

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



Dissertação

Propagação *in vitro* de portaenxertos de pessegueiro 'Flordaguard' e 'GxN-9'

Cristina Weiser Ritterbusch

Pelotas, 2013

CRISTINA WEISER RITTERBUSCH

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE PORTAENXERTOS DE PESSEGUEIRO
'FLORDAGUARD' E 'GxN-9'**

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 Fisiologia Vegetal.

Orientador: Dr^a. Elizete Beatriz Radmann

Co-Orientadores: Prof. Dr. Valmor João Bianchi

Prof. Dr. José Antonio Peters

Pelotas, 2013

Banca Examinadora:

Dra. Elizete Beatriz Radmann (Presidente)

Dr. Leonardo Ferreira Dutra

Dr. Luciano Picolotto

Dra. Daiane Benemann

Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças.

(Charles Darwin)

A minha amada mãe, Liliana, pois
me deste sempre carinho,
dedicação, amor e esperança para
o futuro.

DEDICO

Agradecimentos

A minha mãe, Liliana, pelo seu imenso amor, carinho, incentivo e por sentir-se orgulhosa com as minhas conquistas.

Ao meu pai, Alfredo e minha avó Leonda (*in memoriam*) pelo amor e apoio essencial durante a graduação, que me possibilitou esta conquista de hoje.

Ao meu namorado, Lucas, pelo seu amor, carinho, apoio e incentivo.

Ao Rickson Roberto pelo seu amor e pela sua felicidade em me ver todas às vezes que eu fui para casa.

A minha família em especial minha tia Fabiana, meu tio Ademar e tia Clari, que sempre me apoiaram.

A Dr^a. Elizete Beatriz Radmann, meu agradecimento e admiração por sua dedicação e profissionalismo, por ter sido muito mais que uma orientadora, uma colega de trabalho e uma verdadeira amiga, dando-me sempre apoio.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. José Antônio Peters, pela sua contribuição neste trabalho, pelos seus ensinamentos durante este período e pela sua amizade.

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

Às amigas Janieli (minha irmã do coração), Ana Paula e Vera pelo carinho, incentivo, e uma amizade imensa e verdadeira.

Às amigas Daiane, Tatiane e em especial a Flávia, pelo carinho, amizade, incentivo e força.

À amiga Cibele, pelo carinho e a amizade, e que mesmo de bem longe me ajudou, inúmeras vezes, com seminários, trabalhos, ficando até tarde acordada para rever os slides, sempre do meu lado me incentivando, me fazendo rir e me dando força para continuar.

Às amigas e colegas de casa, Laura, Fernanda e Andrea, que dedicaram seu tempo me ouvindo falar sobre fisiologia vegetal, pelo apoio, incentivo, pelos momentos de descontração, caminhadas e muitas risadas.

Às amigas de Pelotas, Laura, Guiga, vó Maria e Darlene pelo carinho, amizade, incentivo.

Ao casal João e Lúcia, pela amizade, em especial à amiga Lúcia que sempre esteve presente, me ajudando, me dando mil conselhos, me fazendo rir e me incentivando em tudo.

À amiga e colega de laboratório Mirian que sempre esteve ao meu lado, me ajudando com os meus experimentos, com material de estudo, uma amiga querida que vou levar pra toda a vida.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas e colegas de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal

Às amigas e colegas de aula, Natália e Josiane, pela ajuda sempre tão especial nos seminários e trabalhos, pela amizade, companheirismo, coleguismo e também pelo melhor chimarrão.

À colega e amiga Daiane pela sua amizade e por sempre ir almoçar às onze horas comigo.

A “família” Prunus e enxertos, Aline, Letícia, Josiane, Anderson, Daiane, Elisia, Mirian, pela amizade, coleguismo, companheirismo, onde trabalhamos bastante, mas também nos divertimos muito, principalmente limpando a casa de vegetação.

Aos estagiários, Anderson “chefe” e Josiane “mana”, pela ajuda nos experimentos, desde montagens e avaliações como na limpeza de vidraria, pela amizade, carinho, pelos risos e conversas e pelos ótimos momentos. Também a estagiária Mara, que muitas vezes me ajudou e pela sua amizade.

A todos os funcionários e professores, pelo auxílio prestado quando necessitei em especial à secretária do PPGFV, Sandra, pelo carinho, atenção e amizade.

À Universidade Federal de Pelotas pela 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

Resumo

RITTERBUSCH, Cristina Weiser. **Propagação *in vitro* de portaenxertos de pessegueiro ‘Flordaguard’ e ‘GxN-9’**, 2013. 59f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas.

As frutíferas de caroço, como o pessegueiro, vem apresentando expansão anual tanto da produção quanto do consumo no Brasil, sendo o Rio Grande do Sul (RS) o principal produtor nacional. No entanto, comparando com outros Estados brasileiros, a produtividade no RS é considerada baixa, sendo que um dos fatores é a falta de qualidade genética e sanitária do material propagativo. Isso deve-se em parte a forma de obtenção dos portaenxertos, os quais são oriundos de caroços descartados pelas indústrias de conserva, gerando entre outros fatores desuniformidade entre plantas no pomar. Sendo assim a propagação vegetativa a partir da micropropagação constitui-se em uma alternativa de multiplicação dos portaenxertos, obtendo uma grande quantidade de plantas num período curto de tempo em comparação com o método tradicional utilizado. Assim, desenvolver protocolos de propagação vegetativa poderá contribuir no processo de produção de mudas de prunaceas na região Sul do Brasil. O objetivo do presente trabalho foi otimizar a propagação *in vitro* dos portaenxertos ‘Flordaguard’ e ‘GxN-9’. Para tal, o trabalho foi dividido em dois capítulos, um sobre a multiplicação *in vitro* do portaenxerto ‘Flordaguard’ e o segundo referente a multiplicação, enraizamento *in vitro* e aclimatização do portaenxerto ‘GxN-9’. No primeiro capítulo foram testados os meios MS (1/2N) e Himedia, o tipo e a orientação do explante, bem como a concentração de BAP (Benzilaminopurina). No segundo capítulo, objetivou-se avaliar o efeito da concentração das citocininas (BAP e CIN), a fonte e a concentração de carboidrato na fase de multiplicação, e a influência da concentração de AIB no enraizamento e na aclimatização das plantas. Para o portaenxerto ‘Flordaguard’, o meio MS (1/2N) foi superior ao Himedia tanto para o número de brotações por explante quanto para o crescimento destas. O crescimento das brotações foi maior em meio semi-sólido com meio líquido em comparação ao meio semi-sólido sem meio líquido. Entretanto, o tipo e a orientação do explante não influenciou o número

e o comprimento das brotações formadas. Considerando a concentração de BAP, 3 mg L⁻¹ induz maior número de brotações (4,02), porém o maior crescimento (1,85) das brotações ocorreu até a concentração de 0,5 mg L⁻¹ de BAP. Na multiplicação de 'GxN-9', explantes cultivados em meio contendo 0,4 mg L⁻¹ de BAP apresentam o maior número de brotações (2,88), porém o maior crescimento foi obtido nas concentrações de 0,2 mg L⁻¹ de BAP+ 0,2 mg L⁻¹ de CIN (0,72). Já, com relação a fonte e a concentração de carboidrato, 30 g L⁻¹ de sacarose é suficiente para a multiplicação deste portaenxerto. No que diz respeito à fase de enraizamento *in vitro* e de aclimatização, brotações cultivadas em meio de cultura com 1,2 mg L⁻¹ de AIB, tiveram 100% enraizamento, bem como de plantas sobreviventes na fase de aclimatização.

Palavras-chave: *Prunus* spp. Multiplicação *in vitro*. Crescimento. Enraizamento. Aclimatização. Produção de mudas.

Abstract

RITTERBUSCH, Cristina Weiser. *In vitro* propagation of peach rootstock 'Flordaguard' and 'GxN-9 2013. 59p. Dissertation (Master) – Post Graduation Program in Plant Physiology. Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil

The fruitful lump such as peaches, has shown annual growth of both production and consumption in Brazil and Rio Grande do Sul (RS) the leading national producer. However compared to other Brazilian states productivity in RS is considered low and one of the factors is the lack of genetic quality and health of propagation material. This is due in part to the means of acquiring rootstocks, which are derived from discarded lumps by canning industries, among other factors causing imbalance between plants in the orchard. Thus vegetative propagation from the micropropagation constitutes an alternative multiplication of rootstocks, obtaining a large number of plants in a short period of time compared with the traditional method used. Thus developing protocols for vegetative propagation may contribute to the process of producing seedlings prunaceas in southern Brazil. Therefore, the aim of this study was to optimize the in vitro multiplication rootstocks' Flordaguard 'and' GxN-9 'and in vitro rooting and acclimatization of shoots from the rooting medium with the rootstock' GxN-9 '. To this end, the work was divided into two chapters, one on the in vitro multiplication of rootstock "Flordaguard 'and the second concerning the multiplication, rooting and acclimatization of the rootstock' GxN-9 '. In the first chapter means were tested MS (1/2N) and Himedia, type and orientation of the explant and the concentration of BA. In the second chapter aimed to evaluate the effect of the concentration of cytokinins (BA and KIN) and the source and amount of carbohydrate in the multiplication phase, the influence of IBA concentration on rooting and acclimatization of plants. To rootstock 'Flordaguard' MS medium (1/2N) was superior to Himedia both to number of shoots per explant for growth as these. The growth of the sprout was highest in semi-solid medium with a liquid medium in comparison with semi-solid medium without liquid medium. However the type and orientation of the explant did not influence the number and length of shoots formed. For BA concentration, 3 mg L⁻¹ induces greater number of shoots (4.02) but the greatest growth (1.85) of shoots occurred until the concentration of 0.5 mg L⁻¹ BA. In the

multiplication of 'GxN-9' explants cultured in medium containing 0.4 mg L^{-1} BA have the highest number of shoots the largest growth was achieved at concentrations of 0.2 mg L^{-1} BA + 0.2 mg L^{-1} KIN (0.72). Now, as to the source and concentration of carbohydrate, 30 g L^{-1} sucrose is sufficient for the greatest number of shoots. As regards à rooting phase in vitro and acclimatization induction, shoots cultivated in culture medium with 1.2 mg L^{-1} IBA, they had 100% rooting, well as of plants survivors in the phase of acclimatization.

Keywords: Prunus. Multiplication in vitro. Growth. Rooting. Acclimatization. Seedling production.

Sumário

Resumo.....	09
Abstract.....	11
1 Introdução geral.....	15
2 Metodologia geral.....	18
2.1 Estabelecimento <i>in vitro</i>	18
3 Capítulo 1- Multiplicação <i>in vitro</i> do portaenxerto ‘Flordaguard’	19
3.1 Introdução	19
3.2 Material e métodos	21
3.2.1 Estudo 1- Composição do meio de cultura	21
3.2.2 Estudo 2- Tipo e orientação do explante	22
3.2.3 Estudo 3- Concentrações de BAP	22
3.3 Resultados.....	23
3.3.1 Estudo 1- Composição do meio de cultura	23
3.3.2 Estudo 2- Tipo e orientação do explante	25
3.3.3 Estudo 3- Concentrações de BAP	26
3.4 Discussão	28
3.4.1 Estudo 1- Composição do meio de cultura	28
3.4.2 Estudo 2- Tipo e orientação do explante	30
3.4.3 Estudo 3- Concentrações de BAP	30
3.5 Conclusões	32
4 Capítulo 2- Multiplicação, enraizamento e aclimatização do portaenxerto de pessegueiro ‘GxN-9’	33
4.1 Introdução	33
4.2 Material e métodos	35
4.2.1 Estudo 1- Fonte e concentração de citocinina na multiplicação	35
4.2.2 Estudo 2- Fonte e concentração de carboidrato na multiplicação	35
4.2.3 Estudo 3- AIB no enraizamento <i>in vitro</i> e na aclimatização.....	36
4.3 Resultados	37

4.3.1	Estudo 1- Fonte e concentração de citocinina na multiplicação	37
4.3.2	Estudo 2- Fonte e concentração de carboidrato na multiplicação	37
4.3.3	Estudo 3- AIB no enraizamento <i>in vitro</i> e na aclimatização	39
4.4	Discussão	42
4.4.1	Estudo 1- Fonte e concentração de citocinina na multiplicação	42
4.4.2	Estudo 2- Fonte e concentração de carboidrato na multiplicação	44
4.4.3	Estudo 3- AIB no enraizamento <i>in vitro</i> e na aclimatização	45
4.5	Conclusões	47
5	Considerações Finais	48
6	Referências	49

1 Introdução Geral

No Brasil, em 2011 foram produzidas 222 mil toneladas de pêssego, sendo o Estado do Rio Grande do Sul responsável por 129 mil toneladas da produção (IBGE, 2013).

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). Embora, o RS seja o maior produtor nacional, comparado com outros Estados, sua produtividade é baixa. Isto se deve em parte a alguns fatores como, a qualidade genética e sanitária do material propagativo, incidência de pragas e doenças e a falta de portaenxertos adaptados a região (CAMPOS, 2005).

O sistema de produção de mudas de pessegueiro no Sul do Brasil é usualmente realizado através da enxertia, envolvendo as fases de obtenção dos portaenxertos e da enxertia propriamente dita (FACHINELLO et al., 2005). Praticamente, todos os portaenxertos utilizados por viveiristas são provenientes de caroços obtidos nas indústrias de conserva, contendo misturas varietais de cultivares copa, que resultam em problemas relacionados à desuniformidade de plantas no pomar e diferentes reações a pragas e doenças do solo (MAYER et al., 2005).

Nos últimos anos tem-se buscado mudar este cenário visando melhorar o processo de obtenção dos portaenxertos. A fim de incentivar o não uso de caroços provenientes da indústria como material propagativo e também os métodos de propagação vegetativa, seja por estaquia ou por cultivo *in vitro*, visando obter portaenxertos clonais.

A propagação por estaquia, tanto para cultivares de portaenxerto quanto para as cultivares copa tem apresentado limitações devido ao baixo percentual de enraizamento e/ou de sobrevivência de muitos genótipos, o que tem inviabilizado a utilização desta técnica na produção comercial de mudas até o momento (CARDOSO et al., 2011).

De acordo com Hoffmann et al. (2003), este cenário em grande parte está associado à necessidade de investimento em infraestrutura para propagação e sobrevivência por parte dos viveiristas, visando melhorar a taxa de enraizamento e sobrevivência dos portaenxertos, possibilitando o desenvolvimento ótimo do sistema radicular, crescimento rápido para a realização de enxertia e que compensem a substituição do portaenxerto obtido por sementes.

Uma alternativa a propagação vegetativa por estaquia, é a micropropagação, pois esta possui maior capacidade propagativa do que a estaquia, devido ao rejuvenescimento das plantas propagadas *in vitro* (ANDREU; MARÍN, 2005).

Segundo Gutierrez et al. (2011) o cultivo *in vitro* tem sido considerado uma alternativa potencialmente viável de clonagem de espécies lenhosas em larga escala e de produção comercial. As suas principais vantagens são, permitir a multiplicação de plantas livres de doenças, a produção de um elevado número de plantas, em um curto período de tempo, ocupando uma área física bastante reduzida, se comparada com os métodos convencionais de multiplicação e independentemente da época do ano (SOUZA et al., 2006; VIGANÒ et al., 2007). Porém, a composição e concentração dos fitoreguladores usados no meio são fatores determinantes para o crescimento e o de desenvolvimento dos explantes.

Embora a micropropagação seja amplamente utilizada para algumas espécies, seu uso em espécies lenhosas como o gênero *Prunus* ainda não foi incorporado no sistema de produção de mudas no Brasil. Alguns fatores que contribuem para isso refere-se às características de cultivo para cada cultivar, limitações com relação à oxidação de explantes, contaminação por fungos e bactérias endofíticas, baixas taxas de estabelecimento a partir de meristema, bem como baixo número de brotações e comprimento reduzido destas (SILVEIRA et al., 2001; RADMANN et al., 2009).

Para a fase de enraizamento *in vitro* e aclimatização, são poucos os trabalhos com o gênero *Prunus*, principalmente referentes à aclimatização. Para Costa et al. (2008) a fase de enraizamento determina o sucesso da aclimatização das plantas quando transplantadas para a casa de vegetação.

O enraizamento de brotações *in vitro* é induzido geralmente por meios adicionados de auxina, sendo sua fonte e concentração as variáveis que mais influenciam durante esta etapa (SANTOS-SEREJO et al., 2006).

A etapa seguinte ao enraizamento *in vitro* é a aclimatização, sendo esta a mais delicada no processo da micropropagação, pois pode significar a limitação de todo o processo de multiplicação *in vitro* devido as altas taxas de perda que podem acarretar quando estas são transferidas para condições *ex vitro*. As plantas cultivadas *in vitro*, são altamente sensíveis à desidratação, pois o cultivo *in vitro* oferece um microclima proporcionando um ambiente fechado, sem trocas gasosas, alta umidade do ar, baixa intensidade luminosa, além do fornecimento de açúcares como fonte de carbono e energia (RESENDE et al., 2010; HORBACH et al., 2011).

O emprego de auxinas na fase do enraizamento *in vitro* tem revelado eficiência, promovendo acréscimo na taxa de sobrevivência das plantas aclimatizadas. Para minimizar e evitar perdas nesta fase, a adaptação das plantas propagadas *in vitro* deve ser realizada de forma gradual. Para isso, cuidados relacionados a manutenção da umidade, controle de temperatura e da luminosidade evitará ou reduzirá o estresse das plantas e conseqüentemente diminuirá as chances de morte (HAZAKIKA, 2006).

Os portaenxertos, 'Flordaguard' e 'GxN-9' são alternativas promissoras para o Rio Grande do Sul devido as condições climáticas favoráveis e também por apresentarem resistência aos nematoides mais comúntes encontrados na região. Já existem alguns trabalhos de multiplicação e de enraizamento com estas cultivares, mas ainda não foram suficientes para estabelecer um protocolo adequado. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo otimizar a multiplicação *in vitro* dos portaenxertos de pessegueiro 'Flordaguard' e 'GxN-9', bem como o enraizamento *in vitro* e aclimatização do 'GxN-9', visando identificar fatores que interferem na micropropagação destes portaenxertos.

2 Metodologia geral

2.1 Estabelecimento *in vitro*

Explantes de 'Flordaguard' e 'GxN-9' foram estabelecidos *in vitro* a partir de plantas matrizes mantidas em casa de vegetação, sendo estas, previamente pulverizadas a cada dois dias com bactericida (Kasumin 0,3%) e fungicida (Orthocide 0,2%).

Para o estabelecimento *in vitro*, durante a fase de intenso crescimento vegetativo das plantas, ramos foram colhidos, e no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas/DB/IB/UFPEL, estes foram seccionados em porções contendo 3-4 entrenós e desinfestados em solução de álcool 70% por 15 segundos e hipoclorito de sódio 2,5% por 15 minutos. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, procedeu-se a tríplice lavagem com água destilada autoclavada.

Segmentos nodais com aproximadamente 1,0 cm, contendo uma gema axilar, foram preparados e inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), mio-inositol (100 mg L^{-1}), sacarose (30 g L^{-1}), ágar (7 g L^{-1}), com pH ajustado para 5,8 e sem fitoreguladores. 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 $48 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Para cultivar 'Flordaguard' os segmentos que brotaram foram multiplicados em meio MS (1/2 N) com 4 mg L^{-1} de BAP e $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB e para a cultivar 'GxN-9' 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.

3 Capítulo 1 - Multiplicação *in vitro* do portaenxerto 'Flordaguard'

3.1 Introdução

A cultivar Flordaguard desenvolvida na Universidade da Flórida, nos Estados Unidos, em 1991, é resultante do cruzamento entre *Prunus persica* x *Prunus davidiana* e tem sido citada como alternativa promissora para as condições brasileiras, pois, apresenta pouca exigência em frio, estimada em torno de 300 horas, resistência às duas espécies de *Meloidogyne* (*M. javanica* e *M. incognita*) mais comumente encontradas no Rio Grande do Sul, bem como possível tolerância ao *Mesocriconea xenoplax*, agente primário relacionado à morte precoce do pessegueiro (ROSSI et al., 2004). Este portaenxerto possui folhas de coloração avermelhada e destaca-se pela indução de médio vigor na copa e boa afinidade com o enxerto (FINARDI, 1998), podendo assim ser uma boa opção para a produção de mudas na cultura do pessegueiro.

No que se refere a produção de mudas de prunáceas, a micropropagação de porta-enxertos seria uma alternativa para sua propagação, visto que, a propagação vegetativa por estaquia apresenta limitações para utilização em escala comercial. A técnica de cultura de tecidos ocupa posição de destaque e se mostra como alternativa viável de clonagem de espécies lenhosas para a formação de pomares clonais ou produção comercial de mudas (ROGALSKI et al., 2003a). No entanto, para o gênero *Prunus*, existem dificuldades na multiplicação, como o reduzido número de brotações formadas por explante e o baixo crescimento das mesmas (RADMANN et al., 2009).

Na propagação *in vitro* vários são os fatores que podem determinar seu sucesso. Dentre estes, pode-se destacar a formulação do meio, a consistência do

meio, fitorreguladores e suas concentrações, bem o tipo de explante utilizado. A escolha adequada do meio de cultura é um dos primeiros fatores a ser considerado, devido ao importante papel dos componentes minerais no processo de multiplicação (RAMAGE; WILLIANS, 2002). O meio MS é o mais utilizado para diversas espécies, porém, para o gênero *Prunus*, diluições deste meio ou mesmo outras formulações contendo menores concentrações de sais, podem ser usadas de acordo com a espécie ou cultivar, conforme observado nos trabalhos de Silveira et al. (2001), Couto et al. (2004) e Rocha et al. (2007).

Na cultura de tecidos, a adição de fitoreguladores no meio nutritivo é de suma importância, sendo as citocininas na maioria das vezes indispensáveis, pois estas são responsáveis pela indução de brotações axilares e superação da dominância apical (RADMANN et al., 2009). A orientação e o tipo do explante também podem influenciar na multiplicação *in vitro*, pois durante esta fase, alguns tratamentos podem ser dados aos explantes para estimular uma maior proliferação, como a excisão do ápice, podendo desta forma contribuir significativamente no desenvolvimento das brotações (SANTOS-SEREJO et al., 2006).

Além dos fatores citados acima, a adição de carvão ativado no meio de cultura também pode influenciar o cultivo *in vitro*, pois além de evitar ou reduzir a oxidação dos explantes, o carvão ativado adsorve produtos do metabolismo das plantas, absorve fitoreguladores e outros compostos orgânicos, além de liberar substâncias naturalmente presentes no carvão, as quais podem beneficiar o crescimento *in vitro* das brotações formadas durante a fase de multiplicação (VAN WINKLE et al., 2003).

Para o gênero *Prunus* existem vários trabalhos em cultura de tecidos, porém devido à elevada variabilidade nos resultados, torna-se necessário verificar as condições de cultivo para cada espécie e/ou cultivar. Além disso, para o porta-enxerto 'Flordaguard' existem poucos trabalhos referentes a multiplicação *in vitro*, sendo observado nestes principalmente a limitação no crescimento das brotações formadas (RADMANN et al., 2011). As brotações multiplicadas que apresentam pequeno comprimento poderão apresentar baixo percentual de enraizamento se estas forem diretamente cultivadas em meios de enraizamento, ou originar mudas de baixa qualidade para a fase de aclimatização (SILVA, 2004).

Portanto, buscou-se neste trabalho estudar a influência da concentração de sais do meio MS, tipo e orientação dos explantes sobre o meio de cultura e a concentração de BAP na multiplicação *in vitro* do portaenxerto 'Flordaguard'.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Estudo 1 - Composição do meio de cultura

Este estudo teve como objetivo avaliar a influência dos meios MS, com metade da concentração de nitrogênio (MS ½ N), e Himedia, sendo este constituído pela mesma composição do meio MS, porém é composto por uma formulação comercial pronta.

Experimento 1 - Na instalação do experimento ambos os meios foram adicionados de 4 mg L⁻¹ de BAP, 0,01 mg L⁻¹ de AIB, 100 mg L⁻¹ mio-inositol, 30 g L⁻¹ sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar. Após a distribuição de 40 mL de meio de cultura nos frascos com tampas de alumínio, estes foram autoclavados à temperatura de 121 °C durante 20 minutos. Brotações com ápice com aproximadamente 1,0 cm, foram inoculados nos meios de cultura, com dez repetições e transferidos para sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo luminoso de 48 μmol m⁻²s⁻¹, permanecendo nestas condições por 30 dias. Posteriormente, realizou-se a avaliação do experimento, analisando o número de brotações por explante.

Experimento 2 – Após a avaliação do primeiro experimento, os explantes foram transferidos para novo meio de cultura, contendo 0,5 mg L⁻¹ de BAP, sendo os demais constituintes dos meios os mesmos da fase anterior. Trinta dias após realizou-se a segunda avaliação, registrando-se a percentagem de brotações que cresceram e comprimento destas (cm).

Experimento 3 - Neste experimento, 50% dos explantes cultivados em meio MS 1/2N e 50% dos cultivados em meio Himedia foram transferidos para o mesmo meio, porém contendo 1,0 g L⁻¹ de carvão ativado e 1,0 mg L⁻¹ de AG₃, e a outra metade dos explantes foram mantidos no mesmo meio em dupla-fase, ou seja, com adição de 10 ml de meio líquido, contendo 1,0 g L⁻¹ de carvão ativado e 1,0 mg L⁻¹

de AG₃ em cada frasco. Após 20 dias realizou-se a terceira avaliação, registrando-se a percentagem de brotações que cresceram e comprimento destas (cm).

Os experimentos foram conduzidos em delineamento completamente casualizado, com dois tratamentos [meio MS (1/2N) e meio Himedia] e com dez repetições no primeiro e segundo experimento, sendo cada repetição constituída por um frasco com quatro explantes, totalizando 40 explantes por tratamento. No terceiro experimento, foram utilizados quatro tratamentos [(MS 1/2N) semi-sólido com carvão ativado; (MS 1/2N) semi-sólido + meio líquido com carvão ativado e AG₃; Himedia semi-sólido com carvão ativado; Himedia semi-sólido + meio líquido com carvão ativado e AG₃], com cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por um frasco com quatro explantes, totalizando 20 explantes por tratamento. 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; CONCEIÇÃO, 2005).

3.2.2 Estudo 2 - Tipo e orientação do explante

Explantes com e sem ápice na orientação vertical e inclinado em relação ao meio de cultura com aproximadamente 1,0 cm, foram inoculados em meio MS(1/2N) com 3,0 mg L⁻¹ de BAP, 0,01 mg L⁻¹ de AIB, 100mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, 7g L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,8. Trinta dias após, adicionou-se 10 ml de meio MS (1/2N) líquido, contendo 1,0 mg L⁻¹ de carvão ativado e 1,0 mg L⁻¹ de AG₃ em cada frasco, caracterizando o meio dupla-fase. Decorridos 20 dias realizou-se a avaliação, registrando-se o número de brotações por explante, percentagem de brotações que cresceram e comprimento destas (cm).

O experimento foi conduzido em delineamento completamente casualizado, com fatorial 2x2, sendo dois tipos de explante (com e sem ápice) e duas orientações (vertical e inclinado), sendo estes analisados da mesma forma que o primeiro estudo.

3.2.3 Estudo 3 - Concentrações de BAP

Brotações sem ápice, com aproximadamente 1,0 cm, foram inoculadas em meio MS (1/2N) suplementado com 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar, 0,01 mg L⁻¹ de AIB e diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹), com pH ajustado para 5,8. Trinta dias após a instalação do experimento, adicionou-se 10 ml de meio MS (1/2N) líquido, contendo 1,0 mg L⁻¹ de carvão ativado e 1,0 mg L⁻¹ de AG₃ em cada frasco, caracterizando o meio dupla-fase. Vinte dias após realizou-se a avaliação, a partir do número de brotações por explante, percentagem de brotações que cresceram e comprimento destas (cm).

O experimento foi conduzido em delineamento completamente casualizado, com cinco níveis (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹) sendo os dados analisados por regressão polinomial, utilizando o programa WinStat 2.0 (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2005).

3.3 Resultados

3.3.1 Estudo 1 - Composição do meio de cultura

Experimento 1 - O número de brotações por explante foi superior no meio MS (1/2N), com a formação do dobro do número de brotações (3,0) em relação ao meio Himedia (1,5) (Figura 1 e Figura 2).

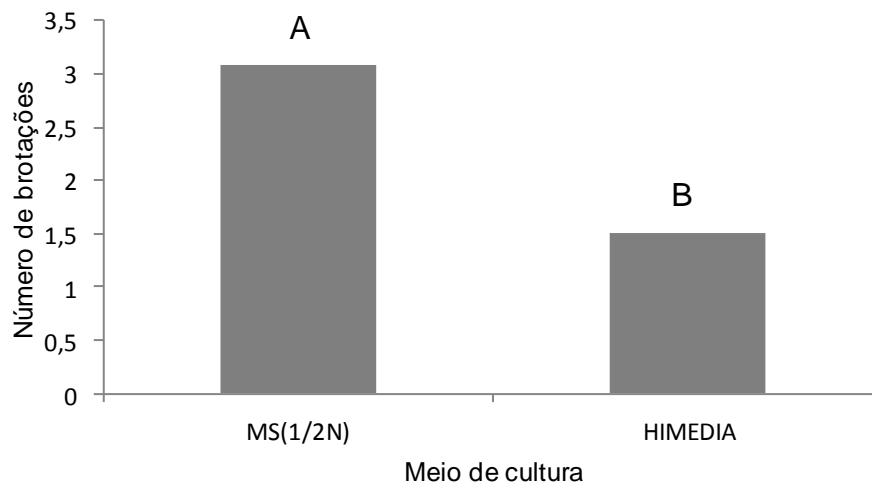


Figura 1 – Número de brotações por explante do portaenxerto 'Flordaguard' após 30 dias de cultivo em meio MS (1/2N) e meio Himedia.

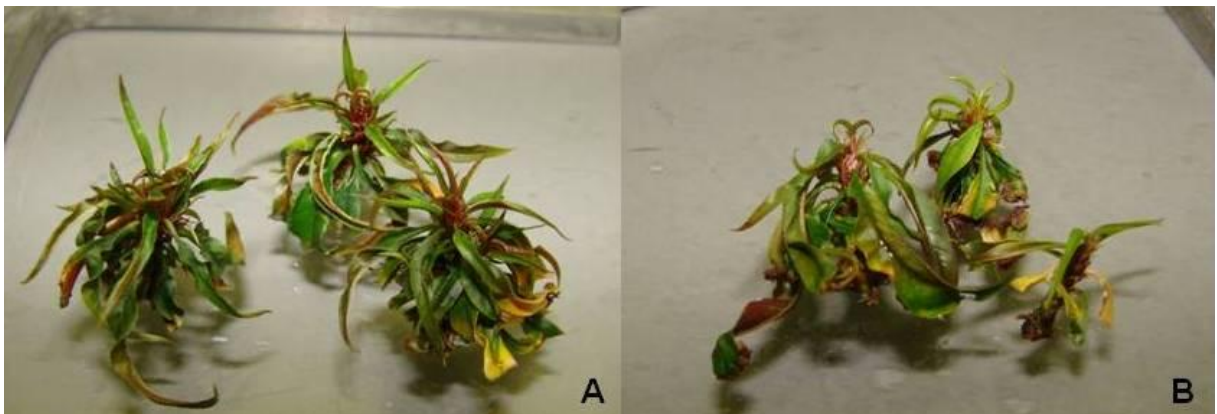


Figura 2 – Aspectos das brotações do portaenxerto 'Flordaguard' após 30 dias de cultivo em meio MS (1/2N) (A) e meio Himedia (B).

Experimento 2 - Quando as brotações foram transferidas para meio de cultura com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, a percentagem de brotações que cresceram e o comprimento das brotações diferiram entre os meios, sendo o meio MS (1/2N) superior em relação ao meio Himedia para ambas as variáveis em 33 e 42%, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1- Percentagem de brotações que cresceram e comprimento das brotações (cm) obtidos com o portaenxerto 'Flordaguard', cultivados por 30 dias em meio MS (1/2N) e Himedia com 0,5 mg L⁻¹ de BAP

Meio de Cultura	Brotações que Cresceram (%)	Comprimento das brotações (cm)
MS (1/2 N)	74,33 a	0,43 a
HIMEDIA	50,00 b	0,25 b
C.V.(%)	32,13	37,77

Médias seguidas por letras minúsculas distintas diferem entre si para o fator meio de cultura, pelo teste de Tukey a 5%

Experimento 3 - A maior percentagem de crescimento das brotações foi observada quando os explantes foram cultivados em meio MS (1/2N) com dupla-fase com 98,33%. Porém, o maior comprimento das brotações foi observado em ambos os meios com dupla-fase, com 1,8 cm (MS1/2N) e 1,54 cm (Himedia) (Tabela 2).

Tabela 2 – Percentagem de brotações que cresceram e comprimento das brotações (cm), obtidos com o portaenxerto 'Flordaguard', cultivados por 20 dias em diferentes meios

Meio Cultura	Brotações que Cresceram (%)	Comprimento das brotações (cm)
MS(1/2N) dupla-fase	98,33 a	1,80 a
MS(1/2N) semi-sólido + carvão ativado	52,66 b	0,94 b
Himedia dupla-fase	44,33 c	1,54 ab
Himedia semi-sólido + carvão ativado	00,00 c	0,00 c
C.V.(%)	14,57	28,63

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

3.3.2 Estudo 2- Tipo e orientação do explante

Para o número de brotações por explante, observou-se efeito isolado dos fatores estudados, observando-se maior resposta para os explantes sem ápice e na orientação inclinada, com 4,6 e 4,4, respectivamente (Tabela 3). A percentagem de brotações que cresceram foi influenciada apenas pelo fator tipo de explante, sendo a maior resposta verificada com explantes sem ápice, com 66% (Tabela 3). Entretanto,

para o comprimento das brotações não houve diferença significativa, obtendo-se como média geral 0,93 cm (dados não apresentados).

Tabela 3- Número de brotações por explante (tipo de explante), número de brotações por explante (orientação do explante) e percentagem de brotações que cresceram (tipo de explante) obtidos com o portaenxerto 'Flordaguard', cultivados por 30 dias em meio MS(1/2N) com 3,0 mg L⁻¹ de BAP e 20 dias em meio dupla-fase

Tipo de explante	Número de brotações por explante
Sem ápice	4,60 a
Com ápice	3,80 b
C.V.(%)	8,68
Orientação do explante	Número de brotações por explante
Inclinado	4,40 a
Vertical	3,90 b
Tipo de explante	Brotações cresceram (%)
Sem ápice	66,23 a
Com ápice	55,55 b
C.V.(%)	13,95

Médias seguidas por letras minúsculas distintas diferem entre si para o fator tipo e orientação de explante, pelo teste de Tukey a 5%

3.3.3 Estudo 3 - Concentrações de BAP

Quando se avaliou o efeito do BAP sobre o número de brotações por explante, obteve-se uma resposta linear crescente, com 3,4 brotações na concentração de 3,0 mg L⁻¹ (Figura 3).

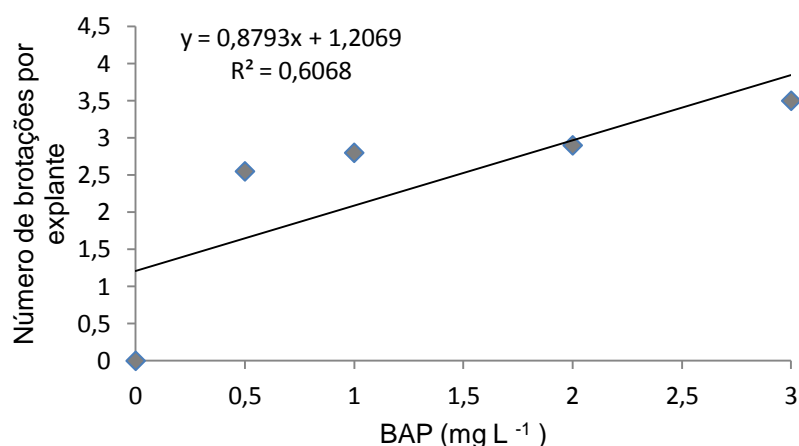


Figura 3 – Número de brotações por explante do portaenxerto ‘Flordaguard’ após 30 dias de cultivo em meio MS (1/2N) em dupla-fase com diferentes concentrações de BAP.

Com relação ao resultado da percentagem de brotações que cresceram e o comprimento das brotações, obteve-se uma resposta quadrática, com ponto de máxima de 1,82 e 1,95 mg L⁻¹ de AIB, respectivamente, ou seja, a partir destas concentrações observou-se uma redução para estas variáveis (Figura 4).

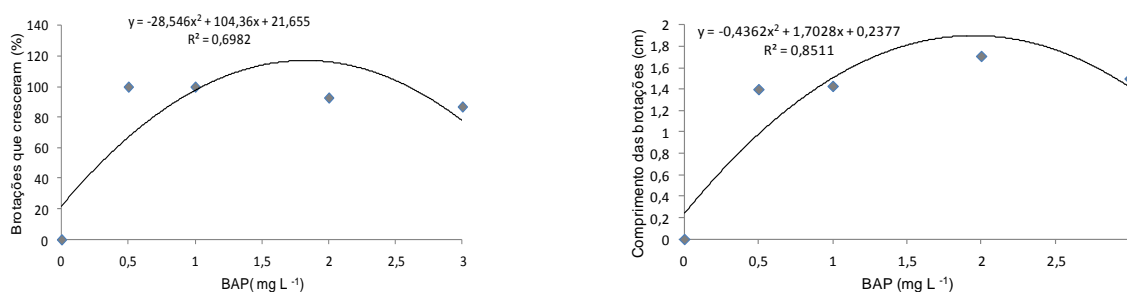


Figura 4 - Percentagem de brotações que cresceram (esquerda) e comprimento das brotações (cm) (direita), do portaenxerto ‘Flordaguard’, obtidos em meio MS (1/2N) dupla-fase, com diferentes concentrações de BAP.

3.4 Discussão

3.4.1 Estudo 1 - Composição do meio de cultura

O meio MS com a metade da concentração das fontes de nitrogênio foi superior ao meio Himedia tanto para a indução das brotações quanto para o comprimento destas, em todas as avaliações realizadas. Embora o meio MS semi-sólido seja o mais utilizado em trabalhos para a propagação *in vitro*, dependendo da

cultivar, o meio MS pode ser usado na formulação diluída, pois a multiplicação *in vitro* é controlada pela interação genótipo x composição do meio (TAMAKI et al., 2007). Algumas espécies e/ou cultivares podem apresentar melhores respostas em meios com maior quantidade de nitrogênio, porém visando o melhor desenvolvimento das plantas e a redução nos custos, vários autores como Ramage e Willians (2002) e Tamaki et al. (2007) relatam a possibilidade de reduzir a concentração de sais do meio MS para diversas plantas lenhosas, podendo esta diferença justificar os melhores resultados com o portaenxerto 'Flordaguard'.

Comprovando esta característica, Villa et al., (2009) trabalhando com amoreira-preta (*Rubus* sp.) e Couto (2003) com o portaenxerto 'Tsukuba 1', observaram uma maior adaptabilidade destas cultivares ao meio com menor concentração salina. Por outro lado, Nagao et al. (1994) estudando citros obtiveram os melhores resultados para o número de brotações utilizando o dobro da concentração de nitrogênio presente no meio MS, com 5,9 brotações por explante. Essa necessidade de nitrogênio esta associada à necessidade de biossíntese de aminoácidos e compostos nitrogenados (NAGAO et al., 1994).

O nitrogênio geralmente é fornecido nos meios de cultura na forma de nitrato de amônio e nitrato de potássio sendo de grande importância, pois favorece a absorção de outros íons presentes nesse meio, além de ser o principal componente em quantidade no meio de cultura, contribuindo de forma efetiva tanto no metabolismo celular como na regulação do seu potencial osmótico (NAGAO et al., 1994). O nitrogênio é essencial por fazer parte de inúmeras estruturas orgânicas, compondo os nucleotídeos, que formam os ácidos nucléicos (RNA e DNA), como também aminoácidos, que constituem as proteínas, estando presente ainda na própria molécula de clorofila (RUSSOWSKI, NICOLOSO, 2003).

A aquisição do nitrogênio pela planta depende de sistemas e transporte na membrana plasmática de células de raízes dos mecanismos que regulam a atividade de nitrogênio, sistema de transporte, crescimento da raiz e de acordo com os requisitos de crescimento das plantas (JACKSON et al., 2008).

Os resultados do presente trabalho demonstraram que a variação de componentes essenciais do meio MS alteram o padrão de desenvolvimento das plantas, demonstrando que o portaenxerto 'Flordaguard' é pouco exigente em relação ao macronutriente nitrogênio.

Com relação ao crescimento das brotações, quando os explantes foram transferidos para meio contendo 0,5 mg L⁻¹ de BAP, houve incremento no crescimento, pois a concentração anterior (4 mg L⁻¹ de BAP) foi tóxica, inibindo o crescimento das brotações (PAEK; HAHN, 2000).

A maior resposta no crescimento das brotações observada nos meios semi-sólido com meio líquido (dupla-fase), pode ter ocorrido pela maior disponibilidade de nutrientes, pois nutrientes e fitoreguladores são mais facilmente absorvidos pelas brotações e/ou plantas em meio líquido do que em meio de cultura semi-sólido, propiciando maior taxa de crescimento (DE LA VIÑA et al., 2001). Já o carvão ativado funciona como um adsorvedor dos produtos provenientes do metabolismo vegetal, bem como substâncias hormonais e vitaminas (TORRES et al., 2001). Além disso, o carvão ativado tem a capacidade de reter os nutrientes no meio de cultura, disponibilizando estes compostos de forma gradual para a absorção das brotações. Thurow et al. (2011), obtiveram um maior crescimento das brotações da ameixeira 'América' quando os explantes foram cultivados em meio de cultura contendo carvão ativado durante a fase de multiplicação *in vitro*. De acordo com Radmann et al. (2009), o crescimento das brotações formadas durante a fase de multiplicação é uma variável determinante na qualidade do material destinado a fase de enraizamento.

3.4.2 Estudo 2- Tipo e orientação do explante

Os melhores resultados obtidos com os explantes sem ápice provavelmente esta relacionado a superação da dominância apical, ou seja, com a remoção do ápice aumenta a relação citocinina/auxina (RADMANN et al., 2009). A orientação do explante também esta relacionado ao balanço hormonal, ou seja, é um fator importante a ser considerado no crescimento *in vitro* em razão das concentrações endógenas de fitoreguladores no tecido. De acordo com Radmann et al. (2011), o transporte de auxinas na planta é polar, e é provável que este transporte seja importante para a regulação da inibição do desenvolvimento das gemas laterais. Desta maneira, a orientação do explante inclinado pode ter inibido esta translocação de auxina, ocorrendo uma maior brotação.

Resultados similares ao presente trabalho foram encontrados por Radmann et al. (2009) com porta-enxerto de pessegueiro da cultivar GxN-9. Estes autores obtiveram maior número de brotações com a utilização de explantes sem ápice em relação a explantes com ápice, 3,03 e 2,67, respectivamente. Em estudos com portaenxerto de macieira cultivar 'Marubakaido', Erig et al. (2002) observaram que o maior número de brotações foi obtido com explantes na orientação horizontal (5,81) quando comparado com a orientação vertical com (3,78). Porém, resultados diferentes foram encontrados em macieira cv. MM-111 e pereira cv. Carrik, onde os autores não observaram efeito significativo entre os explantes com e sem excisão do ápice. Este resultado pode estar associado a espécie e ao tipo de explante utilizado, pois este pode causar uma fonte de variação na resposta final, sendo importante trabalhar com material homogêneo para uma maior precisão na estimativa da multiplicação (PEREIRA; FORTES, 2001).

3.4.3 Estudo 3 - Concentrações de BAP

Segundo estudos já realizados com *Prunus*, as concentrações de BAP no meio de multiplicação que induziram respostas positivas variaram de 0,1 a 6,0 mg L⁻¹, de acordo com a espécie ou cultivar (RADMANN et al., 2009). Radmann et al. (2011) estudando a multiplicação *in vitro* do portaenxerto 'Flordaguard' usando explantes com ápice também verificaram uma resposta linear para o número de brotações por explante, porém no presente trabalho, concentrações menores como 0,5 mg L⁻¹ de BAP induziram o mesmo número de brotações que foram obtidas por Radmann et al. (2011) com 3,0 mg L⁻¹ de BAP quando utilizado explante com ápice. A superioridade do número de brotações obtidas em explantes sem ápice esta relacionada a superação da dominância apical, requerendo estes explantes menor concentração de citocinina exógena, visto que, com a retirada do ápice aumenta a relação citocinina/auxina. Portanto, nem sempre o acréscimo de citocinina exógena no meio de cultura aumenta o número de brotações formadas, podendo levar a formação de desordens fisiológicas, redução do número de brotações, como também a redução no crescimento das brotações (TEIXEIRA et al., 2004). Segundo Leontiev-orlov et al. (2000) o excesso de citocinina no meio de cultura pode ser tóxico ao explante, caracterizando-se, principalmente, pela falta de crescimento das

brotações, justificando assim a redução no crescimento das brotações a partir de 2,0 mg L⁻¹ de BAP no presente trabalho (Figura 4).

Com a cultivar de ameixeira Mr.S 2/5, Rocha (2006) obteve número médio de 1,6 brotações por explante com a suplementação de 2,0 mg L⁻¹ de BAP. Resultados similares ao anterior também foram obtidos com ameixeira 'Santa Rosa', com média de 3,6 brotações por explante utilizando a mesma concentração de BAP, ou seja, apresentando uma média maior de brotações com a menor concentração de BAP em relação ao presente trabalho. Entretanto, Rodrigues et al. (2003) obtiveram em torno de 2,0 brotações por explante, com apenas 0,7 mg L⁻¹ de BAP para cultivares de pessegueiro 'Aldrighi', 'Eldorado', 'GF 677' e 'Okinawa'. A menor exigência de citocinina para determinados genótipos pode realmente estar associado aos altos teores endógenos, e que aliados à adição exógena de citocinina ao meio de cultura, pode contribuir para um efeito decrescente na taxa de multiplicação. Esse tipo de efeito tem sido observado na multiplicação *in vitro* de alguns genótipos de ameixeira, comprovado pelos trabalhos de Leontiev-Orlov et al. (2000), Campos (2005) e Rocha et al., (2009). Com base nisso, observa-se a alta influência do genótipo, pois segundo Pérez-Tornero e Burgos (2000) as diferenças encontradas nas taxas de multiplicação *in vitro* são atribuídas de acordo com espécie e/ou cultivar.

Já o carvão ativado tem sido utilizado na cultura de tecidos por possuir funções importantes como a absorção de várias substâncias inclusive de auxinas, citocininas e nutrientes, bem como a adsorção de substâncias eliminadas pelas culturas provenientes da oxidação. A resposta de crescimento das brotações com meio líquido contendo carvão ativado, pode-se inferir que houve maior absorção de nutrientes pelas brotações sob a influência deste antioxidante, assim havendo um maior crescimento das mesmas, conforme sugerido por Costa et al. (2006).

3.5 Conclusões

De acordo com as condições em que foram conduzidos os trabalhos de multiplicação *in vitro* com o portaenxerto 'Flordaguard', pode-se concluir que:

- 1- O meio de cultura MS (1/2N) induz maior multiplicação;
- 2- O meio de cultura dupla-fase favorece o crescimento das brotações;
- 3- Explante sem ápice e na orientação inclinada melhora a multiplicação *in vitro*;
- 4- A adição de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP é suficiente para a multiplicação *in vitro*.

4 Capítulo 2 – Multiplicação, enraizamento e aclimatização do portaenxerto de pessegueiro ‘GxN-9’

4.1 Introdução

O porta-enxerto ‘GxN-9’ é resultante do cruzamento entre pessegueiro *Prunus persica* (L.) Btsch e amendoeira *Prunus dulcis* (Mill.) Webb, apresentando como principal característica a resistência ao nematoide das galhas *Meloidogyne incognita* raça 2 e *Meloidogyne javanica* (ROSSI et al., 2002). Considerando, esta praga de importância econômica para o Rio Grande do Sul, este portaenxerto poderá ser uma alternativa para a produção de mudas de prunáceas para este Estado, visto que os atuais porta-enxertos são altamente suscetíveis ao nematoide das galhas.

Entretanto, é necessário estabelecer um protocolo eficiente de produção de mudas. Neste sentido, a propagação de espécies frutíferas através da micropropagação tem possibilitado a obtenção de um grande número de plantas, em curto espaço de tempo, com ótimo estado fitossanitário e a manutenção das características genéticas (COUTO et al., 2004). Porém, são escassos os trabalhos com a micropropagação do portaenxerto ‘GxN-9’.

Durante a fase de multiplicação *in vitro*, a fonte e a concentração de citocinina estão entre os fatores que mais influenciam, sendo este na maioria das vezes indispensável para a indução da proliferação de gemas axilares. Segundo alguns trabalhos conduzidos com o gênero *Prunus*, o BAP tem sido indicado como superior a outras fontes já testadas (RADMANN, et al., 2009; RADMANN et al., 2011).

Além do fator citocinina, a fonte e a concentração de carboidratos, também podem interferir na multiplicação *in vitro*. Os carboidratos fornecem energia e contribuem no equilíbrio do potencial osmótico do meio de cultura (PATI, 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 das brotações *in vitro*, influenciando no crescimento (JAIN; BABBAR, 2003; FARIA et al., 2004). A superioridade da sacarose está relacionada ao transporte e fotoassimilados entre fonte e dreno nas plantas superiores (HACKEL et al., 2006). Assim como a sacarose, o sorbitol também é uma importante fonte de carboidrato, sendo este o açúcar dominante na seiva do floema das plantas da família Rosaceae, tendo como principal função a proteção dos tecidos contra a desidratação, a salinidade e o frio, caracterizando-se também como um carboidrato de reserva (GRANT; REES, 1981).

No que se refere ao enraizamento, a indução e a formação de raízes adventícias na base da brotação é considerado fundamental para a maioria das espécies, já que a obtenção de um sistema radicular funcional e uniforme é requisito básico para que se alcancem elevadas taxas de sobrevivência na fase de aclimatização (SANTOS-SEREJO et al., 2006).

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 a fonte mais utilizada é o ácido indolbutírico (AIB), o qual pode ser utilizado sozinho ou em combinação com outros fitoreguladores, sendo o mais eficiente e de menor custo (SANTOS-SEREJO et al., 2006). Segundo Antonelli e Chiariotti (1988) no enraizamento *in vitro* do pessegueiro existe uma forte resposta do genótipo ao meio, devido às diferentes exigências nos níveis hormonais, sendo assim, a concentração de auxina está relacionada diretamente a cultivar estudada.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da fonte e da concentração de citocinina, a fonte e a concentração de carboidrato na fase de multiplicação, e o efeito da concentração de AIB no enraizamento *in vitro* e na aclimatização do portaenxerto 'GxN-9', tendo em vista obter mais informações para contribuir na elaboração de um protocolo eficiente de micropropagação para este portaenxerto.

4.2 - Material e Métodos

4.2.1 Experimento 1 - Fonte e concentração de citocinina na multiplicação

Microestacas sem ápice, com aproximadamente 0,5 cm, foram inoculados em meio QL (QUOIRIN; LEPROIVE, 1977) com diferentes concentrações de BAP e cinetina (CIN), constituindo os tratamentos apresentados (Tabela 4).

Tabela 4 - Tratamentos com diferentes concentrações de BAP e CIN (mg L^{-1}) em brotações do portaenxerto 'GxN-9'

Tratamentos	BAP	CINETINA	AIB
1	0,0	0,4	0,01
2	0,1	0,3	0,01
3	0,2	0,2	0,01
4	0,3	0,1	0,01
5	0,4	0,0	0,01

Todos os tratamentos foram adicionados 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 30 g L^{-1} de sacarose e 7 g L^{-1} de ágar. Após a inoculação dos explantes, os frascos foram transferidos para sala de crescimento, com temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo luminoso de $48 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Ao final dos 30 dias de cultivo avaliaram-se o número de brotações por explante e o comprimento das brotações. O experimento foi conduzido em delineamento completamente casualizado, com cinco tratamentos e quatro repetições, sendo cada repetição composta por cinco explantes. Os dados obtidos 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; CONCEIÇÃO, 2005).

4.2.2 Experimento 2 – Fonte e concentração de carboidrato na multiplicação

Explantes constituídos por microestacas sem ápice com aproximadamente 0,5 cm, foram inoculados em meio QL contendo: a) 15 g L^{-1} de sacarose, b) 30 g L^{-1} de sacarose, c) 45 g L^{-1} de sacarose, d) 15 g L^{-1} de sorbitol, e) 30 g L^{-1} de sorbitol, f)

45 g L⁻¹ de sorbitol suplementados com BAP 0,4 mg L⁻¹, AIB 0,01 mg L⁻¹, mio-inositol 100 mg L⁻¹, ágar 7 g L⁻¹ e pH ajustado para 5,8.

Após 30 dias da instalação do experimento, foram realizadas as avaliações de número de brotações por explante e comprimento das brotações. O experimento foi conduzido em delineamento completamente casualizado, com seis tratamentos e quatro repetições, sendo cada repetição constituída por um frasco com 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; CONCEIÇÃO, 2005).

4.2.3 Experimento 3- AIB no enraizamento *in vitro* e na aclimatização

Explantes com ápice, de 1,5 a 2,0 cm de comprimento foram transferidos para meio QL, com diferentes concentrações de AIB (0,0; 0,3; 0,6; 1,2 mg L⁻¹), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,8. Após a inoculação dos explantes, os frascos foram transferidos para a sala de crescimento, com temperatura de 25°C ± 2°C, permanecendo cinco dias no escuro e dez dias em fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo luminoso de 48 μmol m⁻² s⁻¹. O experimento foi conduzido com quatro repetições e cinco explantes por repetição, totalizando 20 explantes por tratamento.

Ao final dos 15 dias de cultivo em meio de enraizamento, foi avaliada a percentagem de brotações enraizadas, número de raízes e comprimento da maior raiz. Posteriormente, todos os explantes foram transferidos para bandejas plásticas com capacidade de um litro, com tampa, contendo vermiculita de granulometria média, sendo estas mantidas em casa de vegetação com temperatura de 25° C e 80% de UR. Após 30 dias de aclimatização, foi avaliada a percentagem de plantas sobreviventes, o comprimento da maior raiz e comprimento da parte aérea.

O experimento foi conduzido em delineamento completamente casualizado, com quatro tratamentos de AIB (0,0; 0,3; 0,6; 1,2 mg L⁻¹), sendo os dados analisados por regressão polinomial, utilizando o programa WinStat 2.0 (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2005).

4.3 – Resultados

4.3.1 Experimento 1- Fonte e concentração de citocinina na multiplicação

Com relação ao número de brotações por explante, as maiores respostas foram obtidas nos tratamentos 5, 4 e 3 (Tabela 5), porém o maior comprimento das brotações foi obtido nos tratamentos 2 e 3, com 0,7 cm e 0,6 cm, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5 - Número de brotações por explante e comprimento das brotações do portaenxerto 'GxN-9', cultivado por 30 dias em meio QL com diferentes concentrações de citocinina

Tratamentos	Número de brotações por explante	Comprimento das brotações (cm)
1	1,48 c	0,10 c
2	2,25 b	0,62 ab
3	2,61 abc	0,72 a
4	3,16 ab	0,10 c
5	3,68 a	0,50 b
C.V.(%)	14,71	18,08

Médias seguidas por letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

4.3.2 Experimento 2- Fonte e concentração de carboidrato na multiplicação

Houve diferença entre os tratamentos exclusivamente para a variável número de brotações por explante. Na comparação entre as fontes de carboidrato, houve diferença apenas na menor concentração testada (15 g L⁻¹) com superioridade do sorbitol em relação à sacarose em 55% (Tabela 6). Considerando, o fator concentração, apenas verificou-se diferença quando utilizada a sacarose, sendo as maiores respostas observadas nas concentrações mais altas, 30 e 45 g L⁻¹ (Tabela 6).

Tabela 6 - Número de brotações por explante obtidos com o portaenxerto 'GxN-9', cultivados por 30 dias em meio QL com diferentes concentrações de sacarose e sorbitol

Carboidrato	15 g	30 g	45 g
Sacarose	2,58 B b	4,43 A ab	5,95 A a
Sorbitol	5,75 A a	6,39 A a	4,53 A a

C.V. 27,93

Letras maiúsculas distintas na coluna diferem para o fator fonte, dentro de cada concentração, e letras minúsculas distintas na linha diferem para o fator concentração, dentro de cada fonte, pelo teste de Tukey a 5%.

Com relação a variável comprimento das brotações, pode-se observar que não houve diferença significativa entre os tratamentos, mas as brotações obtidas nos meios contendo sacarose foram numericamente maiores em relação as obtidas nos meios com sorbitol em todas as concentrações (Tabela 7).

Tabela 7 - Comprimento das brotações obtidas com o portaenxerto 'GxN-9', cultivados por 30 dias em meio QL com duas fontes de carboidratos em diferentes concentrações.

Carboidrato	15 g	30 g	45 g
Sacarose	0,61 Aa	0,86 Aa	0,76 Aa
Sorbitol	0,54 Aa	0,65 Aa	0,63 Aa

C.V. 10,90

Letras iguais não diferem para o fator fonte dentro de cada concentração e para o fator concentração dentro de cada fonte, pelo teste de Tukey a 5%.

4.3.3 Experimento 3- Concentrações de AIB no enraizamento *in vitro* e na aclimatização

Após o cultivo *in vitro* por 15 dias em meio de enraizamento, houve diferença para as variáveis percentagem de explantes enraizados e número de raízes por explante, onde observou-se uma tendência linear crescente para ambas as variáveis, registrando-se com 1,2 mg L⁻¹ de AIB, 100% de explantes enraizados e 5,8 raízes por explante enraizado (Figura 5, 6 e 7). Entretanto, as concentrações de AIB não

apresentaram efeito sobre o comprimento da maior raiz, para a qual obteve-se como média geral de 5,94 cm.

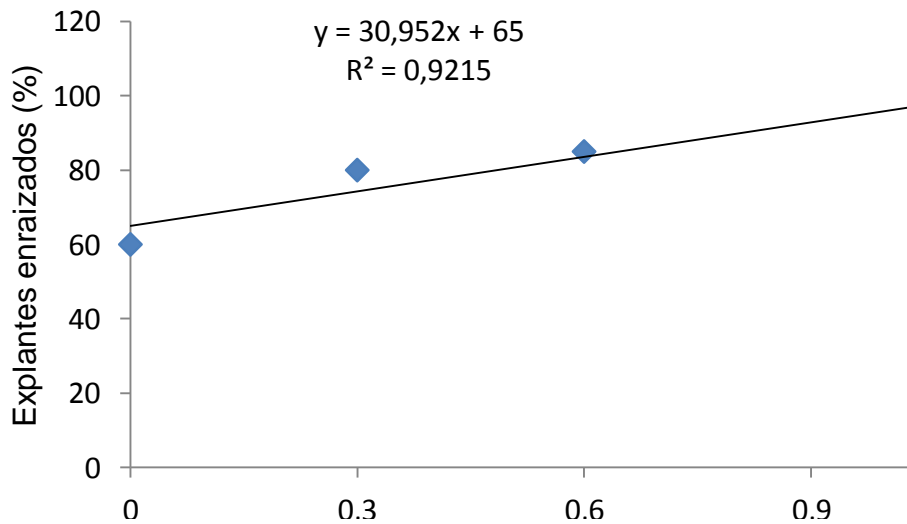


Figura 5 - Percentagem de explantes enraizados obtidos com o portaenxerto 'GxN-9', cultivados por 30 dias em meio QL com diferentes concentrações de AIB.

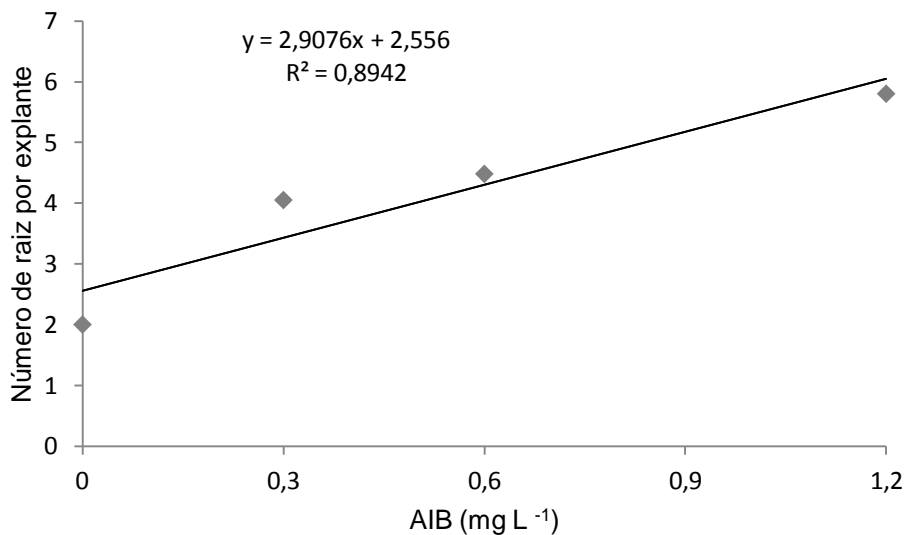


Figura 6 - Número de raízes por explante obtido com o portaenxerto 'GxN-9', cultivado por 30 dias em meio QL com diferentes concentrações de AIB.

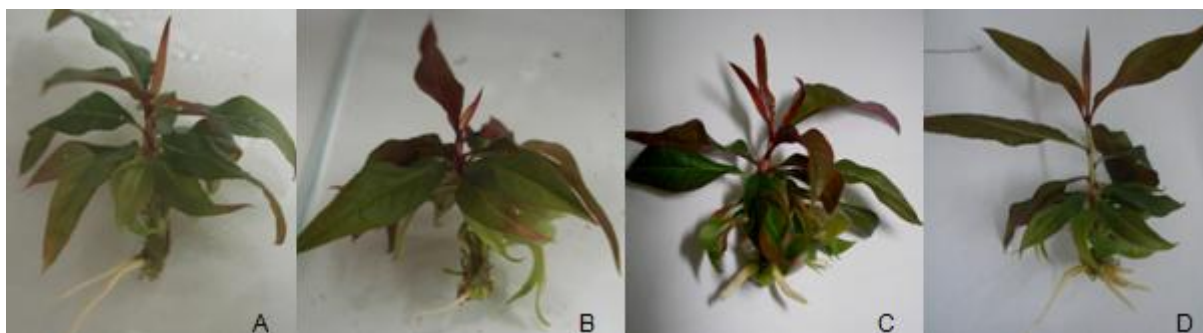


Figura 7 - Enraizamento *in vitro* com o portaenxerto 'GxN-9', cultivados por 15 dias em meio QL com diferentes concentrações de AIB. (A) 0,0 mg L⁻¹ de AIB; (B) 0,3 mg L⁻¹ de AIB; (C) 0,6 mg L⁻¹ de AIB; (D) 1,2 mg L⁻¹ de AIB.

Após 30 dias de aclimatização, para a variável percentagem de plantas sobreviventes verificou-se um comportamento quadrático, com ponto de mínima em 0,53 mg L⁻¹ de AIB com 84% de plantas aclimatizadas (Figura 8).

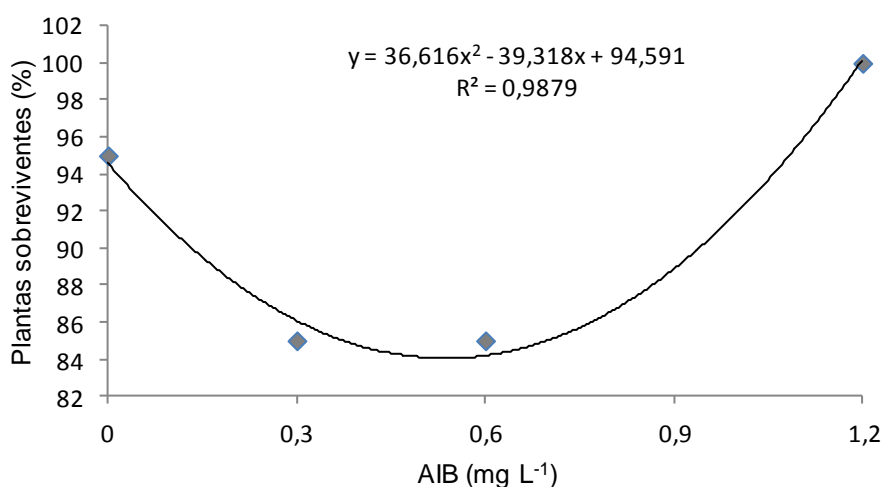


Figura 8 - Percentagem de plantas sobreviventes obtidos com o portaenxerto 'GxN-9', após 30 dias de aclimatização em casa de vegetação, a partir de explantes cultivados em meio de enraizamento com diferentes concentrações de AIB.

Entretanto, para o comprimento da maior raiz, observou-se uma tendência linear decrescente (Figura 9), porém para o comprimento da parte aérea, obteve-se uma resposta quadrática, com ponto de máxima em 0,85 mg L⁻¹ de AIB, com 3,2 cm (Figura 9)

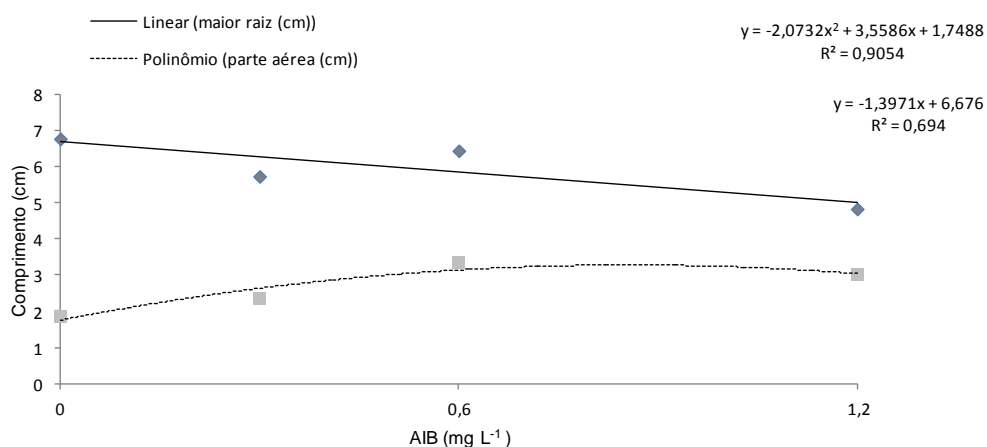


Figura 9 - Comprimento da maior raiz e da parte aérea do portaenxerto 'GxN-9', após 30 dias de aclimatização em casa de vegetação, a partir de explantes cultivados em meio de enraizamento com diferentes concentrações de AIB



Figura 10- Plantas do portaenxerto 'GxN-9' provenientes de diferentes concentrações de AIB (mg L⁻¹), após 30 dias de aclimatização em casa de vegetação. (A) 0,0 mg L⁻¹ de AIB; (B) 0,3 mg L⁻¹ de AIB; (C) 0,6 mg L⁻¹ de AIB; (D) 1,2 mg L⁻¹ de AIB.

4.4 - Discussão

4.4.1 Experimento 1 - Fonte e concentração de citocinina na multiplicação

O BAP e a CIN são citocininas sintéticas, porém o BAP tem se revelado mais eficiente no processo de multiplicação, tanto de estruturas aéreas, como na indução de gemas adventícias em diversas espécies (Hu; Wang, 1983). Isto pode em parte explicar o maior número de brotações obtidas nos explantes cultivados com as maiores concentrações de BAP. Esta relação também pode explicar o maior crescimento das brotações no meio onde a concentração das citocininas esta em equilíbrio ($0,2 \text{ BAP mg L}^{-1} + 0,2 \text{ CIN mg L}^{-1}$), pois a CIN é considerada menos eficiente em relação ao BAP (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Radmann et al. (2011) em estudos com a cultivar de pessegueiro Flordaguard não obtiveram resposta de multiplicação em meio contendo 2iP e zeatina, porém explantes cultivados com BAP, os autores observaram uma resposta linear para número de brotações obtidas. Para o portaenxerto de pessegueiro Tsukuba 1, na comparação entre as fontes de citocininas, Radmann et al. (2009) observaram que tratamentos com 2iP não responderam a formação de brotações, sendo necessário a adição de BAP, o qual resultou numa maior resposta na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. A partir dos resultados obtidos no presente trabalho e outros trabalhos já citados, o BAP em relação às outras citocininas tem sido superior, promovendo maior taxa de multiplicação *in vitro*. Além disso, entre todas, o BAP é a citocinina mais econômica e mais utilizada na cultura de tecidos (SILVEIRA et al., 2001). Segundo estudos já realizados com *Prunus*, as concentrações de BAP no meio de multiplicação variaram de $0,1$ a $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ (SILVA et al., 2003; WAGNER et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2004). Pérez-Tornero e Burgos (2000) sugeriram que as diferenças observadas nas taxas de multiplicação *in vitro* são frequentemente atribuídas ao genótipo.

Em estudos realizados com as cultivares de pessegueiro Aldrighi, Eldorado, GF667 e Okinawa, Rodrigues et al. (2003) obtiveram em torno de duas brotações por explante, com $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. Por outro lado, Rocha (2006) obteve 1,6 brotações por explante com a adição exógena de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. Resposta similar foi encontrada por Rogalski et al. (2003a), com a ameixeira 'Santa Rosa', onde obtiveram maior número de brotações também com $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. No entanto, para

portaenxertos de *Prunus*, Silva et al. (2003) obtiveram taxas bem mais elevadas de multiplicação *in vitro*, com valores variando de 10,5 a 16,0 brotações por explante. Portanto, a partir dos trabalhos relatados, verifica-se a comprovação de que a concentração de BAP no meio é dependente do genótipo.

Entretanto, no tratamento com maior concentração de BAP, houve uma redução no comprimento das brotações (Tabela 5). Este resultado está de acordo com Taiz e Zeiger (2009), os quais relataram que o BAP não é responsável pelo alongamento das brotações, mas sim pela formação destas. A redução no comprimento das brotações com o incremento na concentração de BAP também foi observada em outras cultivares do gênero *Prunus* (ROGALSKI et al., 2003a; TEIXEIRA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2012). Além do efeito da alta concentração de BAP induzir um menor crescimento das brotações, Rocha et al. (2007) relataram que o baixo crescimento em meio com concentrações mais altas de BAP, pode ocorrer em função desta citocinina induzir a formação de maior número de brotações e estas competir entre si por nutrientes no meio de cultura.

4.4.2 Experimento 2- Fonte e concentração de carboidrato na multiplicação

O carboidrato sorbitol, no presente trabalho mostrou-se eficiente nas concentrações mais baixas (15 e 30 g L⁻¹) para a variável número de brotações por explante. Este resultado demonstra que o sorbitol desempenha um papel eficaz na multiplicação *in vitro* da família Rosaceae, com *Prunus*, *Pyrus* e *Malus* devido a ser o principal carboidrato translocado no floema (AHAMAD et al., 2007). Segundo Kadota et al. (2001), a melhor utilização do sorbitol por alguns portaenxertos de frutíferas de caroço, está na disponibilidade suficiente de enzimas que ajudam na hidrólise deste carboidrato, porém dependendo da concentração pode ser tóxico, reduzindo o número de brotações por explante, conforme observado no presente trabalho na concentração de 45 g L⁻¹. Quando ocorre uma resposta não favorável para brotações com o carboidrato sacarose, isso, pode ser devido a lenta hidrólise da sacarose em glicose e frutose, assim comprometendo a disponibilidade imediata deste açúcar para o explante.

Ahmad et al., (2007), observaram na multiplicação *in vitro* do portaenxerto de pessegueiro 'GF-677', que o sorbitol foi a fonte de carbono mais efetiva, comparado

com a sacarose, proporcionando maior número de brotações na concentração de 30 g L⁻¹. Porém, Borkowska e Szczerba (1991), estudando a multiplicação de outras cultivares de *Prunus*, obtiveram com a cultivar 'Scharttenmorelle', melhores resultados com sacarose, apresentando o dobro do número de brotações em relação ao sorbitol. Embora, para a cultivar 'North Star', os autores não observaram diferença significativa para o número de brotações entre as duas fontes de carboidrato. Esta variação de fonte e concentração de carboidrato nos estudos já realizados, demonstraram que os resultados obtidos são dependentes do genótipo, pois embora, o sorbitol seja o principal açúcar de translocação em plantas da família *Rosaceae*, Ruzic et al. (2008) relataram que com exceção de *Malus* spp. e possivelmente *P. persica*, não existe uma correlação determinada entre o conteúdo de sorbitol das plantas e o que poderia ser metabolizado *in vitro*. Esta hipótese poderia em parte justificar as diferentes respostas observadas dentro do gênero *Prunus*.

Agentes osmóticos como a sacarose e o sorbitol, agem sobre o crescimento reduzindo o potencial hídrico do meio de cultura e assim, inibindo a absorção de água e nutrientes pelo explante (LÉDO et al., 2007). Para o crescimento das brotações, respostas similares a este trabalho, foram encontradas por Gallo (2012), com portaenxerto de ameixeira 'Mr. S. 2/5', sendo a sacarose mais eficaz em relação ao sorbitol no comprimento das brotações. Por outro lado, Ahamad et al., (2007), obtiveram crescimento maior das brotações em meio de cultura contendo sorbitol.

Entretanto, para o crescimento das brotações, a sacarose se mostrou mais eficiente em comparação ao sorbitol, pois é a fonte de carboidrato que promove um melhor desenvolvimento *in vitro* por apresentar uma alta solubilidade e rápida metabolização pela maioria das células vegetais (AHAMAD et al., 2007). Além disso, o sorbitol é um açúcar álcool que geralmente não é metabolizado pelas plantas, e sua ação, assim como outros açúcares, está relacionada com a modificação do potencial osmótico e assim desacelerando o crescimento vegetal.

4.4.3 Experimento 3- Concentrações de AIB no enraizamento *in vitro* e na aclimatização

Enraizamento *in vitro* - A resposta de 50% de explantes enraizados no meio sem AIB pode estar associada ao acúmulo de auxinas endógenas provenientes das folhas jovens ou gemas, pois tal acúmulo resulta em aumento da atividade metabólica do tecido e, conseqüentemente, na formação de raízes (WAREING; PHILLIPS, 1981).

As auxinas são responsáveis pela indução dos primórdios radiculares, porém não são importantes para o desenvolvimento das raízes, de modo que, em alguns casos a auxina pode exercer efeito inibitório no alongamento das raízes, principalmente em meios de cultura contendo elevadas concentrações de auxina (CAMPANA et al., 1994). Entretanto, no presente trabalho, não verificou-se diferença para o comprimento de raiz nas diferentes concentrações de AIB, sendo este efeito provavelmente associado ao pouco tempo de permanência dos explantes no meio de cultura. Além disso, Hu e Ferreira (1998), afirmaram que as respostas de desenvolvimento *in vitro* são regidas pelo genótipo, havendo uma diversidade de respostas em função das concentrações para cada espécie e/ou cultivar.

Vários estudos foram realizados testando concentrações de AIB e respostas similares ao presente trabalho foram encontradas por Rogalski et al. (2003b), com os portaenxertos de pessegueiro 'Capdeboscq' e 'GF667' onde a maior percentagem de enraizamento foi obtida com 1,4 mg L⁻¹ de AIB com uma taxa de 100% e 69,7% respectivamente. Já, para cultivar de ameixeira Mr.S.1/8, Viganó et al. (2007) obteve maior percentual de enraizamento na concentração de 1,0 mg L⁻¹ de AIB, sendo que a partir desta concentração observou-se diminuição do percentual de enraizamento das brotações. Em marmeleiro da cultivar 'Adams', Silva et al. (2010) observou que com 1,2 mg L⁻¹ de AIB obteve a maior taxa de enraizamento (70%).

Rogalski et al. (2003b) com a seleção de pessegueiro VP411, obtiveram maior número de raízes (3,6) na concentração de 0,9 mg L⁻¹ de AIB. Já, para os portaenxertos 'Capdeboscq' e 'GF677' apresentaram o maior número de raízes na concentração de 2,0 mg L⁻¹ de AIB, com 9,3 e 5,7 raízes por explante, respectivamente. Para Gallo (2012), estudando *Prunus*, cultivar Mr. S 2/5, na concentração de 3,81 mg L⁻¹ de AIB obteve 7,55 raízes/brotação.

Aclimatização - Em relação a variável percentual de plântulas sobreviventes, onde se obteve um bom resultado, provavelmente está relacionado com a boa qualidade da parte aérea e do sistema radicular formado durante o enraizamento *in vitro*. Outro fator importante, segundo Mercier (2004) é que muitas das plantas oriundas do enraizamento *in vitro* mesmo estando bem enraizadas, inclusive com raízes ramificadas, não sobreviveram, quando transplantadas para condições *ex vitro*. Provavelmente, isso deve-se ao longo comprimento das raízes na ocasião do transplante. Já, raízes mais curtas ou na forma de primórdios radiculares aceleram o pegamento da planta, e evita o enovelamento.

Na aclimatização, em concentração um pouco mais elevada que no presente trabalho, Gallo (2012) obteve 100% para os explantes cultivados em meio de cultura contendo $1,6 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB, o mesmo ocorreu para a variável comprimento da maior raiz, na concentração de $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB. Para outros portaenxerto de *Prunus*, como 'Capdeboscq', Rogalski et al. (2003c) verificou a maior taxa de sobrevivência (92%) na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB. Para o portaenxerto 'Flordaguard', Radmann (2007) verificou uma maior percentagem de sobrevivência (50%) em plantas cultivadas em meio com $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB.

Rogalski et al. (2003c) observaram que plantas submetidas à concentração de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB, retardaram o crescimento da parte aérea. O término de crescimento da parte aérea durante a fase de climatização pode comprometer a sobrevivência das plantas (MARÍN; GELLA, 1987). Para estes autores, este término do crescimento pode estar relacionado diretamente ao efeito do AIB no crescimento do ápice e/ou à ocorrência de uma competição de crescimento entre o ápice caulinar e as raízes. Diferentemente do presente estudo, Gallo (2012), verificou que para a variável, comprimento da parte aérea, obteve em torno de 6,0 cm na concentração de $1,6 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB, resultado relacionado com a maior percentagem de explantes enraizados.

Rogalski et al. 2003c verificam que a auxina usada durante o enraizamento *in vitro* influencia diretamente a fase de aclimatização, obtendo resultados positivos ou negativos de acordo com a concentração e espécie e/ou cultivar utilizada. Já para o presente trabalho pode-se verificar que na ausência de auxina também se obteve um bom resultado. Segundo Campana et al. (1994) e Rogalski et al. (2003c) a

adição de auxina no meio de enraizamento tem sido eficiente, promovendo acréscimo na sobrevivência de portaenxertos de *Prunus* na fase da aclimatização, diferentemente para o portaenxerto do presente trabalho, GxN-9, que constatou-se ser uma cultivar não exigente de adição de AIB pois não há influência deste fitoregulador na aclimatização.

4.4- Conclusões

De acordo com as condições em que foram conduzidos os experimentos com o portaenxerto 'GxN-9, pode-se concluir que:

- 1- A concentração de 0,4 mg L⁻¹ de BAP é suficiente para a multiplicação *in vitro*;
- 2- A adição usual de 30 g L⁻¹ de sacarose multiplica *in vitro* esta cultivar;
- 3- A aclimatização não é influenciada pela concentração de AIB.

5 Considerações finais

Devido à baixa produtividade do pessegueiro ocasionada pela falta de qualidade genética e sanitária do material propagativo, e pela forma de obtenção dos portaenxertos, que são oriundos de caroços descartados pelas indústrias de conserva, a micropropagação apresenta-se como uma alternativa de multiplicação de portaenxertos para a persicultura.

Tendo em vista os trabalhos já realizados, com resultados variados, dificuldades de crescimento das brotações para a cultivar Flordaguard, pode-se dizer que pelos estudos feitos no presente trabalho testando diferentes meios de cultura, tipo e orientação de explante e diferentes concentrações de BAP e experimentos com carvão ativado e giberelina, obteve-se um avanço nos estudos possibilitando a multiplicação do material e principalmente com relação ao alongamento das brotações. Com o portaenxerto 'GxN-9' pode-se verificar sua multiplicação com a concentração adequada de BAP, que a adição de sacarose padrão usada na micropropagação é a mesma para esta cultivar. No enraizamento *in vitro* percebeu-se que o portaenxerto 'GxN-9' não é exigente em AIB, embora haja uma necessidade de um incremento deste fitoregulador para obter uma homogeneidade do material enraizado. Embora se tenham poucos trabalhos relacionados a aclimatização do gênero *Prunus*, para a cultivar 'GxN-9' a aclimatização foi eficaz, desde o tratamento sem AIB até a taxa mais alta concentração testada, resultando em taxas elevadas de sobrevivência *ex vitro*.

Uma sugestão interessante para o portaenxerto 'Flordaguard' que poderia ser feito dando continuidade nos estudos, seria experimentos de enraizamento e de aclimatização, pois com os estudos do presente trabalho já se obteve o alongamento das brotações, o qual é de suma importância para a realização das fases posteriores da micropropagação. Já para o portaenxerto 'GxN-9' com os resultados positivos obtidos, seria interessante trabalhar com este material em larga escala. Sendo que, com estes estudos, seria possível proporcionar material de qualidade para os produtores.

6 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.

ANTONELLI, M.; CHIARIOTTI, A. "In vitro" rooting of different peach genotypes. **Acta Horticulturae**, v. 227, p. 414-417, 1988.

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

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.

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.

CAMPOS, R.V de. **Estabelecimento, multiplicação e enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* spp.** 2005. 67f. Dissertação (Mestrado em Fruticultura de Clima Temperado) Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

CARDOSO, C.; YAMOTO, L.Y.; PRETI, E.A.; ASSIS, A.M.; NEVES, C.S.V.J.; ROBERTO, S.R. AIB e substratos no enraizamento de estacas de pessegueiro 'Okinawa' coletados no outono. **Ciências Agrárias**, Londrina v.32, n. 4, p. 1307-1314, 2011.

COSTA, F.H.S.; PEREIRA, J.E.S.; PEREIRA, M.A.A.P.; OLIVEIRA, J.P. Efeito da interação entre carvão ativado e n6-benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, cv. grand naine (aaa)1. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, SP, v. 28, n. 2, p. 280-283, 2006.

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, Marcelo. **Propagação *in vitro* dos porta-enxertos híbridos de pessegueiro 'Barrier' e 'Cadman' (*Prunus* sp)**. 2003. 77f. Dissertação (Mestrado em Fruticultura de Clima Temperado) Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

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

DE LA VIÑA, G.; BARCELÓ-MUÑOZ, A.; PLIEGO-ALFARO, F. Effect of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea Americana* Mill microcuttings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.65, p.229-237, 2001.

ERIG, A. C.; ROSSI, A.; FORTES, G. L. R. 6-benzilaminopurina e ácido indolbutírico na multiplicação *in vitro* da amoreira-preta (*Rubus idaeus* L.), cv. Tupy. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.5, p.765-770, 2002.

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.; 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.

FARIA, R.T.D., F.N. RODRIGUES, L.V.R. OLIVEIRA.; C. MULLER. *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. **Horticultura Brasileira**, V.22, p. 780-783, 2004.

FINARDI, N. L. Métodos de propagação e descrição de porta-enxertos. In: MEDEIROS, C. A. B.; RASEIRA, M. do C. B. (Ed.). A cultura do pessegueiro. Brasília: Embrapa-SPI; Pelotas: Embrapa-CPACT, 1998.

GALLO, C. M. Micropropagação do porta-enxerto Mr. S. 2/5 (*Prunus cerasifera* x *Prunus spinosa*). 2012. 54f. **Dissertação** (Mestrado em Fisiologia Vegetal), Botânica, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2012.

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

GUTIÉRREZ, I.E.M.; NEPOMUCENO, C.F.; LEDO, C.A.S.; SANTANA, J.R.F. Micropropagation and acclimatization of *Bauhinia cheilantha* (an important medicinal plant). **African Journal of Biotechnology**, Bowie, v.10, n.8, p.1353-1358, 2011.

HACKEL, A.; SCHAUER, N.; CARRARI, F.; FERNIE, A.R.; GRIMM, B.; KÜHN, C. Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2 inhibition affects tomato fruit development in different ways. **The Plant Journal**, Michigan, v.45,p.180-192, 2006.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.108, n.2, p.105-120, 2006.

HOFFMANN, A.; CHALFUN, N. N. J.; PASQUAL, M. Efeito do ácido giberélico e do frio na sobrevivência e crescimento inicial de plântulas micropropagadas de macieira 'Marubakaido', durante a aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.1, p.31-7, 2001.

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

HORBACH, M.A.; BISOGNIN, D.A.; KIELSE, P.; QUADROS, K.M. de; FICK, T.A. Micropropagação de plântulas de erva-mate obtidas de embriões zigóticos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.1, p.113-119, 2011.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, CNPH; CBAB, v. 2, p. 371-393, 1998.

HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R. **Handbook of plant cell cultures**. New York: Macmillan, v.1, p.177-227, 1983.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Produção Agrícola. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em 14 fev. 2013.

JACKSON, L.E.; BURGER, M.; CAVAGNARO, T.R. Roots, nitrogen transformations, and ecosystem services. **Annual review of plant biology**. n.59, p.341-363, 2008.

JAIN, N.; S.B. BABBAR. Effect of carbon source on the shoot proliferation potential of epicotyle explant of *Syzygium cuminii*. **Biologia Plantarum**, V.47 n.1, p.133-136, 2003.

KADOTA, M., IMIZU, K; HIRANU, T. Double phase *In vitro* culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear. **Scientia Horticulture.**, 89: 207-215, 2001.

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.

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, n.1, p.63- 67, 2000.

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

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**, London, v.62, p. 663-670, 1988.

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**, Jaboticabal, v.2, n.1, 2005.

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

MOLLA, M. M. H.; KHANAM, M. D.; KHATUN, M. M.; ALAMIN, M.; MALEK, M. A. *In vitro* rooting and *ex vitro* plantlet establishment of BARI banana 1 (*Musa* sp.) as influenced by different concentration of IBA (indole 3-butyric acid). **Asian Journal of Plant Sciences**, Bholakpur, v. 3, n. 2, p. 196-199, 2004.

MORE, V. N.; KHALATKAR, A. S. Effect of gibberellic acid, kinetin and indolbutyric acid on propagation in *Diffenbachia pict.* **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 226, p. 473-478, 1988.

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

NAGAO, E.O.; PASQUAL, M.; RAMOS, J.D. Efeitos da sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a multiplicação *in vitro* de brotações de porta-enxerto de citros. **Bragantia**, Campinas, p. 25-31. 1994.

OLIVEIRA, R.P de. ROCHA, P.S.G da. SCIVITTARO, W.B. Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na micropropagação do porta-enxerto de pessegueiro cv. 'Barrier'. In: XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. Bento Gonçalves. **Anais...**p.5415-5418, 2012.

PAEK, K. Y.; HAHN, E. J. Cytokinins, auxins and activated charcoal affect organogenesis and anatomical characteristics of shoo-tip cultures of Lisianthus [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn]. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Berlin, v.36, p.128-132, 2000.

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

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. **Micropropagação dos porta-enxertos ‘Flordaguard’, ‘Tsukuba1’ e ‘GxN-9’**. 2007. 115f. Tese (Doutorado em Agronomia, área de concentração em Fruticultura de Clima Temperado), Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2007.

RADMANN, E. B.; BIANCHI, V.J.; OLIVEIRA, R.P.; FACHINELLO, J.C. Multiplicação *in vitro* e alongamento das brotações micropropagadas do porta-enxerto ‘Tsukuba 1’ (*Prunus pérsica* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.31, n.3, p. 656-663, 2009.

RADMANN, E. B.; BIANCHI, V.J.; FACHINELLO, J.C.; FERREIRA, L.V.; OLIVEIRA, R.P. In vitro multiplication of ‘Flordaguard’ rootstock: cytokinin source and concentration effects, explants orientation and period of permanence in the cultive medium. **Brazilian Archives of biology and Technology**. v.54, n 1, p 25-34, 2011.

RAMAGE, C.M.; WILLIAMS, R.R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Ashfrord, v.38,p.116-124,2002.

RESENDE, S.V.; LIMA-BRITO, A.; SANTANA, J.R.F.de. Influência do substrato e do enraizamento na aclimatização de *Melocactus glaucescens* Buining & Brederoo propagados *in vitro*. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v.57, n.6, p.803-809, 2010.

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, 2006.

ROCHA, P. S. R.; SCHUCH, M. W.; BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C. Qualidade da luz na micropropagação do porta-enxerto de *Prunus*, cv. Mr.s. 2/5. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 33-40, 2007.

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**, Uberlândia, v. 25, n. 1, 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.; GUERRA, M. P.; SILVA, A. L. Multiplicação *in vitro* da ameixeira 'Santa Rosa': Efeito da Citocinina BAP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p.365-367, 2003a.

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, 2003b.

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, 2003c.

ROSSI, C.E.; FERRAZ, L.C.C.B.; MONTALDI, P.T. Resistência de frutíferas de clima subtropical e temperado a *Meloidogyne incognita* raça 2 e *Meloidogyne javanica*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.69, n.2, p.43-49, 2002.

ROSSI, A; FACHINELLO, J. C.; RUFATO, L.; PARISOTO, E.; PICOLOTTO, L. KRUGER, L. R. Comportamento do pessegueiro 'Granada' sobre diferentes porta-enxertos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 446-449, 2004.

RUSSOWSKI, D.; NICOLOSO, F.T. Nitrogênio e fósforo no crescimento de plantas de Ginseng Brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.1, p.57-63, 2003.

RUZIC, Dj.V.; LAZIC, T.I; CEROVIC, R.M. Micropropagation of some *Prunus* and *Pyrus* genotypes *in vitro* as affected by different carbon sources. **Acta Horticulturae**, The Hague-Holanda. 795, p.413-418, 2008.

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 Agronômica**, 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.

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, A.L. da; ROGALSKI, M.; MORAES, L.K.A.; FESLIBINO, C.; CRESTANI, L.; GUERRA, M.P. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Prunus* sp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.2, p. 297-300, 2003.

SILVA, E. S. B. **Propagação *in vitro* de *Prunus* spp.** Pelotas, 2004, 115f. Tese Doutorado em Fruticultura de clima Temperado) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel.

SILVA, I. M. de C da; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B.; BIANCHI, V. J.; NOGUEIRA, L.R. **Tipo e concentração de auxinas no enraizamento *in vitro* de brotações regeneradas de Marmeleiro 'Adams'**. XIX CIC, XII ENPOS, II Mostra científica, 2010.

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.

SOUZA, F.V.D.; COSTA, M.A.P.C; NETO, H.P. da S. Acclimatização. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p. 131-140.

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

TAMAKI, V., MERCIER, H., NIEVOLA, C.C. Cultivo *in vitro* de clones de Ananas comosus (L.) Merrill cultivar Smooth Cayene em diferentes concentrações de macronutrientes. **Hoehnea** v 34, n 1 67-73, 2007.

TEIXEIRA, P.T; SILVA, A.L; DUCROQUET, J.P.H.J; GUERRA, M.P. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* spp. 'Carelli'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.26, n.2, p.377-379, 2004.

THUROW, L. B.; DE CONTI, D.; BIANCHI, V.J. Influência do carvão ativado e do AG₃ no crescimento *in vitro* de ameixeira 'América'. In: XX Congresso de Iniciação Científica/III Mostra Científica da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

TORRES, A. C.; BARBOSA, N. V. dos R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M. G.; FERREIRA, C. F.; PAIVA, S. A. V. Meios e condições de incubação para a cultura de

tecidos de plantas: **Formulações de meios para a cultura de tecidos de plantas. Circular Técnica nº24, EMBRAPA. ISSN 1415-3033. Dezembro 2001.**

VAN WINKLE, S.; JOHNSON, S.; PULLMAN, G.S. The impact of gelrite and activated carbon on the elemental composition of plant tissue culture media. **Plant Cell Report**, New York, v.21, p.1175-1182, 2003.

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, p. 468 - 472, 2009.

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.

WAREING, P.F.; PHILLIPS, I.D.J. **Growth and differentiation in plants**. 3.ed. Oxford, England: Pergamon Press, 1981. 343p.