Effect of gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) on elongation and rooting of 'St. Julien A' rootstock *in vitro*, **Scientiae Horticulturae**, Amsterdam, v.26, p.253-259, 1985.
- RODRIGUES, A.C.; FACHINELLO, J.C.; STRELOW, E.; FORTES, G.R. de L. Estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* sp., **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.21, n.2, p.229-231, 1999.
- RUFATO, L.; BUSO, L.H.; TREVISAN, R.; ROSSI, A. de.; GUARDA, V. da C.; KERSTEN, E. Influência de gemas floríferas no enraizamento de estacas lenhosas de pessegueiro 'BR2' tratadas com diferentes concentrações de IBA, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.22, n.2, p.297-299, 2000.
- RUFATO, L.; KERSTEN, É. Enraizamento de estacas de pessegueiro (*Prunus persica* (L.) Batsch), cvs Esmeralda e BR2, submetidas à estratificação e ao ácido indolbutírico, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.22, n.2, p.191-194, 2000.
- SCIUTTI, R.; MORINI, S. Effect of relative humidity in *in vitro* culture on some growth characteristics of a plum rootstock during shoot proliferation and rooting and on plantlet survival, **Advances in Horticultural Science**, v.7, p. 153-156, 1993.
- SKIRVIN, R.M.; CHU, M.C.; RUKAN-KERNS, H. An Improved Medium for the *In Vitro* of Harbrite Peach, **Fruit Varieties Journal**, v.36, p.15-17, 1982.
- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**. New York: W.H. Freeman and Company, 1995.

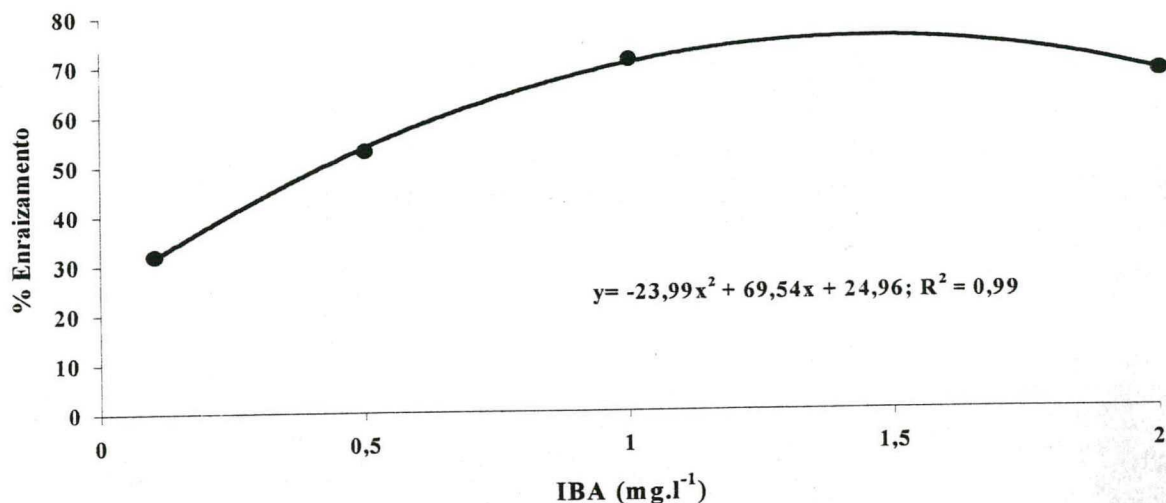


WEBSTER, C.A.; JONES, O.P. Micropropagation of the apple rootstock M9: effect of sustained subculture on apparent rejuvenation *in vitro*, **Journal of Horticultural Science**, v.64, p. 421-428, 1989.

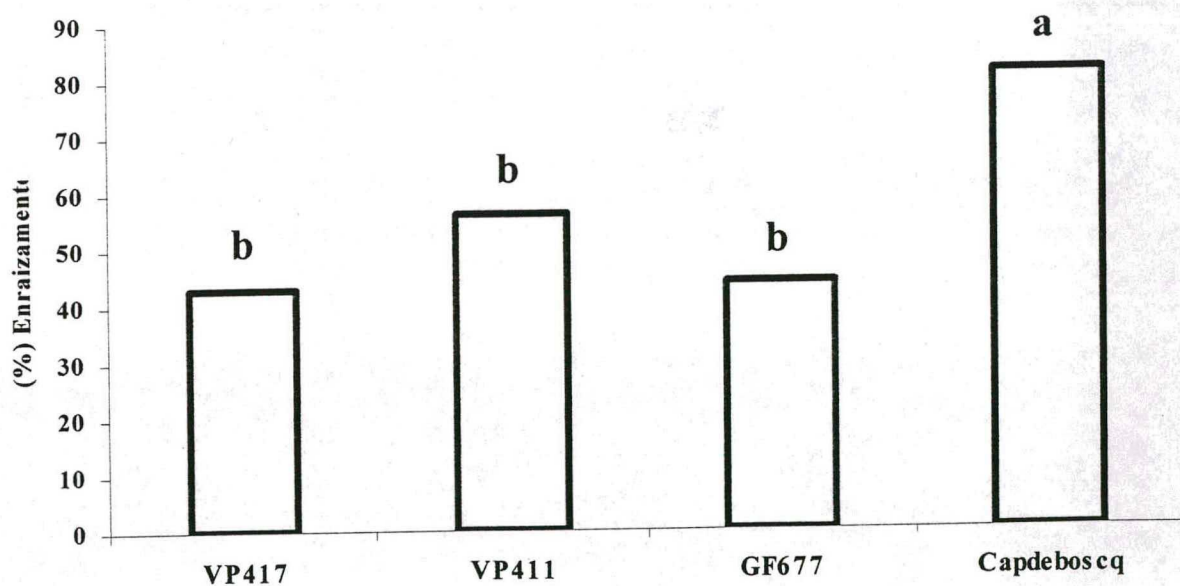
WELANDER, M. *In vitro* rooting of the apple rootstock M26 in adult and juvenile growth phases and acclimatization of the plantlets. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.58, p.231-238, 1983.

YEPES, L.M.; ALDWINCKLE, H.S. Micropropagation of thirteen *Malus* cultivars and rootstock, and effect of antibiotics on proliferation, **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.15, p.55-67, 1994.

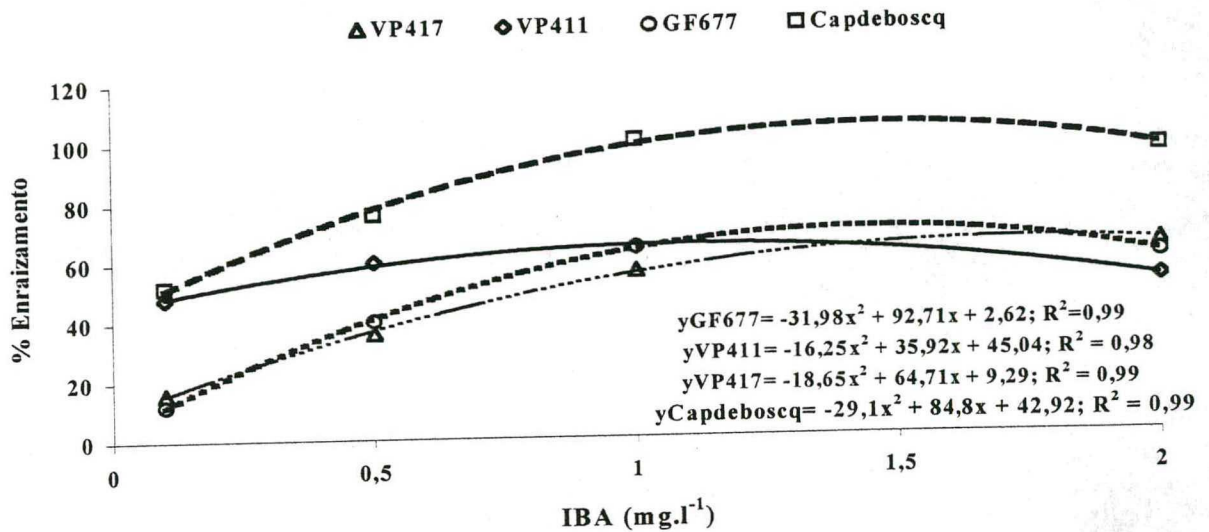
ZILKAH, S. *In vitro* micropropagation of indicator plants for indexing *Prunus* necrotizing ring sport virus, **Acta Horticulturae**, Leuven, v.336, p.121-125, 1993.



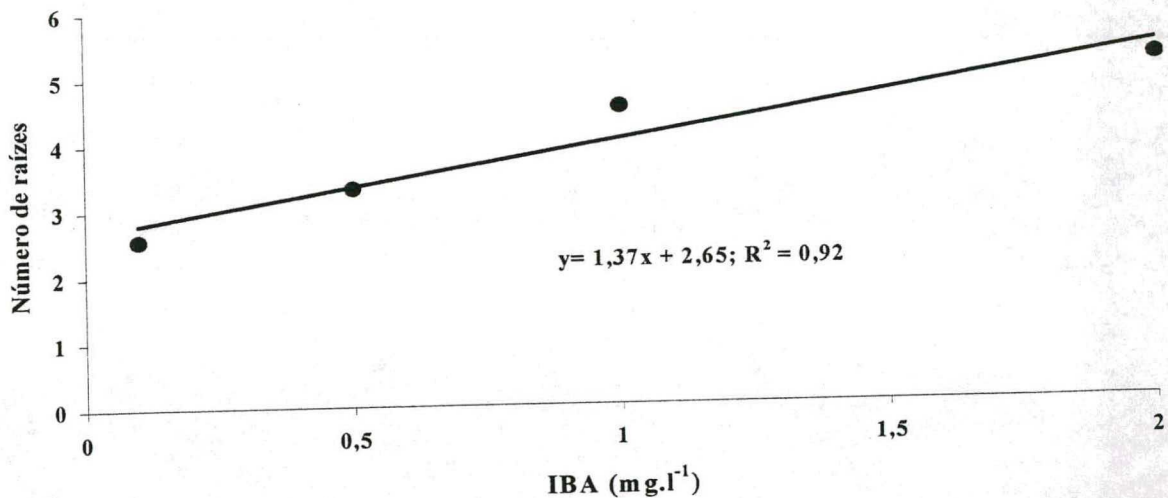
**FIGURA 1.** Valores médios totais do efeito de IBA na percentagem de enraizamento *in vitro* dos porta-enxertos de *Prunus* ‘Capdeboscq’, ‘GF677’, ‘VP417’ e VP411, 15 dias cultura *in vitro*, (n=20). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.



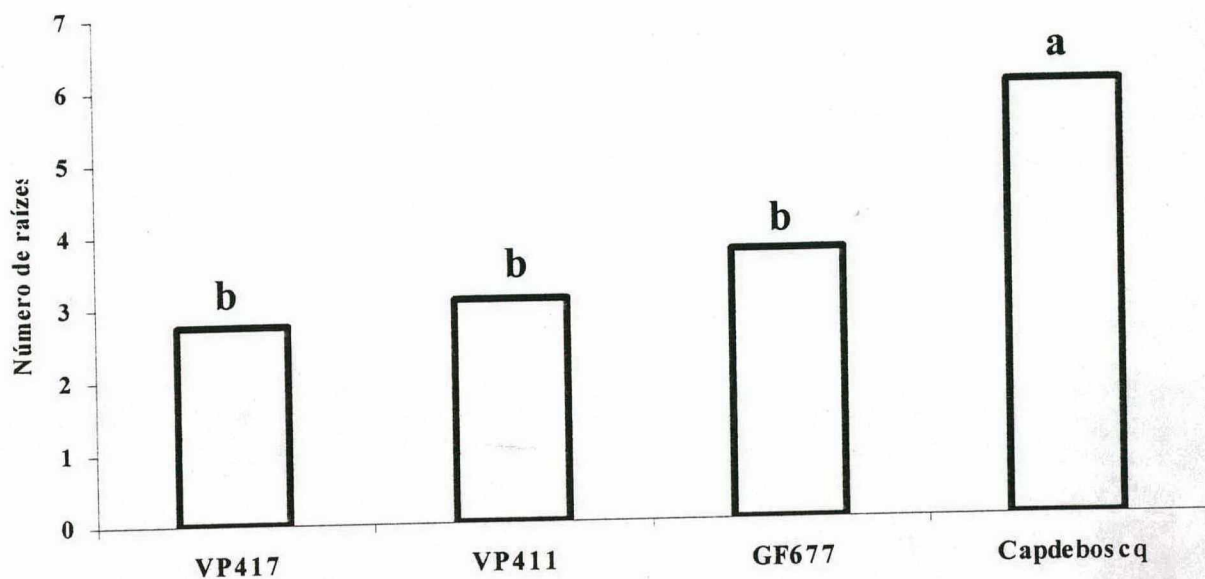
**Figura 2.** Valores médios totais para a percentagem de enraizamento *in vitro* dos porta-enxertos de *Prunus*, ‘VP417’, ‘VP411’, ‘GF677’ e ‘Capdeboscq’ aos 15 dias de cultura *in vitro*, (n=20). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.



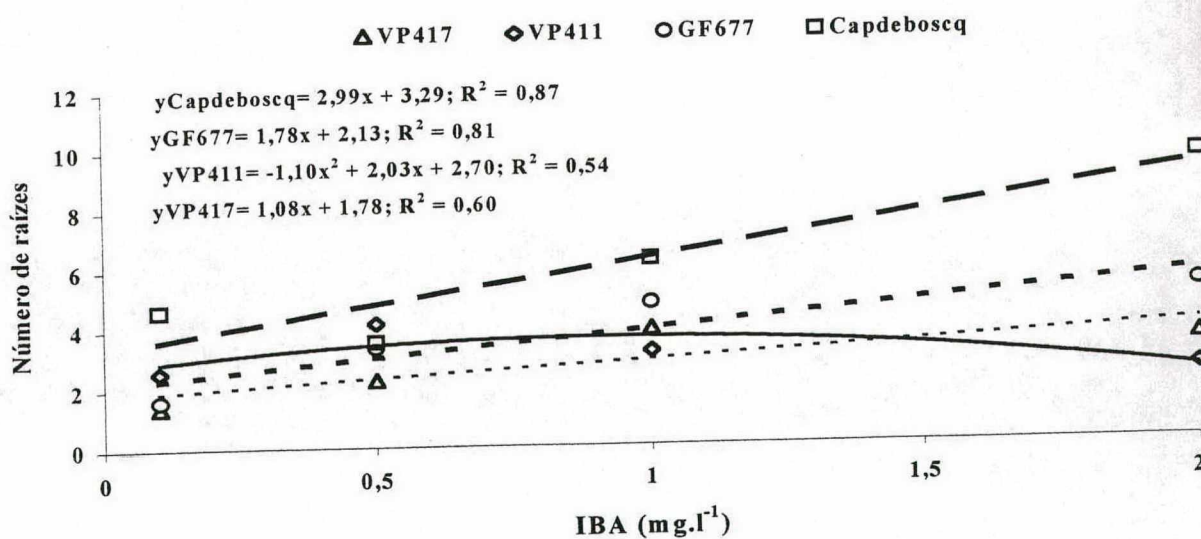
**FIGURA 3.** Efeito de IBA na porcentagem de enraizamento *in vitro* dos porta-enxertos de *Prunus* ‘Capdeboscq’, ‘VP417’, ‘VP411’ e ‘GF677’, após 15 dias cultura *in vitro*, (n=5). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.



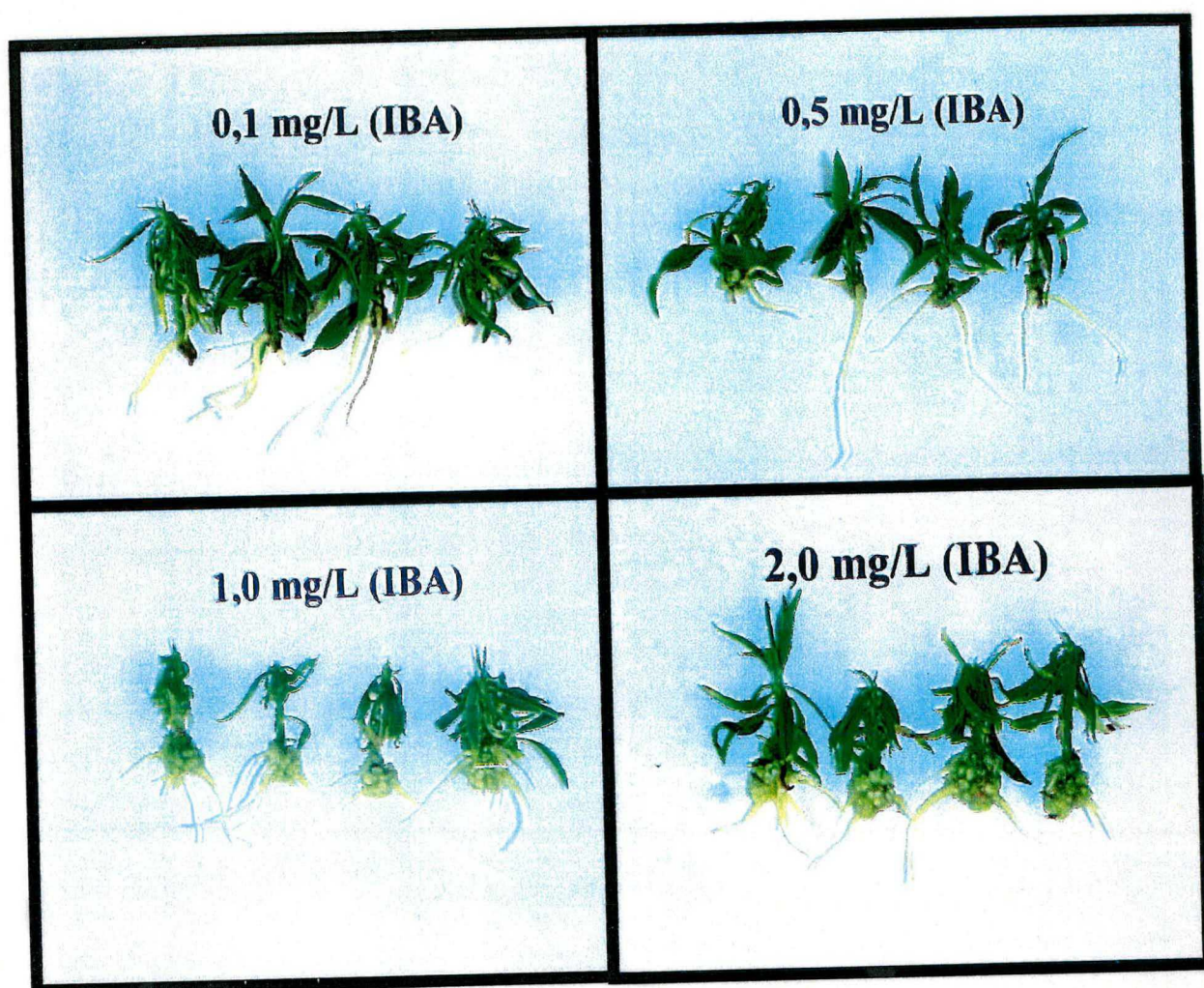
**FIGURA 4.** Valores médios totais do efeito de IBA para número de raízes por explante no enraizamento *in vitro* dos porta-enxertos de *Prunus* ‘Capdeboscq’, ‘VP417’, ‘VP411’ e ‘GF677’ após 15 dias cultura *in vitro*, (n=20). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.



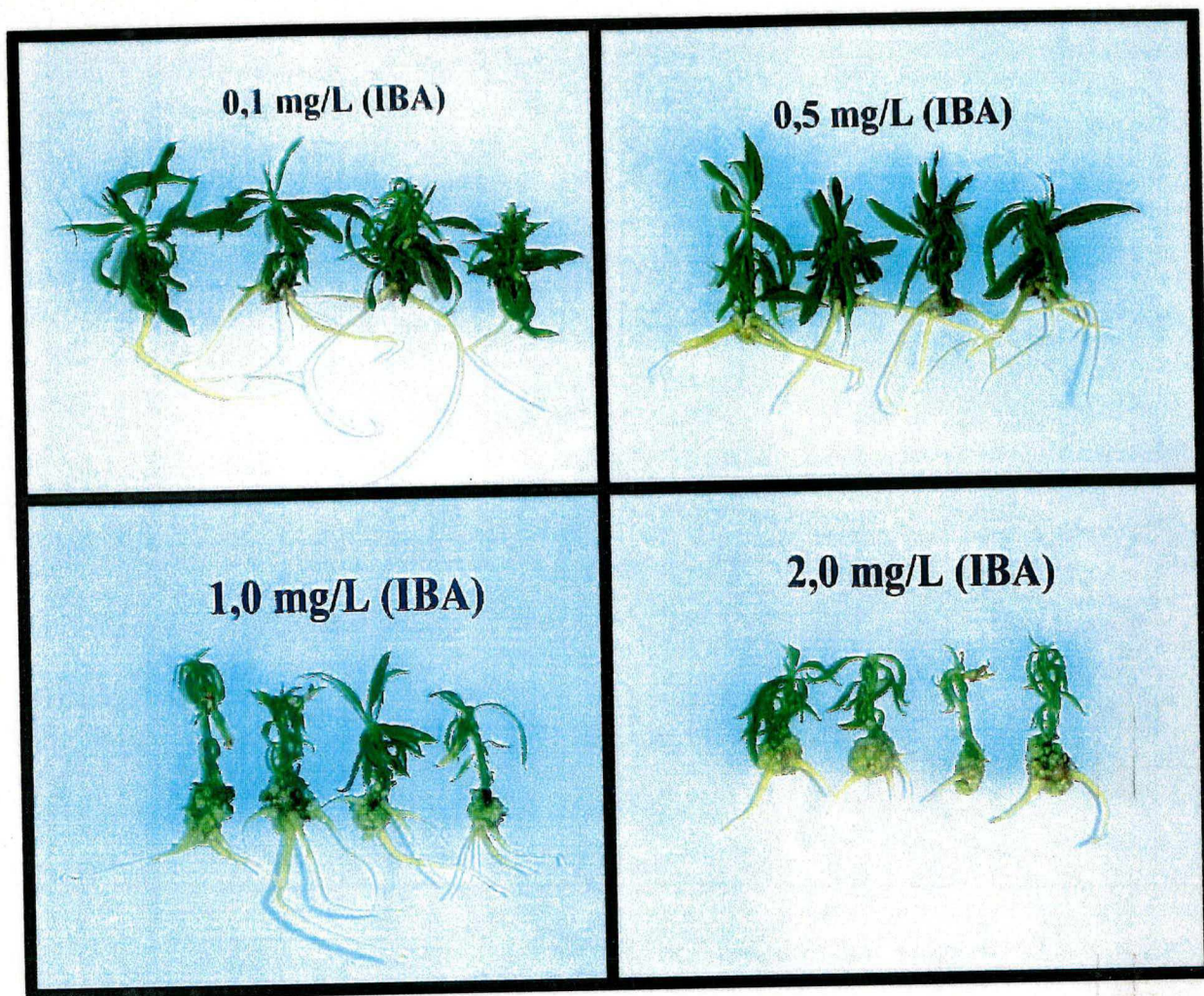
**Figura 5.** Valores médios totais para número de raízes por explantes no enraizamento *in vitro* dos porta-enxerto de *Prunus* ‘VP417’, ‘VP411’, ‘GF677’ e ‘Capdeboscq’ aos 15 dias de cultura *in vitro*, (n=20). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.



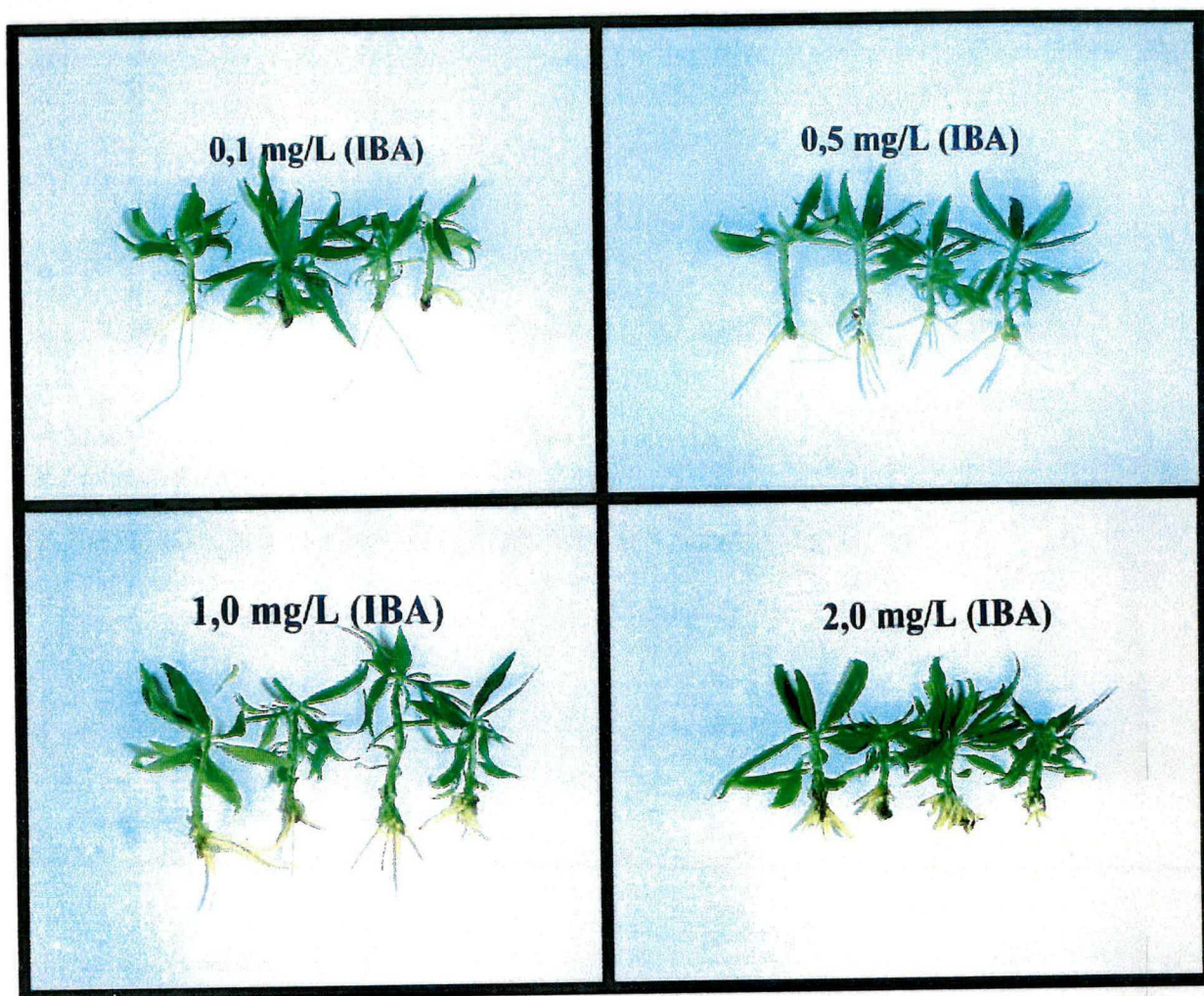
**FIGURA 6.** Efeito de IBA para número de raízes por explante no enraizamento *in vitro* dos porta-enxertos de *Prunus* ‘Capdeboscq’, ‘VP417’, ‘VP411’ e ‘GF677’ após 15 dias cultura *in vitro*, (n=5). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.



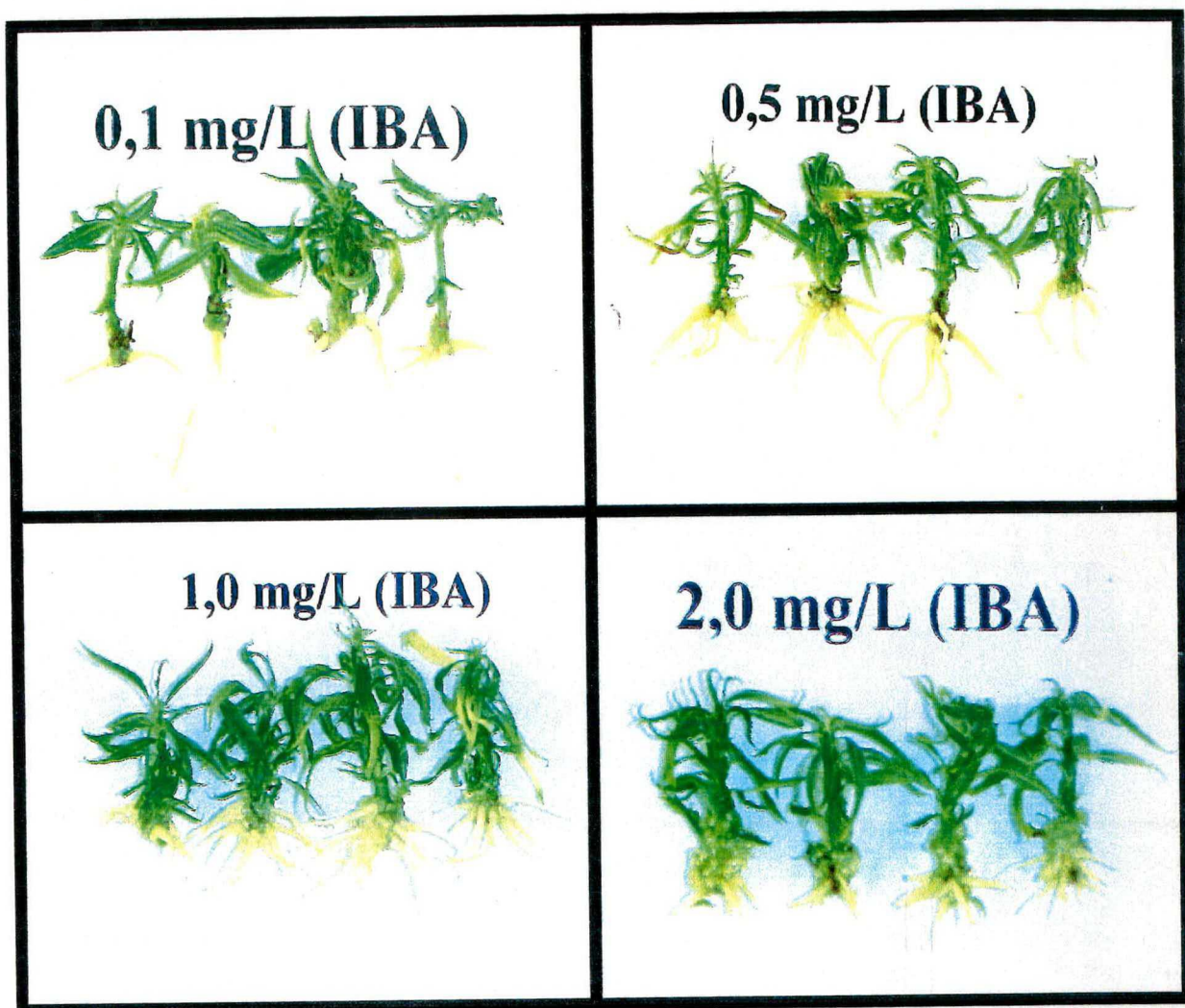
**FIGURA 7.** Aspectos morfogénéticos no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus*, seleção 'VP417', submetido a diferentes concentrações de IBA, após 15 dias de cultura *in vitro*. UFSC, Florianópolis-SC, 2002.



**FIGURA 8.** Aspectos morfogênicos no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus*, seleção 'VP411', submetido a diferentes concentrações de IBA, após 15 dias de cultura *in vitro*. UFSC, Florianópolis-SC, 2002.



**FIGURA 9.** Aspectos morfogênicos no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* 'GF677', submetido a diferentes concentrações de IBA, após 15 dias de cultura *in vitro*. UFSC, Florianópolis-SC, 2002.



**FIGURA 10.** Aspectos morfogénéticos no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* 'Capdeboscq', submetido a diferentes concentrações de IBA, após 15 dias de cultura *in vitro*. UFSC, Florianópolis-SC, 2002.



## ACLIMATIZAÇÃO DE PORTA-ENXERTOS DE *Prunus* MICROPROPAGADOS

**RESUMO** – A micropropagação tem apresentado uma alta frequência de perda de plantas, quando estas são transferidas para condições *ex vitro*. As condições da cultura *in vitro* tem determinado, para algumas espécies, a formação de plantas com morfologia, anatomia e fisiologia que dificultam a sua aclimatização. O objetivo deste trabalho foi avaliar a percentagem de sobrevivência de plantas dos porta-enxertos de *Prunus*, ‘Capdeboscq’, ‘GF677’, ‘VP411’ e ‘VP417’ durante o processo de aclimatização. Brotos com 2-3 cm foram introduzidos em meio de enraizamento, com sais e vitaminas de Lepoivre, com as concentrações de 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 mg.l<sup>-1</sup> de IBA. Após 15 dias em fase de enraizamento *in vitro*, as plantas foram transferidas para bandejas alveoladas contendo substrato comercial Plantmax ®. As bandejas foram colocadas em caixas plásticas fechadas com uma lâmina de vidro transparente e mantidas durante 15 dias em sala de aclimatização, com temperatura de 27±1°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 60 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Posteriormente, estas foram transferidas para câmara de nebulização intermitente, permanecendo por 15 dias. Os resultados demonstraram que a percentagem de sobrevivência das plantas foi afetada significativamente pela concentração de IBA, pelo genótipo e pela interação concentração x genótipo. Verificou-se que as melhores taxas de sobrevivência obtidas para os porta-enxertos foram 92,0% para ‘Capdeboscq’ na concentração de 1,0 mg.l<sup>-1</sup> de IBA, 80,0% para ‘VP417’ na concentração de 0,5 mg.l<sup>-1</sup>, 84,0% para ‘VP411’ e 64,0% para ‘GF677’ com 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de IBA. A formação de calos na base dos explantes afetou negativamente a sobrevivência das plantas.

**Termos para indexação:** Fruticultura, pessegueiro, enraizamento *in vitro*, IBA

## ACCLIMATIZATION OF MICROPROPAGATED *Prunus* ROOTSTOCKS

**ABSTRACT** – Micropropagation frequently shows high rates of losses in survival when the plants are transferred to *ex vitro* conditions. The *in vitro* culture conditions may determine in some species, the formation of plants with altered morphology, anatomy and physiology that affect their acclimatization. The objective of the present work was to evaluate the rate of plant survival during acclimatization of the *Prunus* rootstocks ‘Capdeboscq’, ‘GF677’, ‘VP411’ and ‘VP417’. Shoots 2-3 cm long were inoculated in rooting medium, constituted of salts and vitamins of Lepoivre supplemented with IBA (0,1; 0,5; 1,0 and 2,0 mg.l<sup>-1</sup>). After 15 days, the plants were transferred to Styrofoam trays with cells containing commercial mixed soil Plantmax ®. The trays were placed in plastic boxes closed with a transparent glass plate and maintained during 15 days in acclimatization room with temperature of 27 ± 1°C, 16 hours of photoperiod and 60 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> of light irradiation. Further, the plantlets were transferred to intermittent nebulization chamber where they were kept for 15 days. The results showed that the plant survival rate was significantly affected for the IBA treatments, genotype and genotype x IBA concentration interaction. The best survival rates obtained were ‘Capdeboscq’ (92,0%) for the concentration of 1 mg.l<sup>-1</sup>, ‘VP417’ (80,0%) for the concentration of 0,5mg.l<sup>-1</sup>, ‘VP411’ (84,0%) and ‘GF677’ (64,0%) with 0,1 mg.l<sup>-1</sup> of IBA. The callus formation on the base of explants negatively affected plant survival.

**Index terms:** fruit crop, peach tree, *in vitro* rooting, IBA.

## INTRODUÇÃO

A micropropagação tem sido extensivamente usada para multiplicação de muitas espécies de plantas. Entretanto, sua utilização mais ampla está limitada pela alta frequência de danos e/ou perda de plantas, quando estas são transferidas para condições *ex vitro* (Pospíšilová *et al.*, 1999b).

Durante as fases da cultura *in vitro*, as plantas crescem sob condições especiais, em ambientes fechados, sem trocas gasosas, com alta umidade do ar, baixa intensidade luminosa e, utilizando açúcares como fontes de carbono e energia (Preece e Sutter, 1991; Sciutti e Morini, 1993; Pospíšilová *et al.*, 1999b).

Estas condições podem determinar a formação de plantas com morfologia, anatomia e fisiologia anormais, de difícil aclimatização. Estas anormalidades geradas pela cultura *in vitro* são alterações na cutícula, cera epicuticular, não funcionalidade do aparato estomático e, conseqüentemente, expressiva perda de água das células e diminuição do processo fotossintético (Marín *et al.*, 1988; Preece e Sutter, 1991; Desjardins, 1995; Pospíšilová *et al.*, 1999ab e 2000). Para Preece e Sutter (1991), em muitas espécies de plantas, as folhas formadas *in vitro* não são capazes de manter o equilíbrio hídrico nas condições *ex vitro*, ocorrendo assim, stress hídrico e redução no crescimento. Além disso, pode ocorrer uma excessiva transpiração da parte aérea, em especial folhas, com uma incompatível ou ineficiente absorção e transferência de água entre as raízes e brotos.

No entanto, para diferentes autores, Borkowska (1985); Campana *et al.* (1994); Radice *et al.* (1999), o processo de aclimatização no gênero *Prunus* têm sido positivo com índice de sobrevivência variando de 84-93%. Para Marín *et al.* (1988), o xilema de *Prunus cerasifera* demonstrou ser contínuo e funcional entre as raízes e brotos de enraizados *in vitro*. A utilização de auxinas na fase de indução do enraizamento *in vitro* tem demonstrado ser eficiente na taxa de sobrevivência das plantas na fase de aclimatização (Pietropaolo e Reisch, 1984; Filiti *et al.*, 1987; Al-Maarri *et al.*, 1994; Campana *et al.*, 1994; Yepes e Aldwinckle, 1994; Harada e Murai, 1996; Murai *et al.*, 1997).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o índice de sobrevivência de plantas enraizadas *in vitro* e o efeito do IBA no processo de aclimatização dos porta-enxertos de *Prunus* 'Capdeboscq', 'GF677' e as seleções 'VP411' e 'VP417'.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

As variedades de porta-enxertos de *Prunus* 'Capdeboscq' e 'GF677' e as seleções 'VP411' e 'VP417' (seleções da Vitroplanta Biotecnologia Ltda – Videira-SC) foram estabelecidas e multiplicadas *in vitro* por meio da cultura de ápices caulinares e gemas laterais de brotos em crescimento ativo, obtidos de plantas matrizes mantidas em casa de vegetação no Departamento de Fitotecnia, CCA, UFSC.

### Enraizamento *in vitro*

Os brotos com 2-3 cm foram inoculados em meio de enraizamento, com sais e vitaminas de Lepoivre (Quoirin *et al.*, 1977) suplementado com sacarose (20,0 g.l<sup>-1</sup>), ágar (7,0 g.l<sup>-1</sup>) e ácido indolbutírico (IBA) nas concentrações de 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 mg.l<sup>-1</sup>. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,2-5,3 antes da autoclavagem à 121°C durante 15 minutos.

O material vegetal foi mantido em câmara de crescimento com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, fornecidas por lâmpadas fluorescentes brancas frias.

### Aclimatização

Após 15 dias em fase de enraizamento *in vitro*, as plantas foram retiradas dos frascos, lavadas em água corrente para remover o meio de cultura aderido às raízes e plantadas em bandejas alveoladas contendo o substrato comercial Plantmax ®. As bandejas foram colocadas em caixas plásticas fechadas com uma lâmina de vidro transparente e mantidas durante 15 dias em sala de aclimatização com temperatura de 27±1°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 60 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Posteriormente, estas foram transferidas para câmara de nebulização intermitente e, após 15 dias, as plantas foram avaliadas quanto a percentagem de sobrevivência.

### **Análises estatísticas**

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente ao acaso, com cinco explantes por repetição e cinco repetições por tratamento. Os dados referentes ao efeito do genótipo na percentagem de sobrevivência das plantas, foram submetidos à análise de Variância (ANOVA) com teste de separação de médias SNK (5%), e os dados em relação ao efeito do IBA para a média dos porta-enxertos e também, para cada genótipo foram submetidos à análise de regressão, conforme recomendação de Sokal e Rohlf (1995).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A percentagem de sobrevivência das plantas foi afetada significativamente pela concentração de IBA, pelo genótipo e pela interação concentração x genótipo.

Os resultados médios totais para a percentagem de sobrevivência entre os porta-enxertos não diferiram significativamente (Tabela 1). Estes resultados estão de acordo com os de Morini *et al.* (1991), que não obtiveram diferenças significativas entre diferentes clones de *Prunus cerasifera* na aclimatização, com taxas de sobrevivência de 60-70%. Verifica-se que os porta-enxertos apresentaram diferentes respostas para a percentagem de sobrevivência em relação as concentrações de IBA testadas (Figura 1). O porta-enxerto 'Capdeboscq' apresentou maior taxa de sobrevivência (92%) na concentração de 1,0 mg.l<sup>-1</sup> de IBA, enquanto que a seleção 'VP417' com 80% de sobrevivência na concentração de 0,5 mg.l<sup>-1</sup>, a seleção 'VP411' e o 'GF677', respectivamente com 84 e 64% na concentração de 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de IBA. Na Figura 2 são apresentados os valores médios do efeito de diferentes concentrações de IBA para a os porta-enxertos. Verifica-se que, no geral, a concentração que proporcionou uma maior percentagem de sobrevivência foi a de 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de IBA.

A redução média da taxa de sobrevivência para os porta-enxertos, com o aumento da concentração de IBA, pode estar relacionada com a toxicidade determinada pelo excesso de auxina e/ou a alta formação de calos na base dos explantes, para a maioria dos porta-enxertos (Figuras 2 e 3). A formação de calos

diferiu para os porta-enxertos testados: o 'GF677' não apresentou formação de calos com o uso de IBA, porém notou-se uma queda acentuada das folhas nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg.l<sup>-1</sup>. O porta-enxerto 'Capdeboscq' apresentou formação de calos somente na concentração de 2,0 mg.l<sup>-1</sup>, enquanto que as seleções 'VP417' e 'VP411' tiveram formação de calos a partir da concentração de 1,0 mg.l<sup>-1</sup> de IBA. Campana *et al.* (1994) verificaram que na aclimatização do *Prunus* 'Damas GF1869' enraizado *in vitro*, a sobrevivência das plantas foi afetada significativamente com a utilização de 5,0 mg.l<sup>-1</sup> de IBA. Para estes autores, a abundante formação de calos reduziu significativamente as conexões vasculares entre as raízes formadas, a partir dos calos, e a base dos brotos. Além disso, estas raízes foram ineficientes para suportar os requerimentos de evapotranspiração nas condições *ex vitro*. Observa-se que para várias espécies a utilização de altas concentrações de auxinas resultou na formação de calos e raízes anormais, afetando a sobrevivência dos explantes durante a aclimatização (Dustan, 1981; Welander, 1983; Al-Maarri *et al.*, 1994; Yepes e Aldwinckle, 1994).

Verificou-se que a formação de calos na base dos explantes, durante a fase de enraizamento, também pode inibir a formação de raízes no substrato durante a fase de aclimatização. Neste trabalho, observou-se que os explantes que não formaram raízes *in vitro*, formaram-nas posteriormente no substrato, porém em resposta à concentrações menores de IBA (0,1 e 0,5 mg.l<sup>-1</sup>). Resultados similares foram obtidos por Pietropaolo e Reisch (1984) na aclimatização de *Prunus domestica*. Estes autores, notaram, também, que explantes não enraizados *in vitro* desenvolveram sistema radicular no substrato, com sobrevivência nas condições *ex vitro*.

Observou-se, na sala de aclimatização, que o início do crescimento da gema apical e a formação de novas folhas ocorreram a partir da primeira semana, com destaque e superioridade das plantas que foram enraizadas nas menores concentrações de IBA (0,1; 0,5 e 1,0 mg.l<sup>-1</sup>). As plantas em que o sistema radicular foi submetido à concentração de 2,0 mg.l<sup>-1</sup> retardaram o crescimento da parte aérea e apresentaram um menor crescimento.

A redução ou a parada de crescimento da parte aérea durante a fase de aclimatização pode comprometer a sobrevivência das plantas (Marín e Gella, 1987). Para estes autores, a parada do crescimento pode estar relacionada diretamente ao

efeito do IBA no crescimento do ápice e/ou ocorrência de uma competição entre o ápice e as raízes pelo crescimento. O uso de baixas concentrações de IBA pode induzir um bom enraizamento, sem afetar negativamente o crescimento da parte aérea.

## CONCLUSÕES

- 1 O processo de aclimatização para os porta-enxertos de *Prunus* foi eficaz com taxas de 64 a 92% de sobrevivência, dependendo do genótipo.
- 2 A concentração de IBA na fase de enraizamento afetou significativamente a taxa de sobrevivência das plantas durante a aclimatização.
- 3 Reduções nas concentrações de IBA na fase de enraizamento favoreceram a sobrevivência das plantas.
- 4 A formação de calo na fase de enraizamento *in vitro* reduziu a sobrevivência das plantas na aclimatização.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-MAARRI, K.; ARNAUD, Y.; MIGINIAC, E. Micropropagation of *Pyrus communis* cultivar Passe Crassane seedlings and cultivar Williams: Factors affecting root formation *in vitro* and *ex vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.58, p. 207-214, 1994.
- BORKOWSKA, B. Micropropagation of sour cherry, cultivar Schattenmorelle, **Acta Horticulturae**, Leuven, v.169, p.329-333, 1985.
- CAMPANA, B.M.; CASTAGNARI, F.; COVATTA, F.; HENNINGS, M.; POLERO, H.J. Enraizamiento *in-vitro* del portainjerto Damas GF 1869 (*Prunus insititia* x *Prunus spinosa*), **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.16, n.3, p. 85-94, 1994.
- DESJARDINS, Y. Photosynthesis *in vitro* – on the factors regulating CO<sub>2</sub> assimilation in micropropagation systems, **Acta Horticulturae**, Leuven, v.393, p.45-61, 1995.

- DUSTAN, D.T. Transplantation and post-transplantation of micropropagated tree-fruit rootstocks, **Proc. Intern. Plant Propag. Soc.**, v. 31, p. 39-45, 1981.
- FILITI, N.; MONTUSCHI, N.; ROSATI, P. *In vitro* rhizogenesis: histo-anatomical aspects on *Prunus* rootstock, **Advances in Horticultural Science**, v.1, p. 34-38, 1987.
- HARADA, H.; MURAI, Y. Micropropagation of *Prunus mume*, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.46, p.265-267, 1996.
- MARÍN, J.A.; GELLA, R. Acclimatization of the micropropagated cherry rootstock 'Masto de Montañana' (*Prunus cerasus* L.), **Acta Horticulturae**, Leuven, v.212, p. 603-606, 1987.
- MARÍN, J.A.; GELLA, R.; HERRERO, M. Stomatal structure and functioning as a response to environmental changes in acclimatized micropropagated *Prunus cerasus* L., **Annals of Botany**, v.62, p. 663-670, 1988.
- MORINI, S.; LORETI, F.; SCIUTTI, R. Response of some Mr.S. plum clones to *in vitro* propagation, **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 283, p. 207-212, 1991.
- MURAI, Y.; HARADA, H.; YAMASHITA, H. *In vitro* propagation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cv. 'Bakuoh Junkyou', **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Tokyo, v.66, p. 475-480, 1997.
- PIETROPAOLO, P.A.; REISCH, B.I. Micropropagation of 'Stanley' plum, **HortScience**, Alexandria, v.19, n.4, p. 535-536, 1984.
- POSPÍSILOVÁ, J.; HAISEL, D.; SYNKOVA, H.; CATSKY, J.; WILHELMOVÁ, N.; PLZÁKOVÁ, S.; PROCHÁRKOVÁ, D.; SRÁMEK, F. Photosynthetic pigments and gas exchange during *ex vitro* acclimation of tobacco plants as affected by CO<sub>2</sub> supply and abscisic acid, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.61, p.125-133, 2000.
- POSPÍSILOVÁ, J.; SYNKOVÁ, HAISEL, D.; CATSKÝ, WILHELMOVÁ, N. Effect of elevated CO<sub>2</sub> concentration on acclimation of tobacco plantlets to *ex vitro* conditions, **Journal of Experimental Botany**, v.50, n.330, p. 119-126, 1999a.
- POSPÍSILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLECEK, P.; HAISEL, D.; PLZÁKOVÁ, S. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions, **Biologia Plantarum**, v.42, n.4, p. 481-497, 1999b.

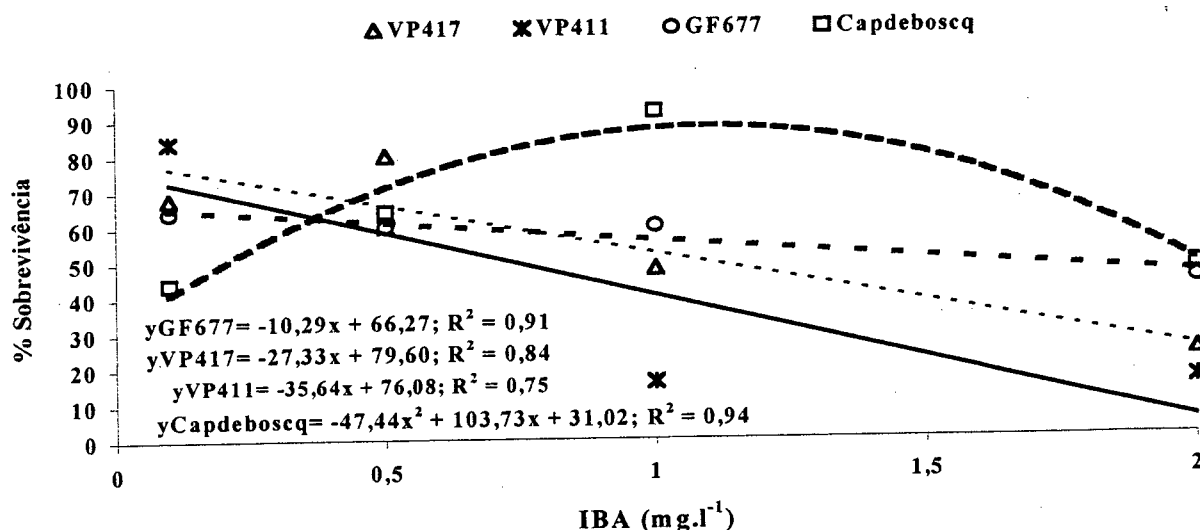


- PREECE, J.E.; SUTTER, E.G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field, In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Eds.), *Micropropagation. Technology and Application*, Kluwer, Dordrecht, 1991, p. 71-93.
- QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P.; BOXUS, P. Un premier bilan de 10 années de recherches sur les cultures de méristèmes et la multiplication *in vitro* de fruitiers ligneux. **C.R. Rech. Agron.** Gembloux, p.93-117, 1977.
- RADICE, S.; PERELMAN, P.E.; CASO, O.H. Propagación clonal de tres portainjertos del género *Prunus* para la Pampa Deprimida, **PHYTON**, Buenos Aires, v.64, p.149-156, 1999.
- SCIUTTI, R.; MORINI, S. Effect of relative humidity in *in vitro* culture on some growth characteristics of a plum rootstock during shoot proliferation and rooting and on plantlet survival, **Advances in Horticultural Science**, v.7, p. 153-156, 1993.
- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**. New York: W.H. Freeman and Company, 1995.
- WELANDER, M. *In vitro* rooting of the apple rootstock M26 in adult and juvenile growth phases and acclimatization of the plantlets, **Physiologia Plantarum**, v.58, p. 231-238, 1983.
- YEPES, L.M.; ALDWINCKLE, H.S. Micropropagation of thirteen *Malus* cultivars and rootstock, and effect of antibiotics on proliferation, **Plant Growth Regulation**, v.15, p.55-67, 1994.

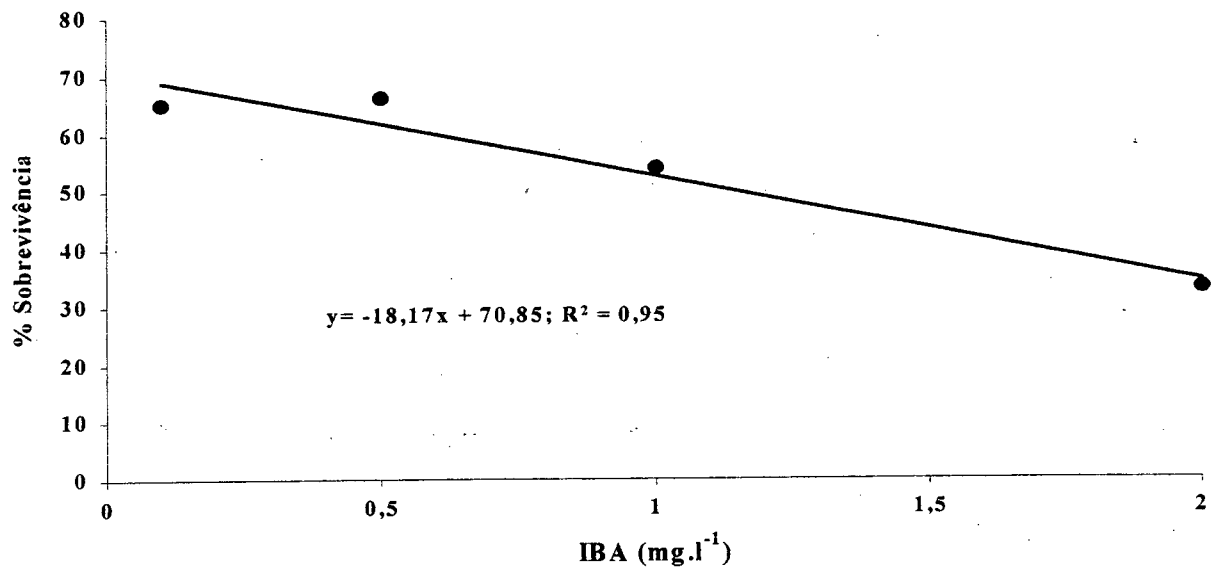
**TABELA 1.** Valores médios totais do efeito do genótipo para a percentagem de sobrevivência na aclimatização dos porta-enxertos de *Prunus* ‘VP417’, ‘VP411’, ‘VP77’, ‘Capdeboscq’, aos 30 dias de cultura *ex vitro*, (n=5). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.

Porta-enxertos	Sobrevivência (%)
‘VP417’	55,0 a
‘VP411’	44,0 a
‘GF677’	57,0 a
‘Capdeboscq’	62,0 a
CV(%)	22,1

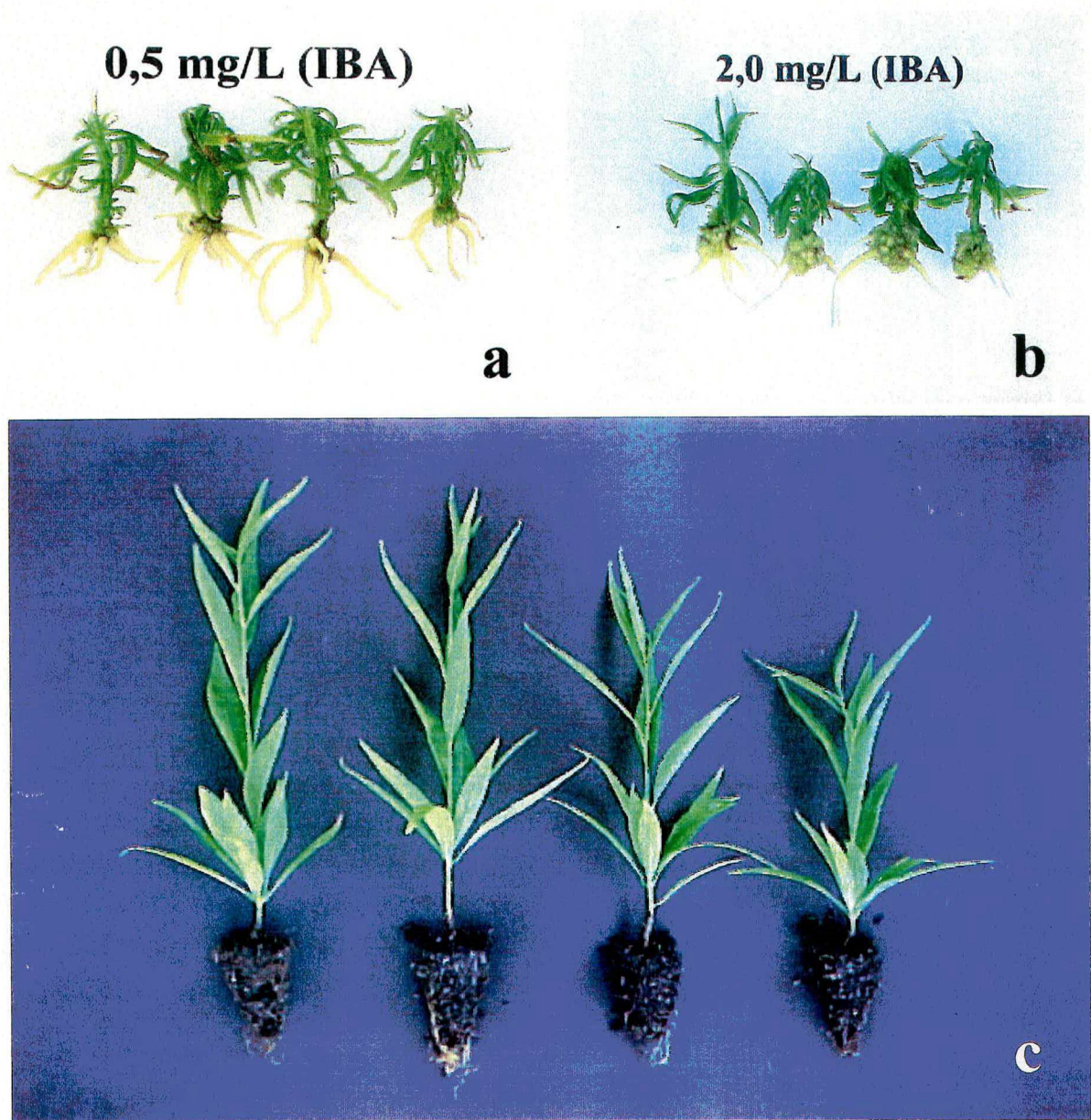
Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem significativamente pelo teste SNK (5%).



**FIGURA 1.** Efeito de IBA na percentagem de sobrevivência durante a aclimatização dos porta-enxertos de *Prunus* ‘VP417’, ‘VP411’, ‘GF677’ e ‘Capdeboscq’, 30 dias de cultura *ex vitro*, (n=5). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.



**FIGURA 2.** Valores médios totais do efeito de IBA na percentagem de sobrevivência durante a aclimatização dos porta-enxertos de *Prunus* ‘VP417’, ‘VP411’, ‘GF677’ e ‘Capdeboscq’, após 30 dias em cultura *ex vitro*, (n=20). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.



**FIGURA 3.** Aspectos do enraizamento *in vitro* e posterior aclimatização de plantas de porta-enxertos de *Prunus*. a) Brotações sem a formação de calos ('Capdeboscq'); b) brotações com alta formação de calos ('VP417') e, c) plantas após 30 dias em processo de aclimatização ('Capdeboscq'). UFSC, Florianópolis-SC, 2002.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a finalidade de avançar o conhecimento científico e tecnológico referente a propagação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus*, foram utilizados como explantes eixos embrionários, gemas laterais e ápices caulinares. Através destes, foi possível o estudo de metodologias para o estabelecimento, a multiplicação, o enraizamento *in vitro* e a aclimatização das plantas.

A metodologia de manutenção de plantas matrizes em casa de vegetação, com controles permanentes em relação à nutrição e patógenos (fungos e bactérias), foi determinante dos bons resultados durante as fases de introdução e estabelecimento *in vitro*, quando comparada com a utilização de explantes diretamente do campo, em trabalhos realizados anteriormente (dados não apresentados).

O processo de desinfestação dos explantes utilizados (embriões, ápices caulinares e gemas laterais) mostrou-se eficiente para o estabelecimento *in vitro*, com taxas de sobrevivência e contaminação adequadas para o continuidade do processo de cultura *in vitro*.

A cultura de embriões demonstrou ser uma técnica eficiente para o estabelecimento e para uma posterior multiplicação *in vitro* dos clones (*seedlings*). Os eixos embrionários apresentaram um alto potencial organogenético *in vitro*. A utilização do GA<sub>3</sub> não demonstrou efeito significativo na taxa de germinação, porém induziu o crescimento da parte aérea e reduziu o desenvolvimento do sistema radicular. Os clones obtidos a partir da cultura de embriões apresentaram diferentes potenciais de multiplicação *in vitro*.

No estabelecimento *in vitro* dos porta-enxertos de *Prunus* 'Capdeboscq', 'GF677, e a seleção 'VP411', ápices caulinares apresentaram maior sobrevivência e menor contaminação. Porém, os resultados mostraram que o processo de estabelecimento *in vitro* pode ser realizado tanto por ápices caulinares como por gemas laterais. Os porta-enxertos 'VP411', 'Capdeboscq' e 'GF677' demonstraram um alto potencial para a multiplicação *in vitro*, apresentando respectivamente 16,0; 14,7 e 10,5 brotos por explante.

BAP mostrou-se a citocinina mais eficiente, apresentando os melhores resultados na multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* 'Capdeboscq'. A taxa máxima obtida foi 25,9 brotos por explante na concentração de 1,5 mg.l<sup>-1</sup> de BAP. Porém, ocorreu uma diminuição da altura dos brotos em relação ao aumento da concentração das diferentes citocininas utilizadas, o que determinou a utilização de 0,5 mg.l<sup>-1</sup> de BAP, nos experimentos posteriores com outros porta-enxertos.

O intervalo de 14 dias permitiu a obtenção das maiores taxas de multiplicação ao longo das subculturas. Intervalos de subculturas como 28 e 35 dias, induziram um aumento na percentagem de brotos hiperhídricos e uma redução nas taxas de multiplicação. O intervalo entre as subculturas demonstrou ser um fator determinante para o sucesso da multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* 'Capdeboscq'.

Na fase de enraizamento, os porta-enxertos 'Capdeboscq', 'GF677', 'VP411' e 'VP417' apresentaram diferentes potenciais para o enraizamento *in vitro*. A presença de IBA foi determinante para o enraizamento, porém o requerimento foi específico para o genótipo. O número de raízes aumentou com a elevação da concentração de IBA, no entanto, um efeito inverso foi observado para o comprimento das raízes. Concentrações superiores a 1,0mg.l<sup>-1</sup> de IBA induziram alta formação de calos na base dos explantes, porém este efeito também foi determinado pelo genótipo.

O processo de aclimatização foi eficiente com resultados de 64 a 92%. A formação de calos na base dos explantes durante à fase de enraizamento afetou a sobrevivência das plantas. Os resultados demonstraram que concentrações reduzidas de IBA na fase de enraizamento podem favorecer a sobrevivência *ex vitro*.

A utilização do meio de cultura de Lepoivre mostrou-se eficaz para as diferentes fases estudadas, porém há necessidade de estudos em relação à concentração mineral, visando resolver problemas como a hiperhidricidade, presente neste trabalho.

Este estudo confirmou que a variabilidade genética é expressada *in vitro* e deve ser considerada nas diferentes fases: cultura de embriões, multiplicação, enraizamento e na aclimatização das plantas de prunáceas.