

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



Dissertação

Micropropagação do porta-enxerto Mr. S. 2/5 (*Prunus cerasifera* x *Prunus spinosa*)

Cibele Merched Gallo

Pelotas, fevereiro de 2012

CIBELE MERCHED GALLO

Bióloga

**MICROPROPAGAÇÃO DO PORTA-ENXERTO Mr. S. 2/5 (*Prunus cerasifera* x
Prunus spinosa)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Fisiologia Vegetal).

Orientador: Dr^a. Elizete Beatriz Radmann

Co-Orientadores: Prof. Dr. Valmor João Bianchi

Prof. Dr. José Antonio Peters

Pelotas, 2012

Banca Examinadora:

Dra. Elizete Beatriz Radmann (Presidente)

Dr. Leonardo Ferreira Dutra

Dr. Paulo Celso de Mello Farias

Dra. Márcia Vaz Ribeiro

Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante.

(Albert Schweitzer. Nobel da paz 1952)

A minha mãe, Guiga, por estar sempre ao meu lado, pelo carinho e amizade dedicados.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Guiga, pelo amor incondicional e por acreditar em mim mais do que eu mesma. Esta conquista só foi possível por tê-la ao meu lado.

A minha família em especial as minhas avós Maria Ceci Vilanova e Lacy Bacchieri e minhas tias Adriane Sabany e Darlene Sabany, que me apóiam e acreditam na minha capacidade desde que eu nasci e que vibram e sentem-se orgulhosas com minhas conquistas.

Ao meu pai, Tércio Gallo, pelo apoio essencial durante a graduação, que me possibilitou esta conquista.

Às amigas desde a graduação, Laura Faria Santos, Maria Lúcia Balbinoti e Mariana Mendes, em especial a Maria Lúcia, que dedicou seu tempo me ouvindo falar sobre Fisiologia Vegetal para os seminários, pelo apoio, incentivo, por me transmitir a segurança de saber que sempre posso contar com ela, e pelos momentos de descontração proporcionados, os quais me recarregaram as energias.

À amiga e colega de laboratório Cristina Ritterbusch, pelo carinho e amizade, por me ajudar em todas as etapas, desde a montagem de experimentos, até a elaboração da apresentação. Por voluntariamente ficar acordada até tarde e abrir mão de curtir dias ensolarados para me ajudar, por me animar com palavras de apoio e incentivo, quando já estava sem energias.

A Dr^a. Elizete Beatriz Radmann, pela orientação, pelos inúmeros ensinamentos, pelo tempo praticamente integral disponível para me atender e tirar dúvidas, pela paciência e por não só ter me mostrado o caminho como também nunca ter me deixado percorrê-lo sozinha.

Às colegas e amigas que adquiri nestes dois anos, Luciana Machado, Daniela De Conti, Aline Messchmidt, Mirian Ribeiro e Alitcia Kleinowski, pela ajuda sempre tão especial e pelos bons momentos que passamos no laboratório.

Às minhas paixões caninas, Taquinho, Lilica e Belinha, pela amizade, pelos beijos nos momentos que estive triste, por deitarem a cabeça em meu colo e não deixar eu me sentir sozinha, e pelos sorrisos diários em cada chegada.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. José Antônio Peters, por demonstrar confiança ao me aceitar em 2008 como estagiária do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, e pelos ensinamentos durante este período, assim como pela importante participação neste trabalho.

Ao também co-orientador Prof. Dr. Valmor João Bianchi, pela disponibilidade, atenção e importante contribuição neste trabalho.

Aos colegas de laboratório, em especial ao Anderson Feijó, pela sempre bem-vinda ajuda, que muitas vezes nem precisei solicitar.

Aos colegas que ingressaram comigo no mestrado, em especial a Cristina Huther e Letícia Rickes, que desde o início sempre me ajudaram quando precisei.

A todos os funcionários e professores, pelo auxílio prestado quando necessitei em especial às secretárias do PPGFV, Suzi e Sandra, pelo carinho e atenção comigo, e por sempre me receberem com um sorriso.

À Universidade Federal de Pelotas que me deu a oportunidade de ingressar no Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

A todos que de alguma forma contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

E acima de tudo a Deus, por sempre me mostrar o melhor caminho, por nunca me abandonar, e principalmente, por ter colocado cada uma das pessoas acima citadas em minha vida.

AGRADEÇO

SUMÁRIO

Resumo.....	9
Abstract.....	11
1- Introdução.....	13
2- Capítulo 1.....	17
2.1-Introdução.....	17
2.2- Estabelecimento.....	19
2.3-Material e métodos.....	19
2.4-Resultados e discussão.....	21
2.5-Conclusões.....	28
3-Capítulo 2.....	29
3.1-Introdução.....	29
3.2-Material e métodos.....	30
3.3-Resultados e discussão.....	32
3.4-Conclusões.....	43
4- Referências.....	44

RESUMO

GALLO, Cibele Merched. **Micropropagação do porta-enxerto Mr. S. 2/5 (*Prunus cerasifera* x *Prunus spinosa*)**, 2012. 54f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas.

Apesar das plantas frutíferas serem propagadas por vários métodos, as mudas comerciais de prunáceas são obtidas por meio da enxertia de uma cultivar copa sobre um porta-enxerto. No Rio Grande do Sul pela proximidade das indústrias de conserva, os porta-enxertos são originários a partir do descarte dos caroços de cultivares de maturação tardia, aspecto este que permite a ocorrência de misturas varietais e conseqüentemente a formação de pomares com plantas desuniformes. Por outro lado, a propagação vegetativa leva à formação de plantas uniformes, pois mantém as características da planta matriz, podendo esta ser realizada por diversos métodos, como por exemplo, a micropropagação. Assim, desenvolver protocolos de propagação vegetativa irá contribuir no processo de produção de mudas de prunáceas na região Sul do Brasil. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi otimizar a multiplicação e o enraizamento *in vitro*, bem como a aclimatização das brotações provenientes do meio de enraizamento com o porta-enxerto 'Mr. S. 2/5'. Para tal, o trabalho foi dividido em dois capítulos, um sobre a multiplicação *in vitro* e o segundo referente ao enraizamento *in vitro* e aclimatização. No primeiro capítulo foram testados a composição de sais, o pH do meio de cultura, a fonte e a concentração de carboidrato e a concentração de AIB. No segundo capítulo, objetivou-se avaliar o efeito da concentração de AIB e o tempo de permanência das brotações no meio de cultura, sobre o enraizamento *in vitro* e a sobrevivência dessas na fase de aclimatização. Na etapa de multiplicação, explantes cultivados em meio MS com pH 5,2 apresentaram o maior número de brotações. Entretanto, a fonte e a concentração de carboidrato não exerceram influência sobre o número e o

comprimento das brotações formadas. Já, com relação às concentrações de AIB, meios suplementados com $0,06 \text{ mg L}^{-1}$ apresentaram maior formação de brotações, porém sem influência significativa para o comprimento destas. No que diz respeito à fase de enraizamento *in vitro* e de aclimatização, brotações cultivadas em meio de cultura com $1,6 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB por 12 dias, apresentaram alta percentagem de enraizamento, aproximadamente, 90%, bem como maior percentagem de plantas sobreviventes na fase de aclimatização.

Palavras-chave: *Prunus*. Multiplicação *in vitro*. Enraizamento. Aclimatização.

ABSTRACT

GALLO, Cibele Merched. **Micropropagation of rootstock Mr. S. 2/5 (*Prunus cerasifera* x *Prunus spinosa*)** 2012. 54p. Dissertation (Master) – Post Graduation Program in Plant Physiology. Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil

Although fruiting plants can be propagated by several methods, commercial seedlings of *Prunus* are obtained by grafting a scion on a rootstock. In Rio Grande do Sul State, because of the proximity of the canning industry, the rootstocks originate from the disposal pits of late maturing cultivars, allowing the occurrence of varietal mixtures, and consequently, the formation of orchards with uneven plants. On the other hand, vegetative propagation leads to the formation of uniform plants, because they keep the characteristics of the mother-plant. This propagation may be made by several methods, for example, micropropagation. Thus, to develop protocols for vegetative propagation will contribute to the production of seedlings of *Prunus spp.* in southern Brazil. The aim of this work was to optimize *in vitro* multiplication and rooting, and the acclimatization of shoots from the rooting medium with rootstock Mr. S. 2/5. This work was divided into two chapters, one on the *in vitro* multiplication, and the second refers to *in vitro* rooting and acclimatization. In the first chapter, composition of salts, culture medium pH, source and concentration of carbohydrate, and concentration of IBA were tested. In the second chapter, the objective was to evaluate the effect of IBA concentration, and the permanence time of the shoots in the culture medium, *in vitro* rooting, and their survival during acclimatization phase. At the multiplication stage, the explants cultivated in MS medium, pH 5.2, showed a higher number of shoots. However, the source and concentration of carbohydrate had no influence on number and length of the shoots formed. In relation to IBA concentrations, supplemented mediums with 0.06mgL^{-1} increased formation of

shoots, but had no significant influence on their length. With respect to *in vitro* rooting phase and acclimatization, shoots cultivated in a culture medium with 1.6mgL^{-1} IBA, during 12 days, showed high percentage of rooting, approximately 90%, as well as higher percentage of surviving plants in the acclimatization phase.

Key words: *Prunus*. *In vitro* multiplication. Rooting. Acclimatization

1 Introdução

A cultura do pessegueiro é uma das principais frutíferas cultivadas na região Sul do Brasil, sendo de grande importância econômica para o Rio Grande do Sul (FACHINELLO et al., 2011). A produção brasileira no ano de 2010 foi de 220 mil toneladas, sendo o Estado do Rio Grande do Sul o maior produtor nacional, representando 60% da produção brasileira (IBGE, 2012). Embora o Rio Grande do Sul seja o maior produtor nacional, sua produtividade é baixa (8,95 t. ha⁻¹), quando comparado com outros Estados, como Santa Catarina (12,36 t. ha⁻¹), Paraná (10,22 t. ha⁻¹) e São Paulo (21,06 t. ha⁻¹) (IBGE, 2012).

A baixa produtividade do Estado gaúcho deve-se entre outros fatores à baixa qualidade genética e sanitária da muda, e a falta de porta-enxertos adaptados às diversas condições edafoclimáticas das diferentes zonas de produção (FACHINELLO et al., 2000, MAYER et al., 2005).

No Rio Grande do Sul, as mudas comerciais de Prunáceas, são obtidas através da enxertia sobre porta-enxertos originários de sementes, sendo estas provenientes do descarte dos caroços das indústrias de conserva, de qualquer cultivar de maturação tardia. Esta prática leva a ocorrência de misturas varietais e conseqüentemente formação de pomares com plantas desuniformes, não atendendo as exigências mínimas de qualidade de um bom porta-enxerto (FACHINELLO, 2000; MAYER et al., 2005).

O desempenho dos porta-enxertos provenientes de cultivares tardias tem sido bom, pois estes apresentam facilidade de germinação e boa compatibilidade com praticamente todas as cultivares copa de pessegueiro, nectarineira e ameixeira. Neste contexto, a muda tem importância relevante, principalmente quanto ao aspecto sanitário

e a correta identificação varietal, sendo sem dúvida a base do pomar e sucesso da exploração frutícola. Portanto, selecionar materiais de qualidade para formação das mudas de porta-enxertos, é importante para aumento da produtividade do RS.

Com objetivo de melhorar a produção de mudas de porta-enxertos para as frutas de caroço, instituições como a UFPel e a Embrapa começaram em 1998, um programa de introdução de porta-enxertos de outros países, dentre estes o 'Mr. S. 2/5' (*Prunus cerasifera* x *Prunus spinosa*) para dar suporte as atividades de pesquisa. Este porta-enxerto foi selecionado na Itália e tem origem incerta, sendo um híbrido que possui características como resistência a asfixia radicular, ao calcário e a *agrobacterium tumefaciens*. Além disso, este porta-enxerto é propagado comercialmente na Europa, através da micropropagação, apresentando importantes características agronômicas como à indução de baixo vigor na cultivar copa e produção precoce, rápido crescimento e raízes profundas, induzindo boa atividade vegetativa ainda nos primeiros anos após a implantação, porém por ser um híbrido pentaploide, não é produzido por meio de sementes (LORETI et al., 1998), necessitando assim que a propagação seja feita via assexuada (LORETI; MASSAI, 1998).

A propagação vegetativa, ao contrário da multiplicação por sementes, tem como principais vantagens a manutenção das características genéticas da planta matriz, a redução da fase juvenil e a obtenção de plantas uniformes (YAMAZOE; VILAS BOAS, 2003).

Entres os métodos de propagação vegetativa se destaca a estaquia, pois se caracteriza ser de baixo custo e de fácil execução (FACHINELLO et al., 2005). Porém, este tipo de propagação nem sempre é viável, especialmente quando a espécie ou cultivar apresenta baixo potencial de enraizamento, podendo estes resultados estar associados a necessidade de investimentos em infra-estrutura do viveiro para obtenção de resultados economicamente viáveis (HOFFMANN et al., 2003). No Brasil, alguns trabalhos apresentaram índices superiores a 80% de enraizamento quando se trabalha em condições adequadas, porém este índice pode ser diferenciado de acordo com o genótipo (TOFANELLI et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2003; MINDÉLLO NETO et al., 2004; MINDÉLLO NETO et al., 2006). Embora vários estudos já foram conduzidos com objetivo de otimizar a propagação de porta-enxertos a partir da estaquia, devido as

limitações já citadas, ainda não existe um protocolo eficiente para propagação em escala comercial.

Neste sentido, a micropropagação pode ser uma alternativa viável, pois possui maior capacidade propagativa do que a estaquia, devido ao rejuvenescimento das plantas propagadas *in vitro* (ANDREU; MARÍN, 2005). Além disso, esse método se constitui na produção de um elevado número de plantas, num curto espaço de tempo e ocupando uma área física bastante reduzida, se comparada com os métodos convencionais de multiplicação. Portanto, é um procedimento de importância prática e potencial na agricultura, com especial enfoque na produção de plantas em larga escala, no intercâmbio de germoplasma (SOUZA et al., 2006).

A propagação *in vitro* tem permitido propagar espécies de difícil multiplicação, como cultivares copa e/ou porta-enxertos de pessegueiro, com obtenção de material de alta qualidade genética através da captura e fixação de ganhos genéticos a partir de genótipos superiores (PÉREZ-TORNERO; BURGOS, 2000).

Entretanto, tais alterações no sistema de produção de porta-enxertos, embora promissoras e com algumas experiências positivas em outros países, determinadas cultivares de porta-enxertos, ainda não foram incorporados ao sistema de produção de mudas de pessegueiro no Brasil. Assim, embora, vários trabalhos já tenham sido conduzidos no Brasil, visando adequar um protocolo de multiplicação *in vitro*, ainda não foi possível estabelecer uma metodologia eficiente para a propagação massal de porta-enxertos do gênero *Prunus*, devido principalmente a problemas com contaminações por fungos e bactérias endofíticas, sendo estas limitantes para o desenvolvimento dos explantes. Além disso, na fase de multiplicação, tem-se observado na maioria das vezes uma variação na taxa de multiplicação e baixo crescimento das brotações (RODRIGUES et al., 2003), sendo estas na maioria das vezes determinantes para a fase de enraizamento (COUTO et al., 2003).

Por outro lado, o enraizamento e aclimatização de brotações micropropagadas são relativamente escassos, principalmente no que se refere aos fatores associados com a fase de aclimatização. Assis; Teixeira (1998) consideram o enraizamento a etapa mais difícil da micropropagação, pois esta etapa determina o sucesso da aclimatização das plantas quando estas são transplantadas para a casa de vegetação. Rogalski et al.

(2003a) associaram a baixa percentagem de aclimatização do gênero *Prunus* com o tipo de raízes formadas durante o cultivo *in vitro* (ROGALSKI, et al., 2003a), sendo estas muitas vezes morfológicamente normais, mas podendo apresentar distúrbios fisiológicos (FILITI et al., 1987).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi otimizar a multiplicação e o enraizamento *in vitro*, bem como a aclimatização das brotações do ‘Mr. S. 2/5”, visando identificar fatores que interferem na micropropagação deste porta-enxerto.

2 Capítulo 1 - Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto 'Mr. S. 2/5'

2.1 Introdução

A micropropagação é uma alternativa viável na propagação de algumas espécies lenhosas, possuindo maior rapidez em relação aos métodos tradicionais (COUTO, 2003), no entanto, vários autores observam que para o gênero *Prunus*, existem algumas dificuldades na fase de multiplicação, como o reduzido número de brotações formadas por explante e o baixo crescimento das mesmas (RODRIGUES et al., 2003).

Na fase de multiplicação *in vitro*, vários fatores podem influenciar no sucesso desta técnica, sendo os principais as concentrações de sais e dos reguladores de crescimento. Com relação a composição de sais, o meio MS é o mais utilizado para diversas espécies, porém, para o gênero *Prunus*, diluições deste meio ou mesmo outras formulações consideradas mais fracas, como o WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), QL (QUOIRIN; LEPROIVE, 1977), Villegas (VILLEGAS; BECERRIL; AGUIAR, 1992), podem ser usados de acordo com a espécie ou cultivar, conforme observado nos trabalhos de Silveira et al. (2001), Couto (2004) e Rocha (2006).

Além da composição salina do meio de cultura, os reguladores de crescimento, principalmente as citocininas, exercem papel importante, pois estas são responsáveis pela indução de brotações adventícias pela redução da superação da dominância apical. Das citocininas utilizadas nos meios de multiplicação, a 6-benzilaminopurina (BAP) é a que tem contribuído eficientemente na indução de gemas adventícias e multiplicação dos explantes, além de se destacar das demais por ser mais barata (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Alguns meios de multiplicação são acrescidos por outros reguladores de crescimento, a exemplo das auxinas, com a função de promover o alongamento das brotações e diminuir o efeito inibitório das citocininas (LUNDERGAN; JANICK, 1979). Entretanto, segundo Silva (2004) a utilização de uma fonte de auxina no meio de multiplicação nem sempre é necessária, devendo ser usada em concentrações menores que $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, pois, o excesso deste regulador pode induzir a formação de calos ou de raízes indesejáveis nos explantes cultivados nesta fase.

Além dos fatores citados acima, o pH também influencia no cultivo *in vitro*, podendo comprometer a solidificação do agar no meio de cultura, além disso, induz mudanças na permeabilidade das membranas o que influencia a absorção de certos compostos (MARTIN; ROSE, 1976).

A fonte de carboidrato também é de extrema importância nos meios de cultura para multiplicação *in vitro*. Os carboidratos fornecem energia e contribuem no equilíbrio do potencial osmótico do meio de cultura (PATI et al., 2006). Na cultura de tecidos, geralmente utiliza-se a sacarose como carboidrato na concentração de 2 a 3%, pois, variações nestas concentrações afetam as condições osmóticas e o metabolismo da planta *in vitro*, influenciando no crescimento e na diferenciação das culturas (KUMAR et al., 1984). Assim como a sacarose, o sorbitol também é uma importante fonte de carboidrato, sendo o açúcar dominante na seiva do floema das plantas da família *Rosaceae*, sua principal função é proteger os tecidos contra a desidratação, a salinidade e o frio, caracterizando-se também como um carboidrato de reserva (GRANT; REES, 1981).

Portanto, buscou-se neste trabalho estudar a influência da composição de sais, pH do meio de cultura, fonte e concentração de carboidrato e concentração de AIB na multiplicação *in vitro* do porta-enxerto 'Mr. S. 2/5', visando obter mais informações para contribuir na elaboração de um protocolo de multiplicação *in vitro*.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Estabelecimento *in vitro*

Para reduzir a contaminação *in vitro*, as mudas previamente enxertadas sobre a cultivar Capdeboscq foram transferidas para casa de vegetação, sendo realizado tratamento fitossanitário a cada dois dias com bactericida (Kasumin 0,3%) e fungicida (Orthocide 0,2%).

Durante a fase de pleno crescimento vegetativo, foram coletados segmentos nodais para o estabelecimento *in vitro*. No laboratório, os ramos foram desfolhados e anteriormente à inoculação em meio de cultura, foi desinfestado em solução de álcool 70% por 15 segundos e hipoclorito de sódio 2% por 15 minutos. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, procedeu-se a tríplice lavagem com água destilada e esterilizada.

Segmentos nodais com aproximadamente 1,0 cm, contendo uma gema, foram inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) mio-inositol (100 mg L^{-1}), sacarose (30 g L^{-1}), mio inositol (100 mg L^{-1}), ágar (7 g L^{-1}), com pH ajustado para 5,8. Nesta fase de estabelecimento foram utilizados tubos de ensaio. Após a inoculação, os explantes foram transferidos para sala de crescimento, com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, permanecendo no escuro por sete dias e com posterior transferência para fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo luminoso de $25 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

De um total de 448 segmentos estabelecidos, 310 brotaram sem contaminação, sendo 75 contaminação com bactéria, 42 com fungo e 21 mortos.

Os segmentos que brotaram foram multiplicados em meio MS com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB, para aumentar a quantidade de material vegetal *in vitro*, para realização dos experimentos.

Experimento 1 - Efeito da composição do meio e do pH

Com o objetivo de avaliar a composição salina do meio de cultura e do pH na multiplicação *in vitro* do porta-enxerto Mr.S 2/5 foram testados quatro composições de meio MS, WPM, SH, QL e dois pHs (5,2 e 5,8), sendo a estes adicionados BAP ($0,5 \text{ mg}$

L⁻¹), AIB (0,01 mg L⁻¹), mio-inositol (100 mg L⁻¹), sacarose (30 g L⁻¹) e ágar (7 g L⁻¹). Após a distribuição do meio de cultura nos frascos, estes foram autoclavados à temperatura de 121 °C durante 20 minutos. Brotações apicais com aproximadamente 1,0 cm, foram utilizados como explantes iniciais. Estes foram inoculados nos diferentes tratamentos e transferidos para sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo luminoso de 25 μmol m⁻²s⁻¹, permanecendo nestas condições por 30 dias. Posteriormente, realizou-se a avaliação do experimento, analisando o número de brotações por explante e o comprimento destas (cm).

O experimento foi conduzido em delineamento completamente casualizado, com fatorial 2x4, sendo dois pHs (5,2 e 5,8) e quatro tipos de meio (WPM, SH, QL e MS), com quatro repetições, sendo cada repetição constituída por um frasco contendo cinco explantes. Os dados experimentais foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, com 5% de probabilidade, utilizando o programa WinStat 2.0 (MACHADO e CONCEIÇÃO, 2005).

Experimento 2 - Efeito da fonte e da concentração de carboidrato

Com objetivo de verificar o efeito da fonte e da concentração de carboidrato no meio de cultura, neste experimento foram testados a sacarose e o sorbitol, com os seguintes tratamentos: 30g L⁻¹ de sacarose, 10g L⁻¹ de sorbitol + 20g L⁻¹ de sacarose, 20 g L⁻¹ de sorbitol + 10g L⁻¹ de sacarose e 30g L⁻¹ de sorbitol. Para isto, brotações apicais oriundas de multiplicações prévias, com aproximadamente 1,0 cm, foram utilizados como explantes iniciais. Estes foram inoculados em meio MS suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de BAP e 0,01 mg L⁻¹ de AIB, sendo os demais constituintes do meio, bem como as condições de cultivo e as variáveis analisadas as mesmas do primeiro experimento.

O experimento foi conduzido em delineamento completamente casualizado, com quatro tratamentos (30g L⁻¹ de sacarose, 10g L⁻¹ de sorbitol + 20g L⁻¹ de sacarose, 20g L⁻¹ de sorbitol + 10g L⁻¹ de sacarose e 30g L⁻¹ de sorbitol), sendo estes analisados da mesma forma que o primeiro experimento.

Experimento 3 - Influência da concentração de AIB na multiplicação

Objetivando verificar a influência da concentração de AIB, brotações apicais oriundas de multiplicações prévias, com aproximadamente 1,0 cm, foram inoculados em meio MS suplementado com 0,5 mgL⁻¹ de BAP, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar e diferentes concentrações de AIB (0,0; 0,01; 0,03 e 0,06 mg L⁻¹) de AIB, com pH ajustado para 5,2, sendo as demais condições de cultivo e as variáveis analisadas as mesmas do experimento anterior. Trinta dias após a instalação do experimento, foram analisadas as variáveis, número de brotações por explante, comprimento das brotações (cm), massa fresca (g) e massa seca (g).

O experimento foi conduzido em delineamento completamente casualizado, com quatro tratamentos (0,0; 0,01; 0,03 e 0,06 mg L⁻¹), sendo os dados analisados por regressão polinomial, utilizando o programa WinStat 2.0 (MACHADO e CONCEIÇÃO, 2005).

2.4 Resultados e discussão

Experimento 1 - Efeito da composição de sais e do pH

Segundo a análise de variância, observou-se interação entre os níveis dos fatores avaliados nos tratamentos para ambas as variáveis, número e comprimento das brotações.

Com relação aos meios de cultura, explantes cultivados em meio MS apresentaram melhores resultados com relação ao número das brotações, sendo o maior número (6,7) obtido com pH 5,2 (Tabela 1). Apesar de não ocorrer diferença significativa entre os meios quando utilizado pH 5,8, numericamente o número das brotações obtidas no meio MS foi 38% superior em comparação aos demais meios (Tabela 1).

Tabela 1 - Número médio das brotações por explante do porta-enxerto cv. Mr. S. 2/5, cultivados por 30 dias em diferentes meios de cultura em dois pH

Meio de cultura	pH 5,2	pH 5,8
MS	6,70 Aa	4,50 Ab*
SH	4,35 Ba	2,80 Ab
WPM	3,15 Ba	2,85 Aa
QL	3,06 Ba	2,80 Aa
CV(%) = 23,33		

*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas na coluna, diferem entre si para o fator meio de cultura, e médias seguidas por letras minúsculas distintas na linha, diferem entre si para o fator pH, pelo teste de Tukey a 5%.

Em relação ao pH, os meios MS e SH induziram maior número de brotações em pH 5,2, não ocorrendo diferença significativa para QL e WPM. Outro aspecto observado foi que os valores obtidos com pH 5,2 foram sempre superiores aos obtidos em pH 5,8, dentro de cada tipo de meio (Tabela 1).

Em relação ao comprimento das brotações, apenas observou-se diferença significativa quando os meios foram ajustados para pH 5,8, sendo os maiores comprimentos obtidos quando os explantes foram cultivados em meio MS e SH (Tabela 2).

Tabela 2 - Comprimento de brotos por explante brotado do porta-enxerto cv. Mr. S. 2/5, cultivados por 30 dias em diferentes meios de cultura em dois pH

Meio de cultura	pH 5,2	pH 5,8
MS	0,40 Aa	0,42 Aa
SH	0,30 Aa	0,40 Aa
QL	0,30 Aa	0,00 Bb
WPM	0,27 Aa	0,00 Bb
C.V. 48,55		

Médias seguidas por letras maiúsculas distintas na coluna, diferem entre si para o fator meio de cultura, e médias seguidas por letras minúsculas distintas na linha, diferem entre si para o fator pH, pelo teste de Tukey a 5%.

Visando o melhor desenvolvimento das plantas e a redução nos custos, Grattapaglia; Machado (1998) relataram a possibilidade de reduzir a concentração de sais do meio MS para diversas plantas lenhosas, porém algumas espécies e/ou cultivares podem apresentar melhores respostas em meios com maior concentração de

sais, podendo esta diferença justificar os melhores resultados com porta-enxerto Mr. S. 2/5 no meio MS.

Comprovando esta característica, Chaves (2003) trabalhando com a cultivar Mr. S. 1/8 observou uma maior adaptabilidade desta cultivar ao meio com maior concentração salina. Por outro lado, Silveira (2001) com as cultivares Capdeboscq e GF677, Couto (2003) com o porta-enxerto 'Tsukuba1' e Villa et al., (2009) com amoreira-preta (*Rubus* sp.) e porta-enxerto de videira, observaram que o meio de cultura com sais diluídos favoreceu o crescimento e desenvolvimento destas espécies, demonstrando que espécies e/ou cultivares apresentam exigências nutricionais distintas.

Assim como a composição salina, o pH do meio de cultura também exerce influência na multiplicação *in vitro* pela disponibilidade dos nutrientes presentes no meio. Na cultura de tecidos o pH dos meios de cultura são ajustados para uma faixa ligeiramente ácida, com intervalo ente 5,0 e 6,0, (CALDAS et al., 1998), sendo utilizado na maioria dos trabalhos pH 5,8 (AUGUSTO et al., 2006, BANDEIRA et al., 2010). No presente trabalho, utilizou-se nos tratamentos também dentro desta faixa (5,2 e 5,8). Assim, o pH pode ter afetado a disponibilidade de nutrientes do meio de cultura quando ajustado o pH.

O nitrogênio nas plantas, é encontrado nas formas, amoniacal (NH_4^+) e nítrica (NO_3^-) e possuem diferentes efeitos no crescimento, no vigor do vegetal, produção de biomassa e reprodução (LANE; Mc DOUGALD, 1982). Algumas espécies de plantas têm preferência pela absorção de N na forma amoniacal (MALAGOLI et al., 2000). Portanto, pode-se afirmar que o meio MS apresentou melhores resultados possivelmente por possuir mais nitrogênio em sua composição em relação aos demais meios de cultura, indicando uma possível preferência desta cultivar. Possivelmente em pH 5,2, a disponibilidade de nitrogênio (N) na forma de amônio foi maior, pois segundo Martin; Rose (1976) quando em pH mais baixo, há maior disponibilidade de amônio (NH_4^+) no meio, e quando em pH mais alto, nitrato (NO_3^-).

Adicionalmente, alguns autores como Morini et al., (1991), Viganó et al., (2007) e Rocha et al., (2009) que realizaram trabalhos *in vitro* com ameixeiras, utilizaram pH mais

ácido, na faixa de 5,2, à 5,6 demonstrando que já é conhecida a adaptabilidade desta espécie ao pH nesta faixa.

No Brasil existe uma diversidade de solos, na região do Rio Grande do Sul, a acidez deste solo é uma das características (WIETHOLTER, 2002), assim, verificou-se que Mr. S. 2/5 pode ser uma alternativa de porta-enxerto para as frutíferas de caroços na região, pois esta cultivar demonstrou boa adaptabilidade ao meio de cultura mais ácido (5,2), característica que contribuiria para a fruticultura do país.



Figura 1 - Brotações do porta-enxerto Mr. S. 2/5 após 30 dias de cultivo em meio MS com pH 5,8 (esquerda) e pH 5,2 (direita).

Neste experimento pode-se observar que não houve diferença significativa entre os tratamentos para ambas as variáveis, número e comprimento de brotações. Apesar de não haver diferença significativa, é importante destacar que numericamente, os valores obtidos nos meios com 30 g L⁻¹ de sacarose foram melhores em relação aos demais tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3 - Número e comprimento de brotações (cm), obtidos com o porta-enxerto Mr.S. 2/5, cultivados por 30 dias em meio MS com duas fontes carboidrato

Tratamentos	Número de brotos	Comprimento de brotos (cm)
30 g L ⁻¹ de sacarose	3,26 A	0,65 A
10 g L ⁻¹ de sacarose + 20 g L ⁻¹ de sorbitol	2,62 A	0,57 A
20 g L ⁻¹ de sacarose + 10 g L ⁻¹ de sorbitol	2,43 A	0,55 A
30 g L ⁻¹ de sorbitol	2,06 A	0,42 A
C.V.	30,84	39,49

Médias seguidas por letras maiúsculas distintas na coluna diferem entre si para o fator concentração de sacarose e sorbitol, pelo teste de Tukey a 5%.

Em pesquisa realizada por Borkowska; Szczerba (1991), com *Prunus cerasus* L., estes autores verificaram que acima de 3% de açúcares presente no meio de cultura, houve decréscimo no número de brotações para todas as fontes estudadas. Ainda neste trabalho, com a cv. Schattenmorelle também foram observados melhores resultados quando se utilizou sacarose como fonte de carbono durante a multiplicação *in vitro* (concordando com os resultados do presente trabalho), sendo que explantes cultivados em meio com sacarose apresentaram o dobro do número de brotações em comparação ao sorbitol. Porém, para a cultivar North Star não houve diferença significativa para o número de brotos entre estas fontes de carbono.

Agentes osmóticos como a sacarose e o sorbitol, agem sobre o crescimento reduzindo o potencial hídrico do meio de cultura e conseqüentemente inibindo a absorção de água e nutrientes pelo explante (LÉDO et al., 2007). Shibli et al., (1999), também relataram a redução significativa do crescimento de microbrotos de amendoeira amarga (*Amygdalus communis* L.); quanto maior foi a concentração de sacarose, sorbitol ou manitol.

Os melhores resultados obtidos no presente trabalho, em meio com sacarose se devem possivelmente por ser uma fonte de carboidrato que promove um melhor desenvolvimento *in vitro*, sendo preferencialmente utilizado no meio de cultivo, em vista de certas características, como alta solubilidade e rápida metabolização pela maioria das células vegetais (THORPE; BEAUDOIN-EAGAN, 1984). Diferentemente, o sorbitol

é um açúcar álcool que geralmente não é metabolizado pelas plantas, e sua ação, assim como os outros açúcares, está relacionada com a modificação do potencial osmótico do meio de cultura, removendo o excesso de água intracelular por gradiente osmótico e assim desacelerando o crescimento vegetal. Porém, dependendo da concentração, da espécie ou mesmo da cultivar, o sorbitol pode ter efeito nocivo (SHIBLI et al., 2006) ou tóxico como foi relatado por Sá et al., (2011), o que também pode ter ocorrido no presente trabalho na concentração de 30 g L^{-1} de sorbitol.

Resultados semelhantes foram encontrados por Santos et al., (2011), testando fontes e concentrações de carboidrato em mangabeira, verificando que quanto maior a concentração de sorbitol, houve menor desenvolvimento das brotações, comprovando o efeito nocivo desta fonte de carbono com aumento da concentração. Este resultado corrobora com o presente trabalho, que apesar de não ter apresentado diferença estatística, numericamente demonstrou que quanto maior a concentração de sorbitol também houve decréscimo do número e comprimento das brotações.

Contrariamente, Ahmad et al., (2007), observaram na multiplicação *in vitro* do porta enxerto de pessegueiro 'GF-677', que o sorbitol foi a fonte de carbono mais efetiva, comparado com a sacarose, proporcionando maior número e comprimento de brotos na concentração de 30 g L^{-1} .

É provável que estas diferentes respostas em relação à fonte de carboidratos estejam relacionadas a maior adaptabilidade desta cultivar em relação a sacarose, pois a adição destes carboidratos ao meio de cultura, afetam a assimilação de nitrogênio do meio de cultura pelas células. Além disso, o efeito da citocinina na divisão celular pode também depender da disponibilidade de açúcar (GAMBORG, 1970), variando conforme as cultivares.



Figura 2- Brotações do porta-enxerto Mr.S. 2/5 após 30 dias de cultivo com sorbitol 30 g L^{-1} (esquerda) e sacarose 30 g L^{-1} (direita).

Experimento 3 - Influência da concentração de AIB na multiplicação

Pela análise de regressão para o número de brotações por explante, observou-se uma tendência linear crescente, havendo um aumento para esta variável a medida que se aumentou a concentração de AIB no meio de cultura (Figura 2).

Com relação às demais variáveis, comprimento das brotações, massa fresca e massa seca, não houve diferença significativa entre os tratamentos obtendo como média geral $0,81 \text{ cm}$, $1,63 \text{ g L}^{-1}$ e $0,25 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente.

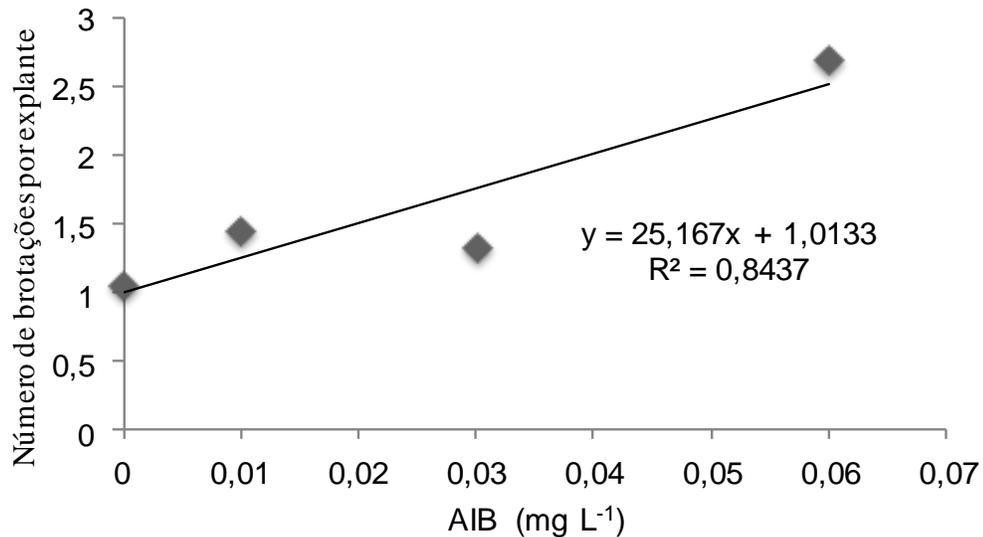


Figura 3 - Número de brotações obtidos com o porta – enxerto ‘Mr. S. 2/5’ cultivados por 30 dias em meio MS, acrescido por diferentes concentrações de AIB.

Sabe-se que os principais reguladores de crescimento utilizados na fase de multiplicação são as citocininas, porém, em algumas cultivares pode ser necessário o uso de auxina, sendo a razão entre auxina e citocinina determinante para o crescimento e diferenciação em raiz ou gemas de tecidos vegetais cultivados (SANTOS-SEREJO, 2006).

Em trabalho realizado por Wagner Junior et al., (2003), com o porta-enxerto ‘Julior’ (*Prunus* spp.), foi constatado que o AIB não influenciou no número e comprimento das brotações. No entanto, para algumas cultivares a adição de auxina ao meio de cultura pode ter efeito positivo na fase de multiplicação, conforme verificou-se no presente trabalho. Resultados semelhantes também foram encontrados por Silveira et al., (2002), na multiplicação de porta-enxertos de *Prunus*, os quais constataram que ‘Mirabolano 29C’ respondeu a presença de auxina, assim como ‘GxN₂₂’ e ‘Marianna’ responderam positivamente a presença deste regulador independente da fonte de auxina para número médio de gemas e número médio de brotações. Do mesmo modo Silveira et al., (2001) também observaram resposta positiva na adição de auxina no

meio de multiplicação com porta-enxerto de macieira 'M-7'. Estes resultados comprovam que auxinas e citocininas, endógenas e exógenas, são exigidas em proporções adequadas para a formação de brotações, sendo que tais proporções variam de acordo com o que cada cultivar e cada explante possui (LANE; Mc DOUGALD, 1982).

Portanto, a adição de AIB no meio de cultura na fase de multiplicação é importante para algumas cultivares, pois este regulador de crescimento anula parte do efeito inibitório que a citocinina promove sobre o crescimento das novas brotações, ou seja, se dá devido a necessidade do balanço hormonal entre auxina e citocinina (TAIZ ; ZEIGER, 2009), assim, possivelmente neste estudo não houve auxina suficiente para anular esse efeito inibitório da citocinina, pois não observou-se diferença significativa entre as concentrações de AIB testadas. Possivelmente, se houvesse uma maior concentração de auxina, ocorresse uma resposta mais efetiva quanto ao comprimento de brotações.



Figura 4 – Brotações do porta-enxerto 'Mr. S. 2/5' após 30 dias de cultivo com $0,03 \text{ mg L}^{-1}$ (esquerda) e $0,06 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB (direita).

3.4 Conclusões

De acordo com as condições em que foram conduzidos os trabalhos de multiplicação *in vitro* com o porta-enxerto 'Mr. S. 2/5', pode-se concluir que:

- 1 - O pH 5,2 e o meio de cultura MS são recomendados para multiplicação;

2 - A fonte e concentração de carboidrato não exercem influência na multiplicação;

3- A concentração de $0,06 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB induz maior número de brotações.

3 Capítulo 2 – Enraizamento *in vitro* e aclimatização do porta-enxerto ‘Mr. S. 2/5’

3.1 Introdução

A produção de novas plantas no sistema *in vitro* envolve diversas fases, passando pelo estabelecimento de explantes, a multiplicação dos mesmos e numa fase final é necessário o enraizamento adventício das novas brotações para formar a nova planta. A indução e formação de raízes adventícias na base da brotação é importante para a posterior transferência da planta às condições *ex vitro*. Para promover a indução de raízes, geralmente os meios de cultura são acrescidos de auxina, sendo sua fonte e concentração as variáveis que mais influenciam durante esta fase da micropropagação. Neste processo as fontes mais utilizadas são ácido indolbutírico (AIB), ácido naftaleno acético (ANA) e ácido 3-indolacético (AIA), os quais podem ser utilizados sozinhos ou em combinação (SANTOS-SEREJO et al., 2006).

Entre as auxinas, o AIB tem sido eficiente na formação de raízes adventícias em uma grande variedade de espécies frutíferas (RADMANN et al., 2003; ROGALSKI et al., 2003a; COSTA et al., 2008; SCHMILDT et al., 2010), porém uma concentração excessiva no meio de cultura pode ser tóxica, favorecendo a formação de calos na base das brotações, comprometendo a rizogênese, o crescimento da parte aérea, como também a sobrevivência das plantas na fase de aclimatização (RADMANN et al., 2002).

No Brasil, alguns trabalhos realizados com o gênero *Prunus* demonstraram que a adição do AIB no meio de enraizamento tem sido eficiente para promover acréscimo na porcentagem de enraizamento (COUTO et al., 2003; ROGALSKI et al., 2003a; VIGANÓ et al., 2007), bem como o número de plantas sobreviventes após a

transferência para as condições *ex vitro* (ROGALSKI et al., 2003b), porém a melhor concentração pode variar de acordo com a cultivar.

Além da concentração de auxina adicionada ao meio de enraizamento, o tempo de exposição dos explantes no meio de cultura também pode ser decisivo para o desenvolvimento do sistema radicular (NEGASH et al., 2000). O aumento do tempo de permanência das brotações enraizadas em meio de cultivo pode torna-las menos funcionais, podendo levar ao envelhecimento das raízes, prejudicando a sobrevivência quando estas plantas são aclimatizadas (PEREIRA; FORTES, 2001). Segundo Mercier (2004), a formação de raízes adventícias ocorre de uma a três semanas, e o processo pode ser dividido na fase de indução, iniciação e alongamento das raízes, sendo que a concentração de auxina e o tempo de exposição a este regulador de crescimento pode influenciar no sucesso do enraizamento *in vitro* e na aclimatização.

Considerando que no Brasil poucos foram os trabalhos conduzidos com porta-enxertos de *Prunus* visando estudar tais efeitos na fase de aclimatização, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da concentração de AIB e do tempo de permanência das brotações no meio de cultura, sobre a taxa de enraizamento e de aclimatização das plantas do porta-enxerto de 'Mr. S 2/5'.

3.2 - Material e Métodos

Experimento 1 - Efeito das concentrações do AIB no enraizamento *in vitro* e na aclimatização

Com objetivo de identificar a melhor concentração de AIB no enraizamento *in vitro* e na aclimatização, brotações apicais com aproximadamente 1,5 cm, oriundos de multiplicações prévias, foram transferidos para meio MS, contendo mio-inositol (100 mg L⁻¹), sacarose (30 g L⁻¹), ágar (7 g L⁻¹), sem regulador de crescimento. Quinze dias após, estes explantes foram transferidos para meio de enraizamento, constituído pelo meio MS com metade da concentração de sais, mio-inositol (100 mg L⁻¹), sacarose (30 g L⁻¹), ágar (7 g L⁻¹), e AIB nas seguintes concentrações (0,0; 0,8; 1,6; 3,2 e 6,4 mg L⁻¹). Após a inoculação dos explantes, os frascos foram transferidos para sala de crescimento, com

temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, permanecendo por cinco dias no escuro e sete dias em fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo luminoso de $25 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Ao final dos 12 dias de cultivo em meio de enraizamento, avaliaram-se o percentual de enraizamento, número e comprimento de raízes por explante enraizado. Posteriormente, todas as brotações foram transferidas para bandejas plásticas com tampa, contendo um litro de vermiculita. Após trinta dias de aclimatização, foram avaliados o comprimento da maior raiz, comprimento da parte aérea e percentagem de sobrevivência.

O experimento foi conduzido em delineamento completamente casualizado, com cinco tratamentos (0,0; 0,8, 1,6, 3,2 e 6,4 mg L⁻¹ de AIB), sendo os dados obtidos durante o cultivo *in vitro* analisados por regressão polinomial, utilizando o programa WinStat 2.0 (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2005), e os dados da aclimatização analisados de forma descritiva.

Experimento 2 - Influência do tempo de cultivo *in vitro* no meio de enraizamento, na rizogênese e na aclimatização

Visando identificar o melhor tempo de cultivo *in vitro* em meio de enraizamento, na rizogênese e na aclimatização do porta-enxerto Mr. S. 2/5, brotações apicais com aproximadamente 1,5 cm, cultivadas em meio MS desprovido de regulador de crescimento, por 15 dias, foram utilizados como explantes iniciais. Utilizou-se meio MS com metade da concentração de sais, suplementado com AIB (1,6mg L⁻¹), mio-inositol (100 mg L⁻¹), sacarose (30 g L⁻¹) e ágar (7 g L⁻¹). Após a inoculação dos explantes, estes foram cultivados em sala de crescimento, com temperatura de 25°C , por diferentes períodos de cultivo (tratamento 1: 5 dias no escuro, tratamento 2: 5 dias de escuro + 1 dia com fotoperíodo de 16 horas, tratamento 3: 5 dias de escuro + 3 dias com fotoperíodo de 16 horas, tratamento 4: 5 dias de escuro + 7 dias com fotoperíodo de 16 horas, tratamento 5: 5 dias de escuro + 9 dias com fotoperíodo de 16 horas).

Ao final de cada período de cultivo foram avaliadas a percentagem de enraizamento, a percentagem de visualização de protuberâncias esbranquiçadas, número de raiz por explante enraizado e comprimento de raiz. Posteriormente, as plantas

foram transferidas para bandejas plásticas com tampa, contendo um litro de vermiculita. Decorridos trinta dias da transferência para casa de vegetação, foram avaliados percentagem de sobrevivência, comprimento da maior raiz e comprimento da parte aérea.

Realizou-se análise de variância dos dados e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade de erro, utilizando o software WinStat 2.0 (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2005). Porém, na fase de aclimatização, os dados obtidos quanto a porcentagem de sobrevivência, comprimento da parte aérea e da maior raiz, foi realizada por meio de uma análise descritiva.

3.3 - Resultados e Discussão

Experimento 1 - Efeito das concentrações de AIB no enraizamento *in vitro* e na aclimatização

Após o cultivo *in vitro* de 12 dias em meio de enraizamento, houve diferença significativa para todas as variáveis estudadas em função da concentração de AIB, sendo observado para estas uma resposta quadrática.

Na percentagem de enraizamento, embora se tenha obtido uma resposta quadrática com o máximo valor estimado na concentração de 4,48 mg L⁻¹ de AIB (91,46%), verificou-se que 1,6 mg L⁻¹ de AIB apresentou valor similar de enraizamento ao verificado no ponto de máxima (95%) (Figura 2). Embora não tenha sido observado desenvolvimento de raízes em todos os explantes, para aqueles que não apresentaram raízes visíveis pode-se verificar a presença de protuberâncias esbranquiçadas na base dos explantes em todos os tratamentos contendo auxina.

Para as variáveis número de raízes por explante e comprimento de raiz, foi possível estimar pela equação regressão que a partir de 3,81 mg L⁻¹ de AIB (7,55) e 3,11 mg L⁻¹ de AIB (0,56cm) mg L⁻¹ de AIB, há uma tendência de redução para esta variável (Figura 4 e 5).

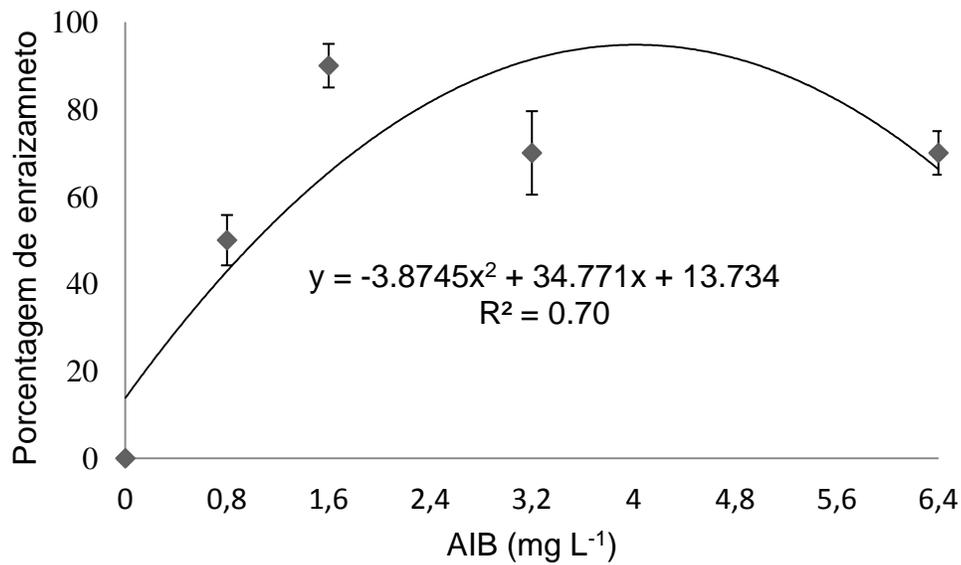


Figura 5 - Percentagem de enraizamento obtidos com porta-enxerto 'Mr. S. 2/5', cultivados por 12 dias em meios de enraizamento contendo diferentes concentrações de AIB.

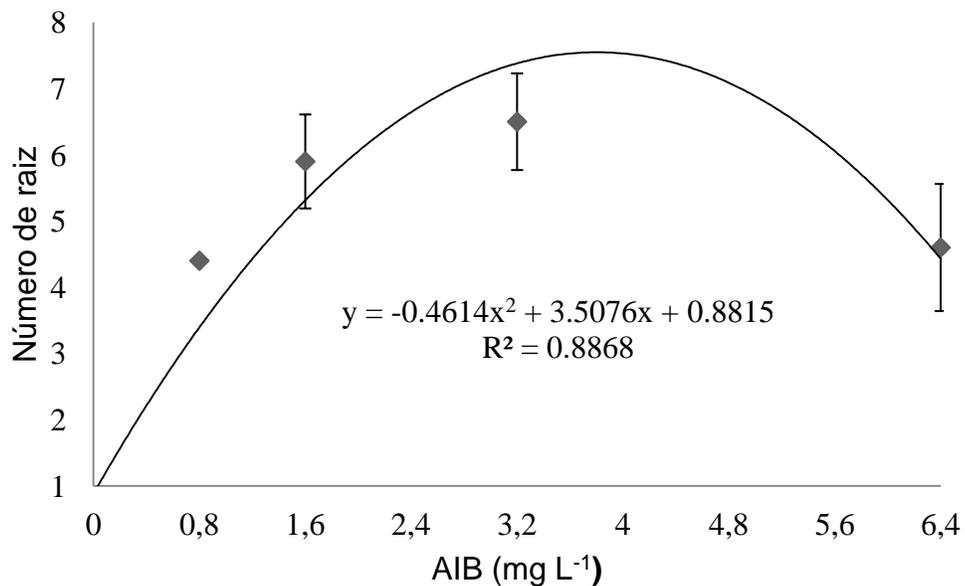


Figura 6 - Número de raiz obtidos com o porta-enxerto 'Mr. S. 2/5', cultivados por 12 dias em meios de enraizamento contendo diferentes concentrações de AIB.

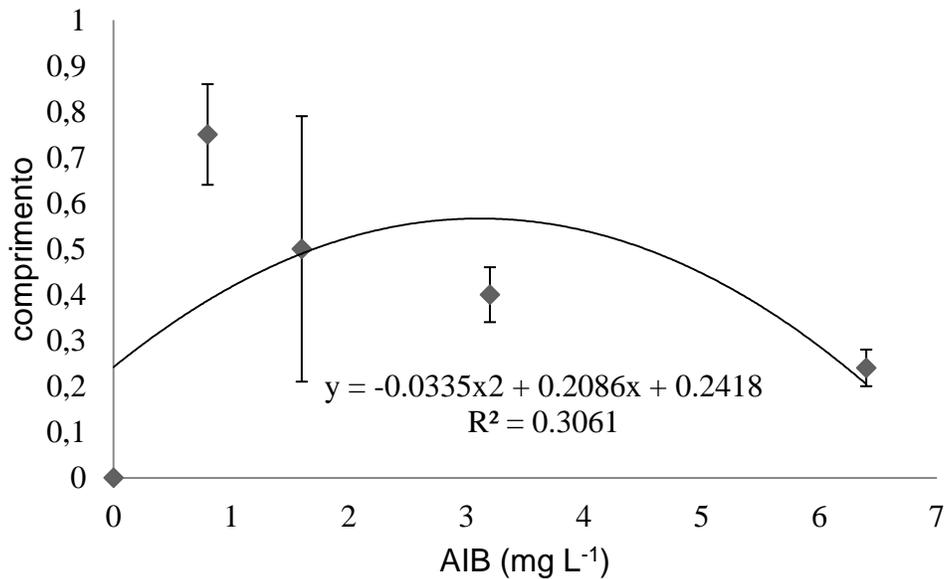


Figura 7 - Comprimento de raiz obtidos com o porta-enxerto 'Mr. S. 2/5', cultivados por 12 dias em meios de enraizamento contendo diferentes concentrações de AIB.

No presente trabalho, verificou-se a necessidade da presença de auxina para o enraizamento *in vitro* das brotações do porta-enxerto 'Mr. S 2/5', já na ausência de AIB no meio de cultivo não houve formação de raízes. Resultados similares foram observados por Viganó (2005) que trabalhando com a cv. Mr. S. 1/8 também verificou a necessidade de auxina no meio de cultura, obtendo apenas 5,3% de enraizamento em meio de cultura sem AIB. Mansseri-Lamrioui et al. (2011) também verificaram o mesmo comportamento com *Prunus avium* L., os quais não observaram formação de raízes em meio de cultura sem a adição de auxina.

Estes resultados comprovam os relatos feitos por muitos autores, ou seja, da importância da utilização de auxina no meio de cultura para induzir a formação e a iniciação de raízes adventícias. Entretanto, é necessário ajustar a melhor concentração de auxina para obtenção de um sistema radicular funcional e uniforme para que se alcance elevada percentagem de sobrevivência na fase de aclimatização (SANTOS-SEREJO et al., 2006; COSTA et al., 2008; SCHMILDT et al., 2010). Entretanto, quando a concentração de auxina no meio é excessiva, esta pode ser tóxica, comprometendo a

formação de raízes (PEDROTTI; VOLTOLINI, 2001). Este fato pode explicar a baixa percentagem de enraizamento obtida nas concentrações mais altas (3,2 e 6,4 mg L⁻¹ de AIB).

Com relação ao número de raízes, embora o ponto de máxima seja de 3,81 mg L⁻¹ de AIB, com 7,55 raízes formadas por explante, brotações cultivadas em meio de cultura a partir de 3,2 mg L⁻¹ de AIB apresentaram a formação de calo na base dos explantes e raízes fibrosas. Considerando que estas características não são apropriadas para a fase de aclimatização e a baixa porcentagem de enraizamento das brotações cultivadas com 0,8 mg L⁻¹ de AIB, pode-se evidenciar que concentrações próximas a 1,6 mg L⁻¹ de AIB são recomendadas para o enraizamento *in vitro* deste porta-enxerto.

A redução no comprimento das raízes observada com o acréscimo de AIB no meio de cultura está de acordo com a maioria dos estudos já realizados, ou seja, meios de culturas ricos em auxinas são necessários para a fase de indução da rizogênese, porém, concentrações excessivas destes reguladores tendem a inibir o desenvolvimento das raízes formadas e induzir a formação de calo (SANTOS-SEREJO et al., 2006).

Quando se compara os diferentes tratamentos durante o período de aclimatização, pode-se observar que brotações que foram cultivadas em meio de enraizamento com 1,6 mg L⁻¹ de AIB, apresentaram maior percentagem de aclimatização (100%) e maior comprimento de parte aérea (média de 6,7 cm) (Figura 3), sendo porém, o comprimento da maior raiz observado para as brotações provenientes de meio com 0,8 mg L⁻¹ de AIB (Figura 4).

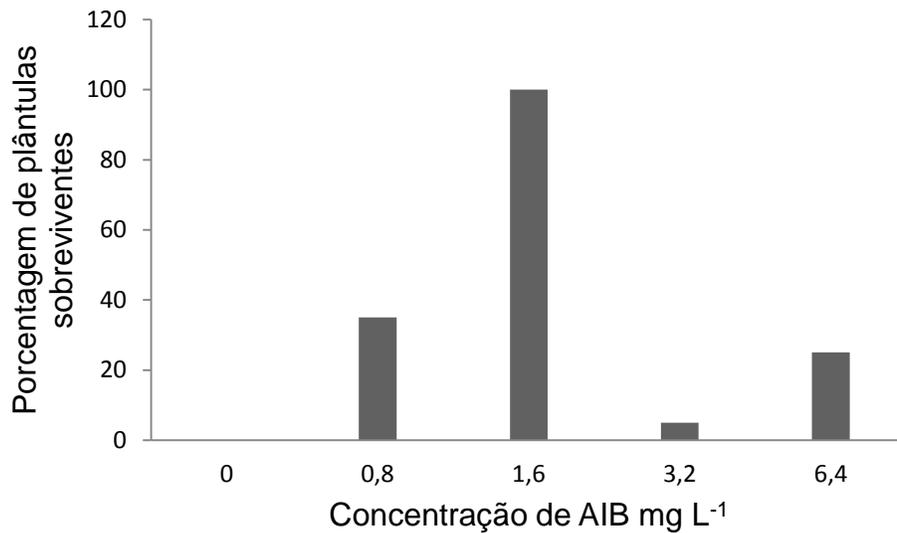


Figura 8 - Porcentagem de sobrevivência de plântula, a partir de explantes cultivados em meio de enraizamento, com diferentes concentrações de AIB, após 30 dias de aclimação em casa de vegetação.

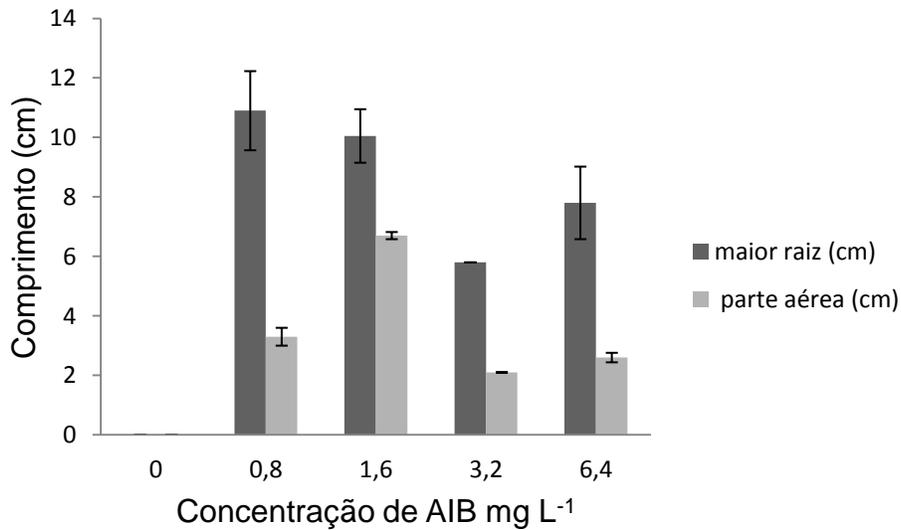


Figura 9 - Comprimento da maior raiz e da parte aérea, a partir de explantes cultivados em meio de enraizamento, com diferentes concentrações de AIB, após 30 dias de aclimação em casa de vegetação.

A partir dos dados obtidos na fase de aclimatização, pode-se verificar a influência da concentração de AIB na sobrevivência das plantas. Segundo Campana et al. (1994) e Rogalski et al. (2003a) a adição de auxina no meio de enraizamento tem sido eficiente, promovendo acréscimo na sobrevivência de porta-enxertos de *Prunus* na fase de aclimatização. No entanto, concentrações excessivas podem favorecer a formação de raízes fibrosas e de calos.

De acordo com Grattapaglia; Machado (1998), a formação de raízes fibrosas podem interferir na funcionalidade do sistema radicular, comprometendo assim a aclimatização das plantas.

Portanto, a redução na porcentagem de sobrevivência para os explantes que foram cultivados em meio com aumento na concentração de AIB a partir $1,6 \text{ mg L}^{-1}$ ($3,2$ e $6,4 \text{ mg L}^{-1}$) pode ser atribuída a formação de raízes fibrosas e de calo na base dos explantes. A maior sobrevivência de plantas e o maior crescimento da parte aérea observada para aquelas provenientes do meio com $1,6 \text{ mg L}^{-1}$, possivelmente esta associado a maior porcentagem de explantes enraizados e ao tipo de raiz formada, sendo nestes não observado a formação de calo na base dos explantes. No entanto, a concentração ótima pode variar de acordo com a cultivar. Resultados estes confirmados por Rogalski et al. (2003a), os quais obtiveram a maior sobrevivência com os porta-enxertos de *Prunus* 'Capdeboscq' (92%) e 'VP411' (84%), quando estes foram cultivados em meio de enraizamento com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB, respectivamente.

O comprimento da maior raiz observado para aquelas plantas provenientes de meio com a menor concentração de AIB ($0,8 \text{ mg L}^{-1}$) provavelmente esta associado ao maior comprimento já observado durante o cultivo *in vitro*. Segundo Mercier (2004) a concentração de auxina durante o enraizamento é diferente de acordo com a etapa organogenética, sendo esta necessária na fase de indução radicular, porém, a concentração inicialmente favorável a indução pode reduzir ou inibir o crescimento da raiz.

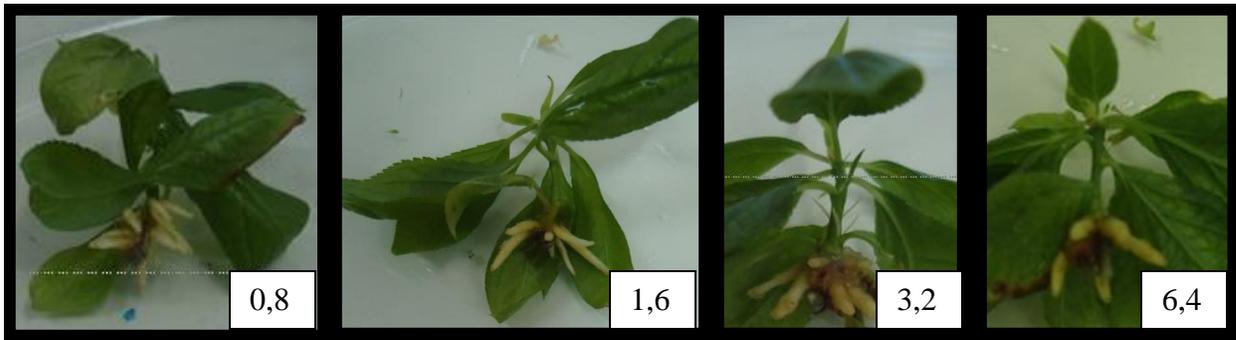


Figura 10 – Enraizamento *in vitro* com o porta-enxerto Mr. S. 2/5, cultivados por 12 dias em meio MS com diferentes concentrações de AIB (mg L^{-1}).

Segundo a análise de variância, observou-se diferença significativa entre os tratamentos para todas as variáveis que foram analisadas durante o cultivo *in vitro*.

Com relação ao desenvolvimento do sistema radicular *in vitro*, já com seis dias de cultivo pode-se verificar o início na formação de raízes, sendo observados 30% de explantes com raízes visíveis e 25% com visualização de protuberâncias esbranquiçadas (Tabela 7). As maiores respostas para a percentagem de enraizamento foram observadas com 12 e 14 dias de cultivo *in vitro*, com 95 e 90% de brotações enraizadas, respectivamente, diferindo significativamente dos demais tratamentos. Embora não tenha ocorrido desenvolvimento de raízes visíveis em todos os explantes cultivados em meio de enraizamento até 12 e 14 dias de cultivo, pode-se observar protuberâncias esbranquiçadas nos demais explantes destes tratamentos (Tabela 7).

Com relação ao número e comprimento das raízes formadas, as respostas foram semelhantes às obtidas com a percentagem de explantes enraizados, ou seja, explantes cultivados por mais tempo no meio de enraizamento (12 e 14 dias) apresentaram os melhores resultados, com 7,5 e 11,25 raízes por explante, e 0,67 cm e 0,85cm, respectivamente (Tabela 7).

Tabela 4- Percentagem de protuberâncias esbranquiçadas, percentagem de enraizamento, número de raízes por explante e comprimento de raiz, obtidos com brotações do porta-enxerto 'Mr. S. 2/5', cultivados por diferentes períodos em meio de enraizamento

Cultivo <i>in vitro</i> (dias)	Visualização de protuberâncias esbranquiçadas(%)	Percentagem de enraizamento	Número de raízes por explante	Comprimento de raiz (cm)
14	0 b	95 a	11,25 a	0,85 a
12	10 b	90 a	7,50 a b	0,67 a
8	30 a	60 b	3,25 b c	0,35 b
6	25 b	30 c	2,50 c	0,10 c
5	20 b	0 c	0,00 c	0,00 c
C.V.	54,41	18,08	37,14	20,82

*Médias seguidas por letras distintas na coluna, diferem entre si para período de cultivo *in vitro*, pelo teste de Tukey a 5%.

Os resultados obtidos no presente trabalho comprovam a influência do tempo de exposição das brotações em meio de enraizamento no desenvolvimento da rizogênese *in vitro*. De acordo com Mercier (2004), a formação de raízes adventícias ocorre de uma a três semanas, e pode ser dividida em indução, iniciação e alongamento das raízes, sendo que as duas primeiras etapas dependem de auxina no meio de cultura, já o alongamento pode ser inibido nestas condições *in vitro*.

No presente trabalho, observou-se que a percentagem de enraizamento, o número de raízes formadas e o comprimento destas, aumentaram quanto maior foi o período de cultivo *in vitro*, sendo os maiores valores observados nos tratamentos que as brotações permaneceram por maior tempo (12 e 14 dias) mostrando que nestes tratamentos, é quando ocorreu a maior formação de raízes, não sendo, portanto, tempo demasiado a ponto de inibir o alongamento destas, visto que o maior comprimento das raízes foi obtido em meio de enraizamento com 14 dias.

Durante o período de aclimatização, verificou-se que a percentagem de sobrevivência no tratamento em que as brotações foram mantidas por 12 dias em cultivo *in vitro*, foi maior em relação aos demais tratamentos, obtendo 95% de sobrevivência. Entretanto, brotações cultivadas em meio de enraizamento por 6, 8 e 14 dias,

apresentaram menor sobrevivência, com 45, 60 e 40%, respectivamente, e brotações cultivadas por cinco dias não sobreviveram nesta fase (Figura 5)

Com relação ao comprimento da maior raiz obteve-se melhor resultado nos tratamentos com 14 dias de cultivo *in vitro*, com 6,25 cm, porém o maior comprimento da parte aérea foi obtido com plantas cultivadas *in vitro* por 12 dias, com 5,5 cm (Figura 6).

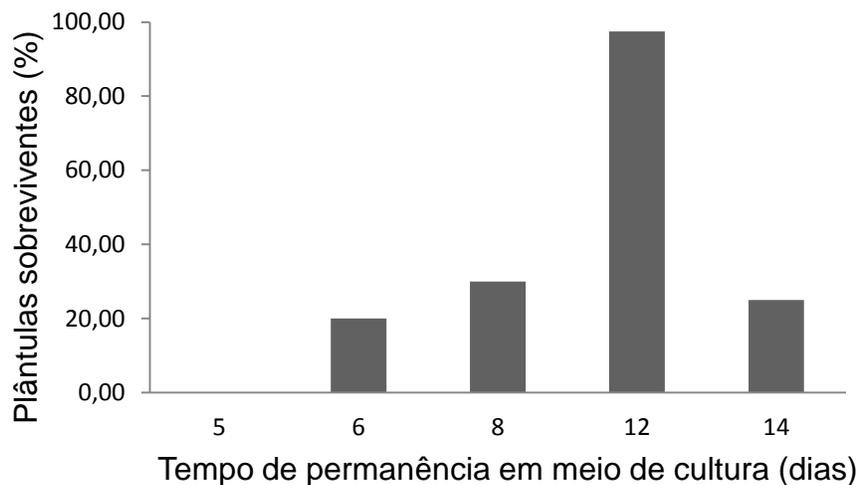


Figura 11 - Percentagem de sobrevivência a partir de plantas que sobreviveram após 30 dias de aclimatização, provenientes de diferentes períodos de cultivo *in vitro*.

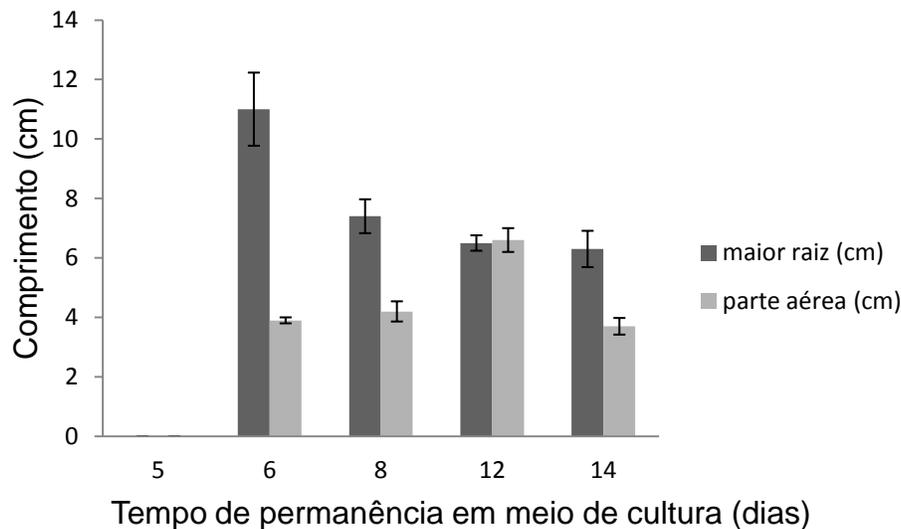


Figura 12 - Comprimento da parte aérea e da maior raiz, obtidos a partir de plantas que sobreviveram após 30 dias de aclimatização, provenientes de diferentes períodos de cultivo *in vitro*.

Estes resultados mostram que o tempo de permanência das brotações no meio de enraizamento influencia significativamente na etapa da aclimatização sendo que a redução do tempo de cultivo *in vitro* com 12 dias não prejudicou a sobrevivência e o desenvolvimento *ex vitro*. Estes resultados corroboram com Grattapaglia; Machado (1998), os quais suportam a hipótese de que a redução de tempo do cultivo em meio de enraizamento pode aumentar e melhorar a aclimatação de plantas na casa de vegetação. Estes autores relatam que a maior sobrevivência com a redução do período de cultivo *in vitro* esta associada a formação de raízes mais curtas, sendo estas mais adequadas para o transplante, pois além de facilitar o manuseio no momento do transplante, normalmente as raízes estão numa fase de crescimento ativo, o que facilita o pegamento e o posterior desenvolvimento *ex vitro* das plantas.

Resultados positivos quanto a redução do período de permanência em meio de enraizamento foram também evidenciados por Pereira; Fortes (2001), os quais verificaram que o transplante das brotações de macieira mantidas por 12 dias *in vitro* possibilitou sobrevivência média superior a 90%.

Embora existam trabalhos que reportam que é desejável a eliminação da etapa de enraizamento *in vitro*, devido ao aspecto econômico e dos benefícios da formação do sistema radicular no substrato (Grattapaglia; Machado, 1998), os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que, para o porta-enxerto 'Mr. S. 2/5', a fase de enraizamento *in vitro* é necessária, visto que no menor período de cultivo *in vitro* (5 dias), as plantas não sobreviveram após o transplântio.

Com relação ao comprimento da maior raiz observado em plantas provenientes de cultivo *in vitro* por 14 dias, se deve, possivelmente, ao fato de estas plantas terem tido maior crescimento no cultivo *in vitro*, favorecendo o crescimento *ex vitro*.

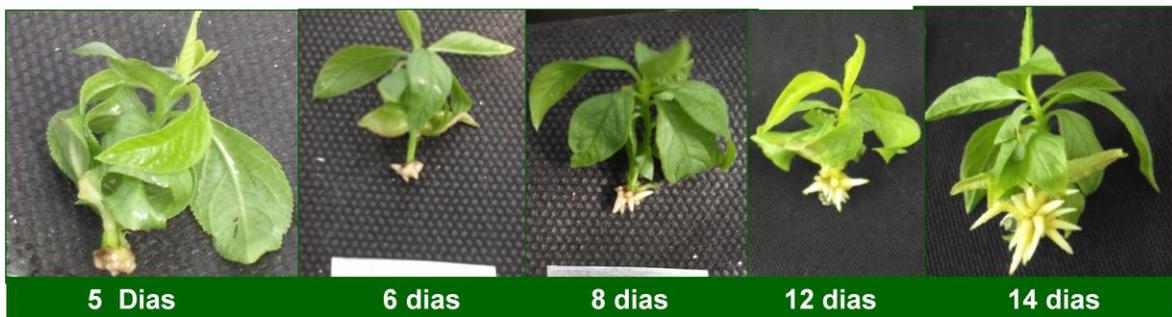


Figura 13 – Explantes de Mr. S. 2/5 com diferentes períodos de cultivo *in vitro*.

3.4-Conclusões

De acordo com as condições em que foram conduzidos os experimentos com o porta-enxerto Mr. S. 2/5, pode-se concluir que:

1- A concentração de $1,6 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB é suficiente para o enraizamento *in vitro* e para obter maior taxa de aclimatização;

2- O período de cultivo *in vitro* por 12 dias em meio contendo $1,6 \text{ mg L}^{-1}$ é recomendado para o enraizamento *in vitro* e aclimatização.

4 Referências

AHMAD, T.; ABBASI, N.A.; HAFIZ, I.A.; ALI, A. Comparison of sucrose and sorbitol as main carbon energy sources in micropropagation. **Pakistan Journal of Botany**, Pakistan, v.39, n.4, p.1269-1275, 2007.

ANDREU, P.; MARÍN, J.A. *In vitro* culture establishment and multiplication of the *Prunus* rootstock Adesoto 101 (*P. insititia* L.) as effected by the type of propagation of the donor plant and by the culture medium composition. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.106, p. 258-267, 2005.

ASSIS, T.F. de; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, . p. 261-296, 1998.

AUGUSTO, C.S.S., BIASI, L.A., TELLES, C.A. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de amoreira-preta cv. Brazos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.3, p.473-476, 2006.

BANDEIRA, J. M. Compatibilidade reprodutiva e micropropagação de ameixeiras japonesas. 2010. 120f. **Tese** (Doutorado em Agronomia, área de concentração em Fruticultura de Clima Temperado), Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2010.

BORKOWSKA, B.; J. SZCZERBA. Influence of different carbon sources on invertase activity and growth of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) shoot cultures. **Journal of Experimental Botany**, Poland, v.42, n. 240, p. 911-915, 1991.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES,A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.) Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: **ABCTP/Embrapa-CNPq**, p.340-345, 1990. **1998**

CAMPANA, B.M.; CASTAGNARI, F.; COVATTA, F.; HENNINGS, M.; POLERO, H.J. Enraizamento *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.

CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C.; BRAGA, E. J. B. Efeito do meio de cultura e de diferentes concentrações de auxinas no enraizamento *in vitro* de *Prunus* cv. Mr. S. 1/8. In: IX Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2003, Atibaia. Resumos... Atibaia, SP. **Brazilian Society of Plant Physiology**, p. 181, 2003.

COSTA, F.H.S.; PASQUAL, M.; PEREIRA, J.E.S.; RODRIGUES, F.A.; MIYATA,L.Y. Relação entre o tempo de enraizamento *in vitro* e o crescimento de plantas de bananeira na aclimatização. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, n.1, p.031-037, 2008.

COUTO, M.; OLIVEIRA, R.P.; FORTES, G.R.L. Multiplicação *in vitro* dos porta-enxertos de *Prunus* sp. 'Barrier' e 'Cadman'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.26, n.1, p.5-7, 2004.

COUTO, M. A.; WAGNER JÚNIOR, A; QUEZADA. A.C. Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* sp. 'Barrier' em diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) e do meio Murashige , Skoog (MS). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 4, p. 367-370, 2003.

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E. Propagação vegetativa por estaquia. In: FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C. **Propagação de Plantas Frutíferas**. Brasília, D.F.: Embrapa Informação tecnológica, p. 69-108, 2005.

FACHINELLO, J.C. Problemática das mudas de plantas frutíferas de caroço. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE FRUTAS DE CAROÇO: PÊSSEGOS, NECTARINAS E AMEIXAS, 1. Porto Alegre. **Anais...** p.25-40, 2000.

FACHINELLO, J.C.; PASA, M. S.; SCHMITZ, J.D.; BETEMPS, D.L. Situação e perspectivas da Fruticultura de Clima Temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, no. spel. p. 109-120, 2011.

FILITI, N.; MONTUSCHI, N.; ROSATI, P. *In vitro* rhizogenesis: histoanatomical aspects on *Prunus* rootstock, **Advances in Horticultural Science**, Firenze, v.1, p. 34-38, 1987.

GAMBORG, O.L. The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. **Plant Physiology**, Lancaster, 45:372-375, 1970.

GRANT, C.R.; REES, T. Sorbitol metabolism by apple seedlings. **Phytochemistry**, New York, v. 20, p. 1505-1511, 1981.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília : Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, v.1, p.183-260, 1998.

HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C.; BERNARDI, J. **Sistema de produção de pêsego de mesa na região da serra gaúcha**. 2003.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**, <http://www.ibge.gov.br>, 2012.

JEONG, J.; CONNOLLY. Homing in on iron homeostasis in plants. **Trends in Plant Science**, v. 14, p. 280-285, 2009

KUMAR, A.; BENDER, L.; NEUMANN, K.H. Growth regulation, plastid differentiation and the development of a photosynthetic system in cultured carrot root explants as influenced by exogenous sucrose and various phytohormones. **Plant Cell, Tissue and Organ Tissue Culture**, v.4, p.11-28, 1984.

LANE, W. D.; Mc DOUGALD, J. M. Shoot tissue culture of apple: comparative response of five cultivars to cytokinin and auxin. **Canadian Journal Plant Science**, Ottawa, v. 62, p. 689-694. 1982.

LÉDO, A. S. *et al.* Efeito da sacarose e do manitol na conservação *in vitro* por crescimento lento de coqueiro anão. **Magistra**, Cruz das Almas-BA, v. 19, n. 04, p. 346-351, 2007.

LLOYD,G.; MCCOWN,B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, Boulder-CO, v.421-427, 1980.

LORETTI, F.; MASSAI, R.: Il contributo dell'Università di Pisa al miglioramento genetico dei portinnesti. **Rivista di Frutticoltura**, Pisa – Itália, n° 4, p. 9-13, 1998.a

LORETI, F. and R. MASSAI. Sirio: new peach x almond hybrid rootstock for peach. **Acta Horticulture** 465:229–236, 1998.b

LUNDERGAN, C., JANICK, J. Low temperature storage of *in vitro* apple shoots. **HortScience**, Alexandria, v.14, p.514, 1979.

MACHADO, A.A.; CONCEIÇÃO, A.R. **WinStat - sistema de análise estatística para Windows. Versão Beta**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2005.

MALAGOLI, M.; DAL CANAL, A. et al. Differences in nitrate and ammonium uptake between Scots pine and European larch. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.221, n.1, p.1-3, 2000.

MARTIN, S.M., ROSE, D. Growth of plant cell (Ipomea) suspension cultures at controlled pH levels. **Can. Journal of Botany**, v.57, p.126-1270, 1976.

MASSERI-LAMRIOUI, A.; LOUERGUIOUI, A.; BONALY, J.; YAKOUB-BOUGDAL, S.; ALLILI, N.; GANA-KEBBOUCHE, S. Proliferation and rooting of wild cherry: The influence of cytokinin and auxin types and their concentration. **African Journal of Biotechnology**. v. 10, n.43, p. 8613-8624, 2011.

MAYER, N. A.; PEREIRA, F. M.; BARBOSA, J. C. Pegamento e crescimento inicial de enxertos do pessegueiro 'Aurora-1' em clones de umezeiro (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) e 'Okinawa' [*Prunus persica* (L.) Batsch] propagados por estacas herbáceas. **Revista Brasileira Fruticultura**, v.2, n.1, Jaboticabal, abril, 2005.

MERCIER, H. Auxinas. In: KERBAUY, G.B. (ed.). **Fisiologia vegetal**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 217-249, 2004.

MINDÊLLO NETO, U.R.; BALBINOT JÚNIOR, A.A. Enraizamento de estacas herbáceas de pessegueiro, cultivar Jubileu, com imersão rápida em AIB. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.17, n.3, p.88-90, 2004.

MINDÊLLO NETO, U.R. Enraizamento de estacas lenhosas de ameixeira com aplicação de ácido indolbutírico e cianamida hidrogenada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.3, p.529-531, 2006.

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.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biomass with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15,n3,p. 473-479. 1962.

NEGASH, A.; PUITE, K.; SCHAART, J.; VISSER, B.; KRENS, F. *In vitro* regeneration and micropropagation of enset from Southwestern Ethiopia. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.62, p.153-158, 2000.

OLIVEIRA, A. P. de; NIENOW, A. A.; CALVETE, E. de O. Capacidade de enraizamento de estacas semilenhosas e lenhosas de cultivares de pessegueiro tratadas com AIB. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 282-285, 2003.

PATI, P.K. et al. *In vitro* propagation of rose: a review. **Biotechnology Advances**, Seul, v. 24, p. 94-114, 2006.

PEDROTTI, E.L., VOLTOLINI, J.A. Enraizamento *ex vitro* e aclimação do porta-enxerto de macieira M.9. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.2,p 234-239, 2001.

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

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.

QUOIRIN, M. ; LEPROIVE, P. Étude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de Prunus. **Acta horticulture**, The Hague,v.78,p.437-442, 1977.

RADMANN, E. B.; FACHINELLO, J. C.; PETERS, J.A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira 'M-9'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.3, p.624-628, 2002.

RADMANN, E.B.; GONÇALVES, E.D.; FORTES, G.R. de L. Concentrações de ácido indolbutírico e períodos de escuro no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta (*Rubus* spp.), cv. Ébano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticaval, v.25, n.1, p.124-126, 2003.

ROCHA, P. S. R. Propagação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* ssp. 101p. **Tese** (Doutorado em Fruticultura de Clima Temperado) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

ROCHA, P. S. G., FACHINELLO, J. C.; SCHUCH, M. W.; BIANCHI, V. J. CAMPOS, R. V. Efeito do ágar, vermiculita e sacarose no enraizamento do porta-enxerto cv. Mr. S. 2/5 *in vitro*. **Revista Científica Rural**, Bagé, v. 11, n.1, p. 54-59, jan./jun., 2006.

ROCHA, P. S. G.; SCHUCH, M. W.; BIANCHI, V. J.; FACHINELO, J. C. Multiplicação e alongamento *in vitro* do porta-enxerto de Prunus. **Bioscience Journal** (UFU), v. 25, p. 69-74, 2009.

RODRIGUES, A.C.; SILVEIRA, C.A.P.; FORTES, G.R. de L.; FACHINELLO, J.C.; SILVA, J.B. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Prunus* sp. em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.1, p.131-133, 2003.

ROGALSKI, M.; MORAES, L.K.A.; FELISBINO, R.C.; CRESTANI, L.; GUERRA, M. P.; SILVA, A. L. Enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* sp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p.293-296, 2003a.

ROGALSKI, M.; MORAES, L.K.A.; FELISBINO, R.C.; CRESTANI, L.; GUERRA, M. P.; SILVA, A. L. Aclimatização de porta-enxertos de *Prunus* sp. micropropagados. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p.279-281, 2003b.

SÁ, A. J. ; LEDO, A. da S.; LEDO. C. A. da. Conservação *in vitro* de microestacas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 01, p. 57-62, 2011.

SANTOS, M.C.; LÉDO, A.S.; LÉDO, C.A.S.; SOUZA, F.V.D.; JUNIOR, J.F.S. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 42, n. 3, p. 735-741, 2011.

SANTOS-SEREJO, J.A.; JUNGHANS, T.G.; SOARES, T.L. SILVA, K.M. Meios nutritivos para micropropagação de plantas. In: SOUZA, A.S.; JUNGHANS, T.G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p. 80-98, 2006.

SCHMIDT, W. Iron solution: acquisition strategies and signaling pathways in plant. **TRENDS in Plant Science**, v. 8, n. 4, p. 188-193, 2003.

SCHMILDT, E.R.; AMARAL, J.A.T.; SCHMILDT, O.; COELHO, I.R.; RABELLO, W.S.; FILHO, S.M. Níveis de ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento *in vitro* de microestacas de mamoeiro 'Tainung 01'. **Acta Scientiarum Agronomy**. Maringá, v. 32, n. 1, p. 125-129, 2010.

SHIBLI, R. A. *et al.* *In vitro* conservation and cryopreservation of plant genetic resources: A review. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 02, n. 04, p. 372-382, 2006.

SILVA, E.S.B. Propagação *in vitro* de *Prunus* spp., 115 p. **Tese** (Doutorado em Fruticultura de Clima Temperado) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.

SILVEIRA, C.A.P.; FORTES, G.R. de L.; FACHINELLO, J.C.; RODRIGUES, A.C.; CITADIN, I.; QUEZADA, A.C.; SILSA, J. da. Multiplicação *i vitro* de porta-enxertos do gênero *Prunus* sob diferentes concentrações de BAP em dois meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v23, n.3, p.488-492, 2001.

SILVEIRA, C. A. P.; FORTES, G. R. de L.; FACHINELLO, J. C.; RODRIGUES, A. C.; CITADIN, I. QUEZADA, A. C.; SILVA, J. B. Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos do gênero *Prunus* sob baixas concentrações e diferentes tipos de auxinas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 24, n. 3, p. 608-610, Dezembro 2002.

SOUZA, F. V. D. et al. (Ed.). **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p. 38-52, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Trad. SANTARÉM, E. R. et al. 4. ed. UFV, 220 p. 2009.

THORPE, T.A. ; BEAUDOIN-EAGAN, L.D. C-metabolism during growth and shoot formation in tobacco callus cultures. **Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, 113:337-346, 1984

TOFANELLI, M. B. D.; CHALFUN, N. N. J.; HOFFMANN, A. et al. Capacidade de enraizamento de estacas lenhosas e semilenhosas de cultivares de pessegueiro. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 4, p. 840-847, 2001.

VIAGANÓ, C.R.; BIANCHI, V.J.; ROCHA, P.S.G.; SCHUCH, M.W.; FACHINELLO, J.C. Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* cv. Mr. S. 1/8: concentrações de IBA

em meio de cultura acrescido de ágar ou vermiculita. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.23, n.3, p.60-65, 2007.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; ASSIS, A. de; ASSIS, G. A. de; ZÁRRAGA, D. Z. A. Micropropagação de duas espécies frutíferas, em meio de cultura DSD1, modificado com fontes de boro e zinco. **Ciência Agrotecnologia**, v.33, n. 2, mar./abr., p. 468 - 472, 2009.

VILLEGAS, M.A; BECERRIL, A.E.R.; AGUIAR,M.A.C. Respuesta *in vitro* de três cultivares de fresa a niveles de NH_4NO_3 . In: CONGRESSO NACIONAL DE FITOGENETICA, 1992. **Anais...**, Chiapas. 1992.

WAGNER, A.J.; COUTO, M.; QUEZADA, A. C. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de ameixeira Julior . **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 2, p. 121-124, 2003.

WIETHÖLTER, S. Revisão das recomendações de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. In: **REUNIÃO SUL BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO**, 4., Porto Alegre, Resumos... Porto Alegre: UFRGS 2002.

YAMAZOE, G.; VILAS BÔAS, O. **Manual de pequenos viveiros florestais**. São Paulo: Páginas ; Letras Editora e Gráfica, São Paulo, 120p., 2003.