

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

**FERNANDA GRIMALDI**

**PROPAGAÇÃO *in vitro* DE PEREIRA, CULTIVAR PACKHAM'S  
TRIUMPH (*Pyrus communis*, L.)**

Trabalho de dissertação apresentado à  
Universidade do Estado de Santa Catarina, como  
requisito para a obtenção do título de Mestre em  
Produção Vegetal.

Orientador: Dr. Altamir Frederico Guidolin

**LAGES - SC**

**2009**

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária  
Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região  
(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

Grimaldi, Fernanda

Propagação *in vitro* de pereira, cultivar Packham's  
triumph (*Pyrus communis, l.*) / Fernanda Grimaldi. --  
Lages, 2009.  
74 p.

Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências  
Agroveterinárias / UDESC.

1. Pêra – Propagação *in vitro*. 2. Enraizamento. 3.  
Fitorreguladores. I. Título.

CDD – 634.13

**FERNANDA GRIMALDI**

**PROPAGAÇÃO *in vitro* DE PEREIRA, CULTIVAR PACKHAM'S  
TRIUMPH (*Pyrus communis*, L.)**

Trabalho de dissertação apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre no curso de pós-graduação em Produção Vegetal da Universidade do Estado de Santa Catarina.

Aprovado em:

Homologado em:

Pela Banca examinadora:

Por:

---

Prof. Dr. Altamir Frederico Guidolin  
Presidente da Banca: Universidade do Estado  
de Santa Catarina

---

Dr. Jefferson Meirelles Coimbra  
Coordenador Técnico do Mestrado em  
Produção Vegetal

---

Prof. Dr. Jefferson Meirelles Coimbra  
Membro Titular: Universidade do Estado de  
Santa Catarina

---

Dr. Paulo Cezar Cassol  
Coordenador do Programa de Pós-graduação  
em Ciências Agrárias

---

Dr. Janice Valmorbida  
Membro Titular: Empresa de Pesquisa  
Agropecuária e Extensão Rural de Santa  
Catarina – EPAGRI

---

Adil Knackfuss Vaz  
Diretor Geral do Centro de Ciências  
Agroveterinárias

---

Prof. Dr. Adelar Mantovani  
Membro Titular: Universidade do Estado de  
Santa Catarina

LAGES, 08/05/2009

À minha família, amigos e a todos que  
contribuíram para a realização deste trabalho,  
Muito Obrigada.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Ana e Roberto, meu irmão Eduardo, minha cunhada Morgana e meu namorado Marco, pelo apoio, confiança, dedicação e paciência.

Aos meus amigos pelo carinho e suporte em mais esta etapa.

À Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, pela concessão da bolsa de monitoria - Promop.

Ao meu orientador Dr. Altamir Frederico Guidolin e ao meu co-orientador Dr. Jefferson Luis Meirelles Coimbra, professores da UDESC.

Ao Dr. André Thaler Neto, professor da UDESC, pela ajuda nas análises e interpretações estatísticas.

À Epagri - Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado de Santa Catarina, pelo financiamento da pesquisa, disponibilização de materiais e laboratórios. Sem estes recursos teria sido impossível concretizar este trabalho.

Ao meu co-orientador Aleksander Westphal Muniz, pesquisador da Epagri, pelos inúmeros conselhos, oportunidades e principalmente pela amizade.

Aos colegas da Epagri, Janice Valmorbida, Maria Aparecida Sá, José Carlos Rech, Gilberto Luis Dalagnol e Antonio Oliveira Lessa, que sempre dispostos a ajudar me passaram muito conhecimento.

## RESUMO

O cultivo de pêra no Brasil não tem destaque entre as frutíferas mais produzidas, sendo considerada a fruta mais importada. A produção de pêra no Brasil é reduzida, pois existem outras frutíferas melhor adaptadas às condições climáticas do país, com alta qualidade e que dão retorno econômico ao produtor mais rapidamente. A propagação *in vitro* é uma maneira de atender a demanda dos fruticultores por cultivares de qualidade, que devido a sua eficiência possui um bom retorno técnico e econômico. Não há produção suficiente de mudas de cultivares-copa de pêra, pois há uma carência de protocolos de propagação *in vitro*. O objetivo do trabalho foi estabelecer um protocolo de propagação *in vitro* de pereira, cv. Packham's Triumph, visando à produção de mudas saudáveis e de qualidade para incrementar a produção nacional de peras. Foram realizados experimentos para cada estágio da propagação *in vitro*. Para o estabelecimento *in vitro* foram testados diferentes explantes e assepsias. Os explantes utilizados foram gemas oriundas de plantas matrizes acomodadas em casa de vegetação, meristemas e gemas oriundas de plantas matrizes do campo. As assepsias testadas foram hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio. As variáveis analisadas foram oxidação, contaminação bacteriana e fúngica. Na multiplicação *in vitro* o BAP foi testado nas concentrações 0,2; 0,8; 1,4 e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> sob dois tipos de meio de cultura (MS e MS ½). As variáveis analisadas foram número de gemas e comprimento de brotos. No enraizamento *in vitro* foram testadas as auxinas ANA e AIB nas concentrações 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mg.L<sup>-1</sup>. As variáveis analisadas foram formação de raízes e de calo, comprimento e número de raiz, massa fresca e seca de raiz e comprimento de parte aérea. Os resultados obtidos no estabelecimento *in vitro* determinaram que a contaminação fúngica e bacteriana não apresentaram diferenças significativas quanto ao tipo de assepsia e os explantes que tiveram maior incidência nos dois casos foram as gemas de plantas do campo. Os explantes que apresentaram maior oxidação foram as gemas de plantas do campo, independente da assepsia, e o meristema tratado com hipoclorito de cálcio. Na multiplicação *in vitro* foi determinado que a melhor concentração de BAP no desenvolvimento de gemas foi 1,3 mg.L<sup>-1</sup> e para comprimento de broto o melhor meio de cultura foi o MS. No enraizamento *in vitro*, as auxinas ANA e AIB não apresentaram diferenças significativas em relação à formação de raízes adventícias. Os tratamentos em que houve menor formação de calo foram ANA nas doses 0,1; 0,5 e 1,0 mg.L<sup>-1</sup>. A auxina AIB foi significativa para as variáveis comprimento e número de raiz. O aumento da concentração do AIB causou uma diminuição no comprimento das raízes e atingiu um maior número de raízes na dose de 1,6 mg.L<sup>-1</sup>. Já as variáveis massa fresca e seca de raiz, e comprimento de parte aérea não foram diretamente afetadas pelo tipo e dose de AIB e ANA.

**Palavras-chave:** *Pyrus communis*. Propagação *in vitro*. Enraizamento. Fitorreguladores.

## ABSTRACT

The pear cultivation in Brazil is the less prominent among the fruit produced, and is considered the most imported fruit. The production of pears in Brazil is low because there are other fruit more adapted to the climate of the country, with high quality and quickly economic returns for the producers. The *in vitro* propagation is a way to attend the producer's demand of cultivars with quality, because of its efficiency and good technical and economic return. There isn't sufficient production of pear seedlings, because there is a lack of protocols for *in vitro* propagation. The objective of this paper was to establish a simple protocol for *in vitro* propagation of pear, cv. Packham's Triumph, to produce healthy and quality seedlings to increase national production of pears. Experiments were performed for each stage of *in vitro* propagation. For *in vitro* establishment were tested different explants and asepsis. The explants were buds from mother plants in the greenhouse room, meristems and buds from mother plants of the field. The asepsis tested were sodium hypochlorite and calcium hypochlorite. The variables analyzed were oxidation, bacterial and fungal contamination. For the *in vitro* multiplication BAP was tested at concentrations 0.2, 0.8, 1.4 and 2.0 mg.L<sup>-1</sup> in two types of culture medium (MS and MS½). The variables analyzed were number of buds and length of shoots. For the *in vitro* rooting the auxins NAA and IBA were tested in concentrations 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 3.0 mg.L<sup>-1</sup>. The variables analyzed were formation of roots and callus. The results for *in vitro* establishment determined that fungal and bacterial contamination showed no significant differences for the aseptic types and the explants that had higher incidence in the two cases were the buds of field plants. For oxidation the explants with higher incidence were the buds of field plants, regardless of asepsis, and meristems treated with calcium hypochlorite. For *in vitro* multiplication was determined that the best concentration of BAP for buds development was 1.3 mg.L<sup>-1</sup> and to length of shoots the best culture medium was MS. For *in vitro* rooting the auxins NAA and IBA showed no significant differences in relation to adventitious roots formation. The treatments that showed less formation of callus were ANA in doses 0.1, 0.5 and 1.0 mg.L<sup>-1</sup>. The auxin IBA was significant for the variables length and number of roots. The increase of IBA caused a decrease in length of roots, and reached the highest number of roots at dose 1.6 mg.L<sup>-1</sup>. The variables fresh and dry weight of root, and shoot length were not directly affected by the type and dose of IBA and NAA.

**Key-words:** *Pyrus communis*. *In vitro* propagation. Rooting. Growth regulator.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 01 – Explante contaminado por bactéria (A), explante contaminado por fungo (B), explante oxidado (C) e explante sadio (D)..... 32
- Figura 02 – Concentração ideal de BAP para o desenvolvimento de gemas em explantes de pereira cv. Packham's Triumph..... 39
- Figura 03 – Explantes de pereira cv. Packham's Triumph sob os diferentes meios e concentrações de BAP testados..... 40
- Figura 04 – Comportamento das doses da auxina AIB no comprimento de raiz em explantes enraizados de pereira cv. Packham's Triumph..... 49
- Figura 05 – Comportamento das doses da auxina AIB no número de raiz em explantes enraizados de pereira cv. Packham's Triumph ..... 51
- Figura 06 – Explantes de pereira cv. Packham's Triumph enraizados com as auxinas AIB e ANA..... 52



## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 –Análise de variação para as variáveis contaminação bacteriana, contaminação fúngica e oxidação em explantes de pereira cv. Packham`s Triumph.....	30
Tabela 02 –Efeito do tipo de explante e das soluções desinfestantes na contaminação bacteriana em explantes de pereira cv. Packham`s Triumph. Médias observadas e médias transformadas ( $\rho = \ln (\mu/1-\mu)$ ).....	30
Tabela 03 –Efeito do tipo de explante e das soluções desinfestantes na contaminação fúngica em explantes de pereira cv. Packham`s Triumph. Médias observadas e médias transformadas ( $\rho = \ln (\mu/1-\mu)$ ).....	31
Tabela 04 –Efeito do tipo de explante e das soluções desinfestantes na oxidação de explantes de pereira cv. Packham`s Triumph. Médias observadas e médias transformadas ( $\rho = \ln (\mu/1-\mu)$ ).....	31
Tabela 05 –Análise de variação para as variáveis número de brotos, número de gemas e comprimento de broto em explantes de pereira cv. Packham`s Triumph.....	38
Tabela 06 –Análise de variação para as variáveis formação de raízes adventícias e formação de calo dos explantes de pereira cv. Packham`s Triumph.....	47
Tabela 07 –Médias observadas ( $m_o$ ) e médias transformadas ( $m_t$ ) por ( $\rho = \ln (\mu/1-\mu)$ ), para o efeito do AIB e ANA na formação de calo em explantes de pereira cv. Packham`s Triumph.....	48
Tabela 08 –Análise de variação para a variável comprimento de raiz dos explantes enraizados de pereira cv. Packham`s Triumph.....	48
Tabela 09 –Decomposição da interação auxina*dose nos componentes polinomiais linear e quadrático, para a variável comprimento de raiz dos explantes enraizados de pereira cv. Packham`s Triumph.....	49

Tabela 10 –Análise de variação para a variável número de raiz dos explantes enraizados de pereira cv. Packham’s Triumph.....	50
Tabela 11 –Decomposição da interação auxina*dose nos componentes polinomiais linear e quadrático, para a variável número de raiz dos explantes enraizados de pereira cv. Packham’s Triumph.....	50
Tabela 12 –Análise de variação para as variáveis massa fresca e massa seca de raiz e comprimento de parte aérea dos explantes enraizados de pereira cv. Packham’s Triumph.....	52

## LISTA DE ABREVIÇÕES

AIA	Ácido 3-indolacético
AIB	Ácido indolbutírico
ANA	Ácido naftalenoacético
BAP	6-Benzilaminopurina
CaOCl <sub>2</sub>	Hipoclorito de cálcio
cv.	Cultivar
GA <sub>3</sub>	Ácido giberélico
mg.L <sup>-1</sup>	Miligramas por litro
mL.L <sup>-1</sup>	Mililitros por litro
MS	Meio de Murashige & Skoog (1962)
MS ½	Meio de Murashige & Skoog (1962) com a concentração de sais reduzida à metade
NaOCl	Hipoclorito de sódio
TDZ	Thidiazuron
ACLSV	Vírus latente da clorose foliar)
ASPV	Apple Stem Piting
ASGV	Vírus latente clorótico
Veg.	Vegetação

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	13
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1 CLASSIFICAÇÃO E DESCRIÇÃO DA PEREIRA .....	16
2.2 PROPAGAÇÃO <i>in vitro</i> .....	17
2.3 ESTABELECIMENTO <i>in vitro</i> .....	18
2.3.1 Meio de cultura e fitorreguladores .....	19
2.4 MULTIPLICAÇÃO <i>in vitro</i> .....	20
2.4.1 Meio de cultura e fitorreguladores .....	21
2.5 ENRAIZAMENTO <i>in vitro</i> .....	21
2.5.1 Meio de cultura e fitorreguladores .....	22
<b>3 CAPÍTULO I: ESTABELECIMENTO <i>in vitro</i> DE PEREIRA CV. PACKHAM'S TRIUMPH VISANDO O EXPLANTE MAIS ADEQUADO E A MELHOR SOLUÇÃO DESINFESTANTE PARA A ASSEPSIA DOS EXPLANTES</b> .....	24
3.1 INTRODUÇÃO .....	24
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	25
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
3.4 CONCLUSÕES .....	32
<b>4 CAPÍTULO II: MULTIPLICAÇÃO <i>in vitro</i> DE PEREIRA CV. PACKHAM'S TRIUMPH EM DOIS MEIOS DE CULTURA SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP</b> .....	33

4.1 INTRODUÇÃO.....	33
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
4.4 CONCLUSÕES .....	40
<b>5 CAPÍTULO III: EFEITO DE DOSES DE AUXINAS SINTÉTICAS NO ENRAIZAMENTO <i>in vitro</i> DE PEREIRA CV. PACKHAM'S TRIUMPH. ....</b>	<b>41</b>
5.1 INTRODUÇÃO.....	41
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	43
5.4 CONCLUSÕES .....	53
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>54</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>56</b>
<b>8 ANEXOS .....</b>	<b>64</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de frutas, entretanto possui uma pequena participação no mercado internacional. A exportação de frutas temperadas está aos poucos ganhando espaço no mercado, e nos últimos anos, a quantidade de frutas exportadas, como a maçã, ameixa, pêssego e morango aumentaram. (REETZ et al, 2007).

A fruticultura brasileira é reconhecida mundialmente como uma das mais diversificadas, porém, o cultivo de pereira no Brasil é pequeno. A maioria dos pomares utiliza cultivares de baixa qualidade como as ‘peras d’água’ (RIBEIRO et al., 1991). A pêra, nos últimos anos, vem apresentando uma considerável expansão de consumo, mas seu cultivo é praticado em poucas áreas do Brasil. A produção nacional está em torno de 20 mil toneladas por ano (REETZ et al, 2007). A pêra é a terceira fruta mais importada pelo Brasil, provindo da Argentina, Estados Unidos, Chile e Uruguai (NAKASU, 2003).

Atualmente a pereira vem sendo cultivada com maior intensidade no sul e sudeste do país com destaque para os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Nestes estados os pomares usam cultivares européias de maior qualidade como William’s, Abate Fetel e Packham’s Triumph. Dentre estas cultivares, a Packham’s Triumph destaca-se como uma das mais antigas plantadas no Brasil, suas plantas são vigorosas e produtivas, porém seus frutos apresentam baixa qualidade quando comparados aos frutos importados de Packham’s Triumph (PERAZZOLO, 2006).

A principal meta do fruticultor é dispor de frutas com aparência uniforme, polpa de textura sucosa, doce, bom sabor e aroma (NAKASU, 2003). Para que este objetivo seja

alcançado necessita-se primeiramente de infra-estrutura apropriada, mudas sadias e conhecimento técnico da cultura, tornando a produção eficiente e economicamente viável (HOFFMANN et al. 2005). As cadeias produtivas nacionais vêm se dedicando nos últimos anos a arrojados investimentos na tecnificação de seus pomares e estruturas industriais, buscando qualidade para seus frutos (REETZ et al, 2007). Instituições governamentais vêm investindo em pesquisas com a finalidade de melhorar os sistemas de produção em uso. A introdução de novas espécies, o melhoramento genético e a produção de mudas sadias contribuem para o aumento da eficiência do sistema produtivo. A muda de qualidade potencializa a resposta à tecnologia aplicada no pomar, auxiliando na redução de custos e na produção de frutas com alta qualidade (OLIVEIRA et al., 2004).

Na produção comercial de mudas frutíferas utiliza-se mais comumente a propagação assexuada, ou seja, por estruturas vegetativas, pois se deseja manter as características agronômicas da planta-matriz. Na propagação vegetativa é possível capturar o componente genético total da variância, resultando em espécies genética e morfológicamente uniformes (ASSIS e TEIXEIRA, 1998). Nos métodos de propagação vegetativa a maior limitação encontrada é o baixo potencial de enraizamento das mudas, que muitas vezes não sobrevivem após o plantio (FACHINELLO e BIANCHI, 2005).

A propagação *in vitro* tem sido muito estudada visando amenizar esta limitação, principalmente porque este método de propagação permite o controle das variáveis responsáveis pelo desenvolvimento da planta. Muitos trabalhos de propagação *in vitro* vêm sendo desenvolvidos com frutíferas, com a finalidade de estabelecer protocolos para a propagação das espécies de grande importância econômica.

A obtenção de protocolos de propagação *in vitro* de frutíferas é importante para os programas de certificação de mudas. Plantas-matrizes e mudas certificadas têm comprovação de sua proveniência e sua qualidade é assegurada pelo viveirista e pela entidade certificadora.

A relevância deste processo está em levar para o campo material de qualidade assegurada, diminuindo a disseminação de patógenos que se dá principalmente pelas mudas.

Atualmente existem algumas espécies frutíferas dentro do programa de mudas certificadas, entretanto, a pereira não se encontra entre elas. Com a disponibilidade de mudas certificadas, os fruticultores poderão cultivar pomares com mudas de qualidade garantida, aumentando sua produção e qualidade dos frutos.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de propagação *in vitro* de pereira, cv. Packham's Triumph (*Pyrus communis L.*), visando à produção de mudas sadias e de qualidade para incrementar a produção nacional de peras.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CLASSIFICAÇÃO E DESCRIÇÃO DA PEREIRA

A pereira é pertencente à família *Rosaceae*, subfamília *Pomoideae* e gênero *Pyrus*. Existem mais de 20 espécies de pereira, nativas do continente Europeu e Asiático. As espécies comercialmente importantes são: *Pyrus communis*, *P. pyrifolia*, *P. bretschneideri*, *P. betulaefolia* e híbridos entre *P. communis* e *P. pyrifolia*. A pêra mais cultivada e consumida no Brasil é a pêra européia *Pyrus communis* L. As principais cultivares de peras européias são: Packham's Triumph, William's e Red Bartlett. As principais cultivares de peras asiáticas são: Hosui, Kosui e Nijisseiki. Algumas cultivares híbridas muito consumidas são: Carrick, Garber, Smith, Primorosa e Seleta.

Todas as espécies de *Pyrus* são autoestéreis, inférteis e diplóides, com exceção da *P. communis* que possui algumas cultivares poliplóides (QUEZADA e NAKASU, 2003). As peras são cultivadas para diversos fins como produção de vinhos, consumo, processamento e ornamentação.

As plantas de pereiras podem ser árvores ou arbustos, possuem copa em formato piramidal, com folhas geralmente caducifólias. Possuem troncos altos e grossos, de diâmetro e cor variável de acordo com a cultivar, e sua raiz é profunda e pivotante. São plantas de tecido lenhoso fino e pesado. Apresentam gemas mistas, folhas largas e cerradas. O desenvolvimento floral ocorre no verão e no outono, suas flores originadas são hermafroditas. Esta característica é muito comum em plantas de clima temperado (LEITE e SOUZA, 2003).

A frutificação da pereira européia ocorre em cerca de três ou mais anos. No caso das asiáticas, a frutificação pode ocorrer em apenas um ano. A fruta da pereira é um pomo, de formato arredondado ou piriforme, de textura carnuda, suculenta e doce (NAKASU, 2003).

Para o cultivo de pereira o ideal é clima seco, frio durante o inverno e quente durante o verão. Sem no mínimo 900 horas de frio hibernal as cultivares européias de pereira não atingem boa superação de dormência. As peras asiáticas e híbridas requerem cerca de 300 a 800 horas de frio e tem melhor adaptabilidade às variações climáticas (NAKASU e FAORO, 2003).

As doenças que mais acometem as pereiras são a entomosporiose, podridão-branca e sarna da pereira. A pereira apresenta-se também como hospedeira para alguns vírus como o ACLSV, micoplasma (lenho mole), ASPV e ASGV. A infecção do ASPV tem sido detectada nas cultivares Packham's Triumph e Bartlett (LEITE e BLEICHER (1993). O vírus ACLSV é encontrados em diversas cultivares de *Pyrus*, e também em *Prunus* e *Malus* (CASTRO, 2003). Os patógenos comprometem o vigor e longevidade das pereiras, permitindo que a cultura fique suscetível a outros patógenos, aumentando o custo de produção e reduzindo a qualidade das frutas (OLIVEIRA et al., 2004).

## 2.2 PROPAGAÇÃO *in vitro*

A propagação *in vitro* permite o controle das variáveis responsáveis pelo desenvolvimento da planta. Ela vem sendo utilizada desde 1902, quando se iniciou a cultura de células em soluções nutritivas (TORRES et al., 1998), porém o método foi introduzido com sucesso somente nos anos 30 e vem progredindo até hoje (BHATIA et al., 2004).

Esta propagação consiste na regeneração e multiplicação de mudas a partir de uma célula ou de segmentos sadios de tecidos da planta, cultivados em meio nutritivo (ERIG e

SCHUCH, 2005a). O método permite a produção massal de mudas, independente da época do ano e com ótimas condições sanitárias. Mas também apresenta algumas desvantagens como variação somaclonal e perda de caracteres devido à intensa multiplicação (SCHUCH e ERIG, 2005).

Para frutíferas, a propagação *in vitro* tem sido utilizada com sucesso técnico e econômico pela sua rapidez e eficiência de produção (ERIG e SCHUCH, 2005b). As frutíferas herbáceas não apresentam muitas dificuldades durante a propagação *in vitro*, porém as lenhosas têm menor adaptabilidade à cultura de tecidos e poucas espécies são propagadas com sucesso (ROUT et al., 1999). A propagação *in vitro* se divide em três estágios de desenvolvimento: seleção e estabelecimento *in vitro* dos explantes; multiplicação *in vitro* dos explantes; enraizamento *in vitro* com subsequente transplântio das mudas obtidas para condição *ex vitro*.

### 2.3 ESTABELEECIMENTO *in vitro*

No estabelecimento de uma cultura *in vitro*, a escolha do explante apropriado e o nível de diferenciação do tecido são os aspectos mais importantes a considerar (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Os explantes podem ser gemas axilares, ápices caulinares e radiculares, segmentos nodais, meristemas e tecidos diferenciados (FACHINELLO e BIANCHI, 2005).

Para a obtenção dos explantes é necessária uma planta matriz sadia, pois seu estado fisiológico influencia no comportamento posterior da cultura. Uma planta matriz que apresenta déficit hídrico tem os estágios da propagação *in vitro* afetados, pois a falta de água compromete os níveis endógenos de hormônios, alterando sua síntese e transporte (ASSIS e TEIXEIRA, 1998).

Outro aspecto importante é a fitossanidade da planta matriz, pois ela determina a dificuldade de desinfestação dos explantes. Considerando que muitos contaminantes de natureza endógena não são expostos às substâncias desinfestantes, deve-se ter controle da contaminação ainda na planta matriz (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Além dos pré-tratamentos dados a planta matriz, ao estabelecer *in vitro* os explantes é indispensável aplicar substâncias para controlar a contaminação exógena. As substâncias desinfestantes mais usadas para controlar a contaminação dos explantes são o etanol, hipoclorito de sódio e de cálcio, peróxido de hidrogênio e em casos mais extremos, o cloreto de mercúrio (DONINI et al., 2005). Após a desinfestação dos explantes, eles são introduzidos em meio de cultura, sob condições adequadas de temperatura e luminosidade, para que ocorra o seu desenvolvimento. O processo de estabelecimento *in vitro*, assim como os estágios subsequentes, é realizado em capela de fluxo laminar, sob condições assépticas.

A temperatura ideal para propagação de espécies frutíferas varia entre 21°C e 27°C, e a luminosidade neste estágio é reduzida nos primeiros dias de incubação a fim de evitar a oxidação fenólica dos explantes (LANE et al., 1998; CALVETE et al., 2002; OLIVEIRA et al, 2004),

### 2.3.1 Meio de cultura e fitorreguladores

Os meios de cultura fornecem às plantas substâncias para seu crescimento e desenvolvimento. São suplementados com compostos orgânicos e minerais para suprir as necessidades energética, metabólica e estrutural das células da planta. Os componentes do meio são água, macro e micronutrientes, carboidratos, vitaminas, inositol, fitorreguladores e ágar - para meio geleificado (CALDAS et al., 1998). Existem muitas formulações de meios de cultura em relação aos nutrientes, mas o meio mais difundido e utilizado na propagação *in*

*vitro* é o MS, que foi desenvolvido em 1962 por Murashige e Skoog. O meio MS é composto por nitrogênio, cálcio, magnésio, potássio, fósforo, enxofre, cobalto, cloro, ferro, boro, manganês, sódio, zinco, cobre e molibdênio (MURASHIGE & SKOOG, 1962).

Os fitorreguladores adicionados ao meio neste estágio são as citocininas, que estimulam a divisão celular e o desenvolvimento das partes aéreas, as giberelinas e as auxinas, que induzem o crescimento e alongamento das partes aéreas. A adição destes componentes tem por objetivo suprir a insuficiência de hormônios nos explantes isolados.

#### 2.4 MULTIPLICAÇÃO *in vitro*

Quando estabelecida a cultura *in vitro* se dá início a multiplicação. Neste estágio os explantes são cultivados a fim de aumentar seu número (FACHINELLO e BIANCHI, 2005). As partes aéreas, produzidas na multiplicação devem apresentar homogeneidade e estabilização entre cultivos. A estabilização dos explantes determina o sucesso de enraizamento dos explantes (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Os subcultivos podem ser feitos até se obter o número de explantes necessários, porém o número deve ser o menor possível para não acarretar em variações somaclonais. Os explantes que resultam em cópias mais uniformes são os oriundos de meristemas, gemas apicais e axilares (DANTAS et al., 2002). A temperatura ideal para a multiplicação dos explantes está na mesma faixa que a do estabelecimento. A luminosidade não tem necessidade de ser reduzida, onde o fotoperíodo é de 16 horas. A principal limitação encontrada neste estágio é a vitrificação dos explantes.

#### 2.4.1 Meio de cultura e fitorreguladores

A formulação básica do meio de cultura no estágio de multiplicação pode ser a mesma do estágio de estabelecimento *in vitro*. As variações mais freqüentes são feitas na concentração de macronutrientes, principalmente em relação ao nitrogênio. A redução deste nutriente aumenta a taxa de multiplicação e previne a vitrificação dos explantes (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Os carboidratos, micronutrientes e vitaminas podem ser adicionados ao meio de multiplicação na mesma quantidade do meio de estabelecimento.

A principal diferença entre estes meios está na adição de apenas citocininas. Elas promovem a divisão e alongamento celular, auxiliam na superação de dormência apical, induzem a proliferação de gemas axilares, assim formando novas brotações (TAIZ e ZEIGER, 2004). O tipo e concentração de citocinina são determinantes para este estágio. A citocinina amplamente utilizada é o BAP, porém existem outras como a Cinetina e o TDZ que também apresentam bons resultados em trabalhos de multiplicação (FRÁGUAS et al., 2004). As concentrações de citocinina podem variar de 0,1 a 5,0 mg.L<sup>-1</sup>, e o acúmulo destas pode acarretar em formação de calo e vitrificação dos explantes.

#### 2.5 ENRAIZAMENTO *in vitro*

O sucesso do enraizamento dos explantes é pré-requisito para qualquer protocolo de propagação *in vitro*, pois é importante para o estabelecimento da muda no solo (PATI et al., 2006). A resposta ao enraizamento também depende de fatores endógenos e exógenos, que vêm sendo estudados ao longo dos anos, principalmente para promover a formação de raízes

em espécies lenhosas. Estes fatores quando empregados separadamente ou combinados mostraram efeitos significativos no enraizamento de algumas espécies (COUVILLON, 1988).

A luminosidade é um fator exógeno que interfere nas fases de indução e iniciação do enraizamento. Durante estas fases faz-se necessário que as partes aéreas sejam mantidas em condições de pouca ou nenhuma luminosidade, pois a presença de luz diminui os níveis endógenos de auxina, inibindo o processo de formação de raízes (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Assim como nos estágios anteriores, a temperatura ideal de incubação varia entre 21°C e 27°C. Espécies de *Prunus domestica*, *Mallus sp* e *Pyrus sp* enraizaram sob temperatura de 25°C (ERIG et al., 2004; ROCHA et al., 2007; SOUZA et al., 2007). Já para cultivares de *Rosa hibrida* foi observado uma melhor resposta de enraizamento a 21°C (PATI et al., 2006). De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), temperaturas acima de 30°C não são favoráveis para as plantas e provocam a evaporação de água do meio, o deixando mais concentrado podendo causar toxidez.

### 2.5.1 Meio de cultura e fitorreguladores

Durante a rizogênese o meio de enraizamento tem seus sais diluídos cerca de 50 a 75% em relação ao meio de multiplicação. Segundo Hartmann et al. (1990) o meio de enraizamento tem quatro finalidades: Manter o explante no lugar durante o período de formação da raiz; prover umidade para o explante; permitir trocas gasosas na base do explante e criar um ambiente escuro ou opaco, reduzindo a penetração de luz na base do explante..

No estágio de enraizamento *in vitro* também é fornecido carboidrato ao explante, porém existe a importância da diminuição da sua concentração, a fim de promover a nutrição autotrófica à planta (LEITE et al. 2000).

Neste estágio o meio de cultura é suplementado apenas com auxinas, pois são os fitorreguladores que influenciam diretamente no enraizamento. Apesar do AIA, ANA e AIB serem os fitorreguladores mais utilizados em trabalhos de enraizamento, alguns estudos mostram que o AIB apresenta melhores resultados para enraizamento de frutíferas de clima temperado (MIRANDA et al., 2004; RADMANN et al., 2002). O AIA é pouco usado, pois se degrada facilmente com a luz, tendo melhor resposta em altas concentrações (CENTELLAS et al. 1999). As auxinas Picloram, 2,4-D e ANOA também podem ser usados para propagação *in vitro*, porém estimulam a formação de calo, não sendo utilizados em trabalhos de enraizamento (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). É importante ressaltar que a resposta às diferentes auxinas no enraizamento varia de acordo com a cultivar ou espécie (PATI et al., 2006) .



### **3 CAPÍTULO I: ESTABELECIMENTO *in vitro* DE PEREIRA CV. PACKHAM'S TRIUMPH VISANDO O EXPLANTE MAIS ADEQUADO E A MELHOR SOLUÇÃO DESINFESTANTE PARA A ASSEPSIA DOS EXPLANTES**

#### **3.1 INTRODUÇÃO**

A cultura da pereira abrange cerca de 20 espécies de origem Européia e Asiática, sendo cultivadas também nas Américas e África do Norte (NAKASU e FAORO, 2003). No Brasil a pêra vem apresentando uma considerável expansão de consumo, porém seu cultivo é praticado em poucas áreas dos estados do sul, tornando o Brasil um dos maiores importadores de pêra do mundo.

A insuficiência de frio durante o repouso vegetativo provoca brotação e floração irregular, diminuindo a produção e apresentando frutas de baixa qualidade (MINISTÉRIO, 2008). A falta de cultivares adaptadas ao clima brasileiro e a carência de mudas de qualidade refletem a baixa produção de peras nacionais.

A propagação *in vitro* de plantas é um método que possibilita a produção de mudas de cultivares com maior qualidade genética e livres de patologias (SCHUCH e ERIG, 2005). A primeira etapa da micropropagação é o estabelecimento *in vitro* da planta, onde a escolha de um explante apropriado é fundamental. Para a seleção do explante é importante considerar o nível de diferenciação em que o tecido se encontra (GRATTAPAGLIA E MACHADO, 1998).

As plantas lenhosas, que são a maioria das frutíferas, apresentam durante o estabelecimento *in vitro* dificuldades com relação à oxidação e contaminação, sendo necessários tratamentos com soluções esterilizantes para desinfestação dos explantes (ERIG e

SCHUCH, 2003). A oxidação ocorre em função da liberação de compostos fenólicos pelo tecido excisado, onde o acúmulo destes compostos altera o meio de cultura e a absorção de metabólitos (ANDRADE et al, 2000).

A contaminação está presente principalmente na superfície dos tecidos foliares, gemas e segmentos nodais. Além da contaminação superficial, é frequente encontrar contaminações endógenas, presentes no interior dos tecidos. A contaminação endógena é mais encontrada em explantes oriundos de plantas cultivadas no campo (TEIXEIRA, 2001). Para controlar a contaminação são utilizadas substâncias desinfestantes como etanol, hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio, peróxido de hidrogênio e cloreto de mercúrio.

O sucesso da assepsia depende da idade e do tipo de explante, da concentração da solução desinfestante e do tempo de exposição do explante à solução (DONINI et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi determinar o explante mais apropriado e a melhor solução desinfestante para a assepsia dos explantes no estabelecimento *in vitro* de pereira cv. Packham's Triumph.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em outubro de 2008, no laboratório de biotecnologia da Estação Experimental de Pesquisa Agropecuária – Epagri, em Lages – SC. A coleta do material foi realizada no pomar da Epagri, em São Joaquim – SC.

Foram testados três tipos de explantes de pereira cv. Packham's Triumph e dois tipos de assepsia. Os explantes utilizados foram gemas oriundas de plantas-matrizes acomodadas em casa de vegetação por oito meses, meristemas e gemas oriundas de plantas-matrizes do campo. Após a coleta, as brotações tiveram suas folhas excisadas, foram lavadas em água corrente por 15 minutos e desinfestadas em capela de fluxo laminar.

A primeira assepsia testada constituiu-se da imersão dos explantes em álcool 70% durante 15 segundos, seguido de hipoclorito de sódio (NaOCl) 1,5% + 2 gotas de Tween 20 durante 20 minutos. Posteriormente os explantes foram lavados três vezes com água destilada autoclavada e introduzidos em meio de cultura. Foi colocado um explante por tubo de ensaio.

A segunda assepsia testada constituiu-se da imersão dos explantes em álcool 70% durante 15 segundos, seguido de hipoclorito de cálcio (CaOCl<sub>2</sub>) 2% + 2 gotas de Tween 20 durante 10 minutos. Posteriormente os explantes foram lavados três vezes com água destilada autoclavada e introduzidos em meio de cultura. Foi colocado um explante por tubo de ensaio.

Foi utilizado para o estabelecimento dos explantes o meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) adicionados de 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP ; 0,01 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>, 100 mg.L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 40 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar e tiveram o pH ajustado para 5,8 antes da adição do ágar. O meio foi autoclavado a 121°C e 1,5atm durante 15 minutos. Foram utilizados tubos de ensaio (15x2cm) contendo 10mL de meio de cultura.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos no escuro por 48 horas, a fim de evitar oxidação. Posteriormente foram mantidos sob um fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C. Os resultados foram analisados após um período de 20 dias.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 20 repetições por tratamento. As variáveis analisadas foram contaminação bacteriana, contaminação fúngica e oxidação. Os dados obtidos foram analisados empregando o programa SAS 9.1.3 (SAS Institute Inc., 2007), pelo procedimento PROC GENMOD. O nível mínimo de significância adotado em todos os testes foi de 5% de probabilidade de erro.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variação para a variável contaminação bacteriana se mostrou significativa apenas para o fator tipo de explante. Através do valor do qui-quadrado foi possível estabelecer a significância do fator explante, que se mostrou maior quando comparado ao fator assepsia. A interação entre explante e assepsia não foi significativa, indicando não existir uma dependência entre os efeitos destes fatores (Tabela 01). Portanto, os dois tipos de soluções desinfestantes testadas não apresentaram diferenças significativas. As gemas provenientes de plantas-matrizes do campo apresentaram maior incidência de contaminação bacteriana (65-80%) em relação aos demais explantes. As gemas provenientes de plantas-matrizes da casa de vegetação e os meristemas não apresentaram diferenças significativas entre si (Tabela 02). Estes dados corroboram com o que Dantas et al. (2002) observaram no estabelecimento *in vitro* de cultivares de pereira, onde os explantes de gemas provenientes de plantas-matrizes do campo apresentaram maior contaminação bacteriana em relação à meristemas.

Em relação à contaminação fúngica, a análise de variação se também se mostrou significativa apenas para tipo de explante. Não houve interação entre explante e assepsia, indicando então, não existir uma dependência entre os efeitos destes fatores. (Tabela 01). A contaminação fúngica, assim como a bacteriana, também ocorreu com maior incidência nas gemas provenientes de plantas-matrizes do campo. As gemas provenientes de plantas-matrizes da casa de vegetação apresentaram pouca incidência de contaminação fúngica e não houve contaminação nos meristemas, porém estes dois tipos de explantes não diferiram significativamente entre si. Também não houve diferenças significativas para os dois tipos de soluções desinfestantes testadas (Tabela 03).

Os resultados obtidos para contaminação bacteriana e fúngica eram esperados, pois o material oriundo do campo está continuamente em contato com contaminações superficiais, havendo maior inóculo de microrganismos, que ficam confinados na parte externa da planta matriz (GEORGE, 2008). Por esta maior exposição aos contaminantes, o material oriundo do campo apresenta maiores dificuldades de desinfestação durante o isolamento (RODRIGUES et al., 1999). Já explantes oriundos de plantas-matrizes mantidas em casa de vegetação tem mais facilidade de desinfestação, pois é possível ter um controle fisiológico e sanitário da planta matriz (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

É importante ressaltar que, apesar dos meristemas terem sido oriundos de plantas-matrizes do campo, sua menor contaminação ocorreu devido à sua localização e tamanho. O meristema se encontra dentro da gema, não tendo contato com contaminações do ambiente. E por seu tamanho ser muito pequeno, existe maiores chances de se obter mudas isentas de contaminantes (TORRES et al., 1998). Além do meristema ter um tamanho muito pequeno, ele é constituído por células não diferenciadas, e o nível de diferenciação das células também tem grande influência na hora da desinfestação dos explantes (VILLALOBOS & THORPE, 1991).

Através dos dados obtidos no presente trabalho, foi possível confirmar a existência de uma relação entre a procedência do material e a incidência de contaminação. Essa relação também foi observada por Dal Vesco e Guerra (1999), durante o estabelecimento *in vitro* de goiabeira serrana.

A análise de variação para a variável oxidação mostrou-se significativa para a interação entre assepsia e explante, portanto, não é possível estabelecer o efeito para cada fator separadamente, pois existe uma dependência entre os fatores (Tabela 01). Ao proceder o desdobramento da interação explante e assepsia, estudou-se o comportamento dos explantes dentro de cada tipo de assepsia. Os meristemas desinfestados com hipoclorito de cálcio

apresentaram a maior oxidação, mas não foram significativamente diferentes das gemas provenientes do campo. A menor oxidação ocorreu nos meristemas desinfestados com hipoclorito de sódio e nas gemas da casa de vegetação (Tabela 04). A diferença que ocorreu entre o meristema desinfestado com hipoclorito de sódio e o meristema desinfestado com hipoclorito de cálcio, possivelmente se deve ao fato de que ambas as soluções (hipoclorito de sódio e de cálcio) são fortes agentes oxidantes e reagem diferentemente de acordo com o material a ser desinfestado.

O hipoclorito de sódio mostrou um melhor efeito para meristemas, em relação à oxidação, e autores como Chevreau et al. (1992), Chaves et al. (2002 e 2005) recomendam que durante o estabelecimento *in vitro* de lenhosas, essa é a melhor solução desinfestante a ser utilizada, pois apresenta menores taxas de oxidação. Entretanto, a presença de oxidação nos explantes ocorreu não somente pelo tipo de solução desinfestante utilizada, mas também porque as espécies lenhosas, como a pereira, tem seus tecidos ricos em compostos fenólicos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Embora os explantes possam apresentar uma pequena quantidade de oxidação em suas extremidades, altos níveis de oxidação podem se tornar um entrave para o estabelecimento da cultura *in vitro*. Substâncias antioxidantes, como ácido ascórbico ou cítrico, podem ser adicionadas ao meio de cultura a fim de evitar a oxidação dos explantes (HARTMANN et al., 1990).

Na Figura 01 observa-se explantes de Packham's Triumph contaminados por bactérias (A) e fungos (B), um explante cujo desenvolvimento cessou devido a oxidação (C) e um explante sadio (D). Somente o explante sadio pôde ser utilizado no estágio posterior da propagação *in vitro*.

Tabela 01 - Análise de variação para as variáveis contaminação bacteriana, contaminação fúngica e oxidação em explantes de pereira cv. Packham's Triumph.

Variável	F.V.	G.L.	$\chi^2$
Contaminação bacteriana	Assepsia (A)	1	0,28
	Explante (E)	2	44,92*
	A x E	2	1,90
Contaminação fúngica	Assepsia (A)	1	0,02
	Explante (E)	2	7,79*
	A x E	2	0,05
Oxidação	Assepsia (A)	1	1,07
	Explante (E)	2	15,14*
	A x E	2	17,06*

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste do qui-quadrado.

Tabela 02 - Efeito do tipo de explante e das soluções desinfestantes na contaminação bacteriana em explantes de pereira cv. Packham's Triumph. Médias observadas e médias transformadas ( $\rho = \ln(\mu/1-\mu)$ ).

Explante	Solução desinfestante				Média	Média
	Hipoclorito de cálcio		Hipoclorito de sódio			
	2,0%		1,5%			
Gema – campo	0,80	1,38	0,65	0,61	0,725a	0,99
Gema - casa de veg.	0,15	-1,73	0,25	-1,09	0,20b	-1,41
Meristema – campo	0,10	-2,19	0,05	-2,94	0,075b	-2,56
<b>Média</b>	0,35A	-0,84	0,31A	-1,14		

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de qui-quadrado ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 03 - Efeito do tipo de explante e das soluções desinfestantes na contaminação fúngica em explantes de pereira cv. Packham's Triumph. Médias observadas e médias transformadas ( $\rho = \ln(\mu/1-\mu)$ ).

Explante	Solução desinfestante				Média	
	Hipoclorito de cálcio		Hipoclorito de sódio			
	2,0%		1,5%			
Gema – campo	0,20	-1,38	0,15	-1,73	0,17a	-1,58
Gema - casa de veg.	0,00	-	0,05	-2,94	0,02b	-3,89
Meristema – campo	0,00	-	0,00	-	0,00b	-
<b>Média</b>	0,066A	-2,68	0,1A	-2,19		

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de qui-quadrado ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 04 - Efeito do tipo de explante e das soluções desinfestantes na oxidação de explantes de pereira cv. Packham's Triumph. Médias observadas e médias transformadas ( $\rho = \ln(\mu/1-\mu)$ ).

Explante	Solução desinfestante				Média	
	Hipoclorito de cálcio		Hipoclorito de sódio			
	2,0%		1,5%			
Gema – campo	0,50Aa	0,00	0,50Aa	0,00	0,50	0,00
Gema - casa de veg.	0,05Bb	-2,94	0,20Bb	-1,38	0,10	-2,16
Meristema – campo	0,75Aa	1,09	0,10Bb	-2,19	0,36	-0,54
<b>Média</b>	0,43	-0,61	0,23	-1,19		

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de qui-quadrado ao nível de 5% de probabilidade de erro.



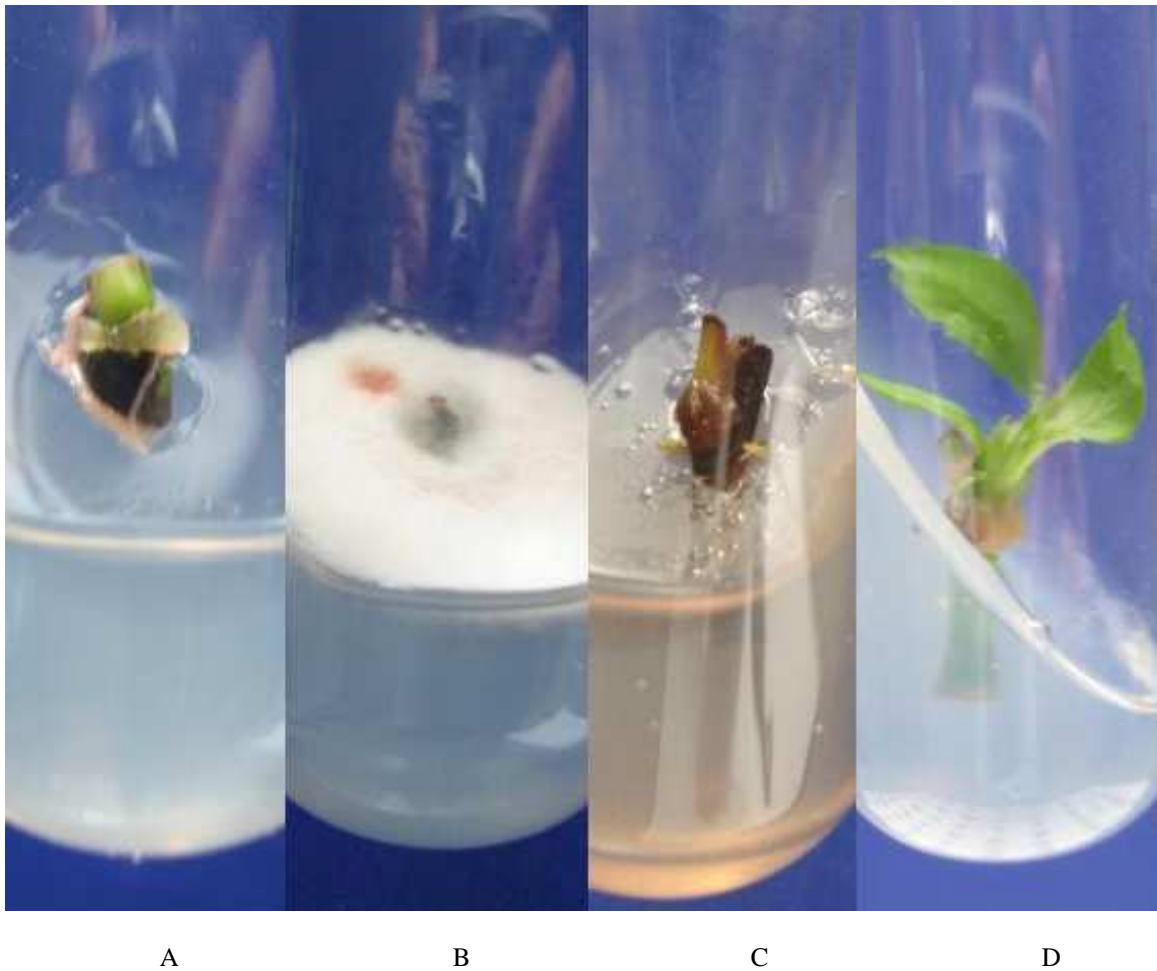


Figura 01 - Explante contaminado por bactéria (A), explante contaminado por fungo (B), explante oxidado (C) e explante sadio (D).

### 3.4 CONCLUSÕES

Os explantes mais apropriados para o estabelecimento *in vitro* da cv. Packham's Triumph são as gemas provenientes de planta-matriz acomodada em casa de vegetação ou os meristemas provenientes de planta-matriz do campo. A assepsia mais adequada é a que utiliza hipoclorito de sódio.

## 4 CAPÍTULO II: MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE PEREIRA CV. PACKHAM'S TRIUMPH EM DOIS MEIOS DE CULTURA SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP

### 4.1 INTRODUÇÃO

Para a obtenção de frutos de qualidade é essencial que as mudas sejam oriundas de genótipos de qualidade e apresentem boas condições fitossanitárias. A tecnologia de cultura de tecidos *in vitro* permite propagar plantas com alta qualidade genética, através da fixação de ganhos genéticos a partir de genótipos superiores (SILVA et al., 2003).

O estágio de multiplicação *in vitro* é caracterizado pela produção de um grande número de plantas, que possuam homogeneidade. Para isso é necessário uma fase de estabilização da cultura. Plantas lenhosas requerem muitos subcultivos para estabilizar seu crescimento e fatores como idade do explante, composição do meio de cultura e concentração de fitorreguladores afetam a estabilização (HARTMANN et al., 1990).

Desta maneira, durante a multiplicação *in vitro*, o tipo de meio de cultura utilizado é de fundamental importância para se obter partes aéreas adequadas. Vários meios de cultura podem ser utilizados, porém a maioria se baseia no meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962). Diluições e variações deste meio têm apresentado bons resultados para diversas espécies lenhosas (SILVEIRA et al., 2001).

Outro aspecto fundamental e determinante no sucesso da multiplicação *in vitro*, é o tipo de citocinina utilizada e sua concentração. A faixa mais empregada deste fitorregulador está entre 0,5 e 5,0 mg.L<sup>-1</sup>. O excesso dele pode apresentar toxicidade à planta e comprometer seu desenvolvimento (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). A citocinina amplamente

utilizada é o BAP e sua concentração é variável de acordo com as espécies e cultivares. Outras citocininas como a cinetina, o 2ip e o TDZ também são utilizadas, porém o BAP apresenta maior taxa de multiplicação, parte aéreas mais longas, folhas menores e maior quantidade de gemas para peras (CHEVREAU et al., 1993).

O objetivo deste trabalho foi verificar a melhor concentração de sais do meio de cultura MS e a melhor concentração de BAP durante a multiplicação *in vitro* de pereira cv. Packham's Triumph.

#### 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em abril de 2008, no laboratório de biotecnologia da Estação Experimental de Pesquisa Agropecuária – Epagri em Lages – SC.

Segmentos caulinares de pereira cv. Packham's Triumph, obtidos de plantas previamente estabelecidas *in vitro*, foram utilizados como explantes. Cada explante continha de 3 a 4 gemas, com tamanho aproximadamente de 8 mm.

Os tratamentos consistiam da utilização do meio de cultura MS que foi testado em duas concentrações: na concentração original de sais (MS) e na concentração de sais reduzida a metade (MS 1/2).

Foram testadas também as seguintes concentrações de BAP: 0,2; 0,8; 1,4 e 2 mg.L<sup>-1</sup>. Todos os meios foram adicionados de 100 mg.L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 40 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar e tiveram o pH ajustado para 5,8 antes da adição do ágar. Os meios foram distribuídos em frascos de 250 mL, nos quais foram colocados 30 mL de meio por frasco, e autoclavados à temperatura de 121 °C durante 15 minutos. Em cada frasco foi colocado um explante e posteriormente os frascos foram levados para uma sala de crescimento sob um fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25±2°C. Os resultados foram analisados após um

período de 35 dias. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado arranjado em fatorial 2x4 (dois meios x quatro concentrações de BAP) com 7 repetições por tratamento.

As variáveis analisadas foram número de brotos, números de gemas e comprimento de brotos. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, empregando o programa SAS 9.1.3 (SAS Institute Inc., 2007). O fator qualitativo (meio de cultura) teve suas médias comparadas através do teste F e para o fator quantitativo (concentração de BAP) foi ajustado uma equação de regressão. O nível mínimo de significância adotado em todos os testes foi de 5% de probabilidade de erro.

#### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variação para a variável número de brotos não se mostrou significativa para nenhum dos fatores (Tabela 05). Isso não era esperado, já que o BAP tem influência direta na multiplicação de brotos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Para a cv. Packham's Triumph a faixa de concentração de BAP testada não foi ampla o suficiente, sendo necessário testar mais concentrações.

A análise de variação para número de gemas mostrou-se significativa para a concentração de BAP. O valor do quadrado médio do fator concentração de BAP se mostrou maior quando comparado ao fator meio de cultura e à interação, demonstrando sua significância. Não houve interação entre BAP e meio de cultura, indicando não existir uma dependência entre os efeitos destes fatores (Tabela 05). Como concentração de BAP é um fator quantitativo, uma equação de regressão foi ajustada para a variável número de gemas. A equação apresentou um ajustamento quadrático, atingindo o ponto de máxima na concentração de  $1,3 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP (Figura 02).

A concentração máxima obtida no presente trabalho possibilitou um bom desenvolvimento dos brotos. Este resultado está dentro do esperado, já que o BAP é comumente utilizado na faixa de 0,5 a 5,0 mg.L<sup>-1</sup>. Entretanto, os resultados divergiram do trabalho de Dantas et al. (2002) onde foi observado um baixo desenvolvimento dos brotos e vitrificação nas cultivares Século XX, Red Bartlet e Housui após a adição de 1,6 mg.L<sup>-1</sup> de BAP no meio de cultura. O baixo desenvolvimento das gemas também foi observado por Wagner Junior et al., (2003), em explantes de ameixeira quando foram utilizadas doses mais altas que 0,15 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Contudo, Brum et al. (2002) utilizaram doses de BAP entre 2,0 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup> e obtiveram melhores resultados na multiplicação de figueira.

Estas diferenças de concentrações de BAP utilizadas na multiplicação *in vitro* de lenhosas indicam que as respostas a este fitorregulador variam de acordo com cada espécie e cultivar. Portanto, o fator genético é muito importante na determinação do número de gemas ou brotos por explante em relação à concentração de BAP utilizada (LEONTIEV-ORLOV et al., 2000).

Para a variável comprimento de brotos, a análise de variação se mostrou significativa apenas para tipo de meio de cultura. Através do valor do quadrado médio foi possível estabelecer a significância do fator meio de cultura, que se mostrou maior quando comparado ao fator concentração de BAP e à interação. Também não houve interação entre BAP e meio de cultura (Tabela 5). Como somente dois tipos de meio de cultura foram testados, apenas pelo teste de F foi possível determinar o melhor meio de cultura.

O meio MS apresentou o maior comprimento médio de brotos, com 18,17 mm, e o meio MS ½ apresentou um comprimento médio de brotos de 14,25 mm. Este resultado é semelhante ao obtido por Couto et al. (2004), onde o maior comprimento médio de brotos para explantes de pessegueiro foi atingido com o meio MS na concentração original de sais. Porém é importante testar formas reduzidas do meio de cultura, pois a redução de

macronutrientes pode ser utilizada como medida para combater a vitrificação dos explantes (SILVEIRA et al., 2001; COUTO et al., 2004).

Para a variável comprimento de brotos a concentração de BAP não foi significativa (Tabela 05), porém este resultado não era esperado já que para lenhosas como pessegueiro, constatou-se que ocorre uma diminuição no comprimento médio dos brotos com o aumento da concentração de BAP (LEONTIEV-ORLOV et al., 2000). Na multiplicação *in vitro* de ameixeiras também foi observado que a adição de BAP ao meio de cultura, apesar de propiciar uma alta taxa de multiplicação, apresenta um pequeno comprimento médio de brotos (ROGALSKI et al., 1999 e ROGALSKI e LEONTIEV-ORLOV, 1999). Dustan et al. (1992) e Chaves et al. (2005) também afirmam que a adição crescente de BAP ao meio nem sempre proporciona alongamento de brotos.

O comprimento de alguns explantes utilizados neste trabalho pode ser visto na Figura 03, que os mostra sob todos os tratamentos testados. Fica visível que o maior explante obtido foi sob meio MS adicionado de  $1,4 \text{ mg.L}^{-1}$ . Nenhum explante morreu ou apresentou vitrificação durante o trabalho.

Tabela 05 - Análise de variação para as variáveis número de brotos, número de gemas e comprimento de broto em explantes de pereira cv. Packham's Triumph.

<b>Variável</b>	<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>Q.M.</b>
Número de Brotos	BAP	3	0,87 <sup>NS</sup>
	Meio	1	0,44 <sup>NS</sup>
	BAP x Meio	3	0,49 <sup>NS</sup>
	Erro	48	0,42
	Total	55	-
	CV %	-	40,02
Número de Gemas	BAP	3	61,78*
	Meio	1	1,78
	BAP x Meio	3	17,40
	Erro	48	17,48
	Total	55	-
	CV %	-	38,12
Comprimento de Broto	BAP	3	30,14
	Meio	1	216,07*
	BAP x Meio	3	45,73
	Erro	48	40,99
	Total	55	-
	CV %	-	39,48

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F.

NS: não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F.

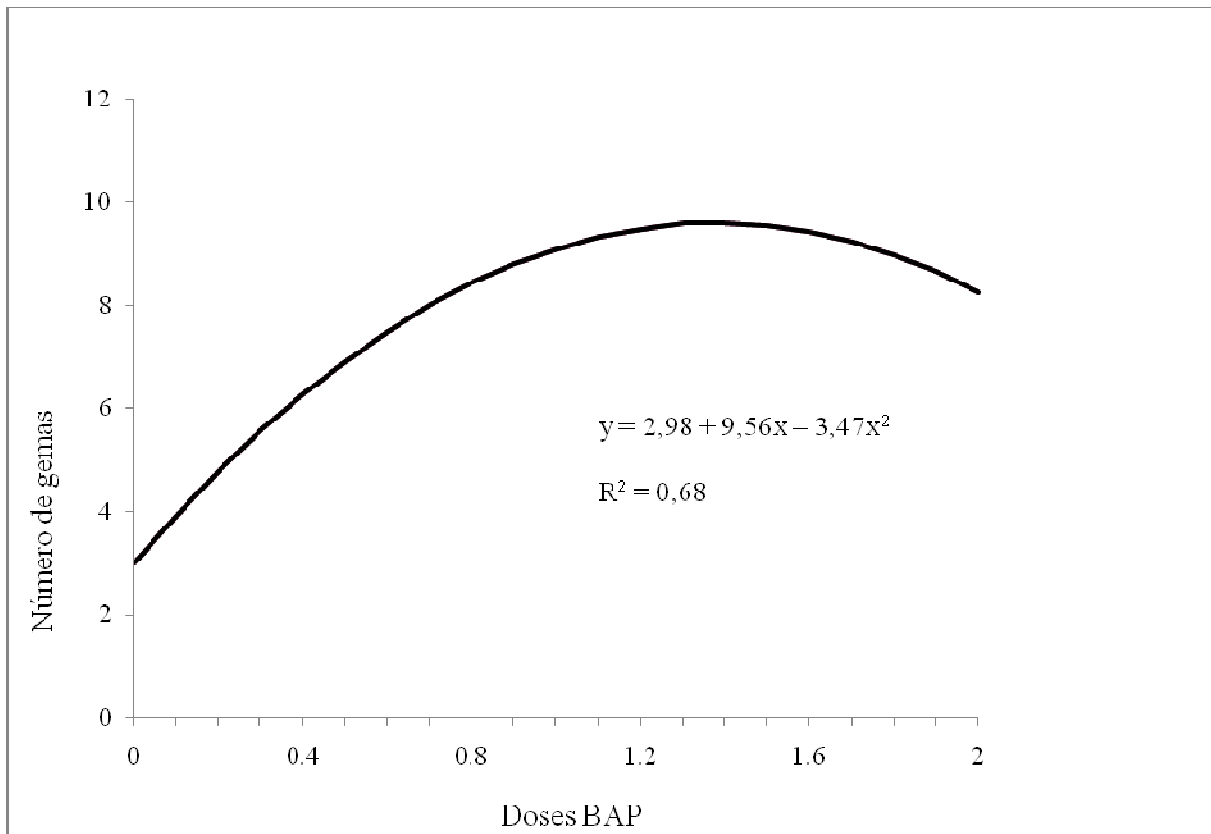


Figura 02 - Concentração ideal de BAP para o desenvolvimento de gemas em explantes de pereira cv. Packham's Triumph.



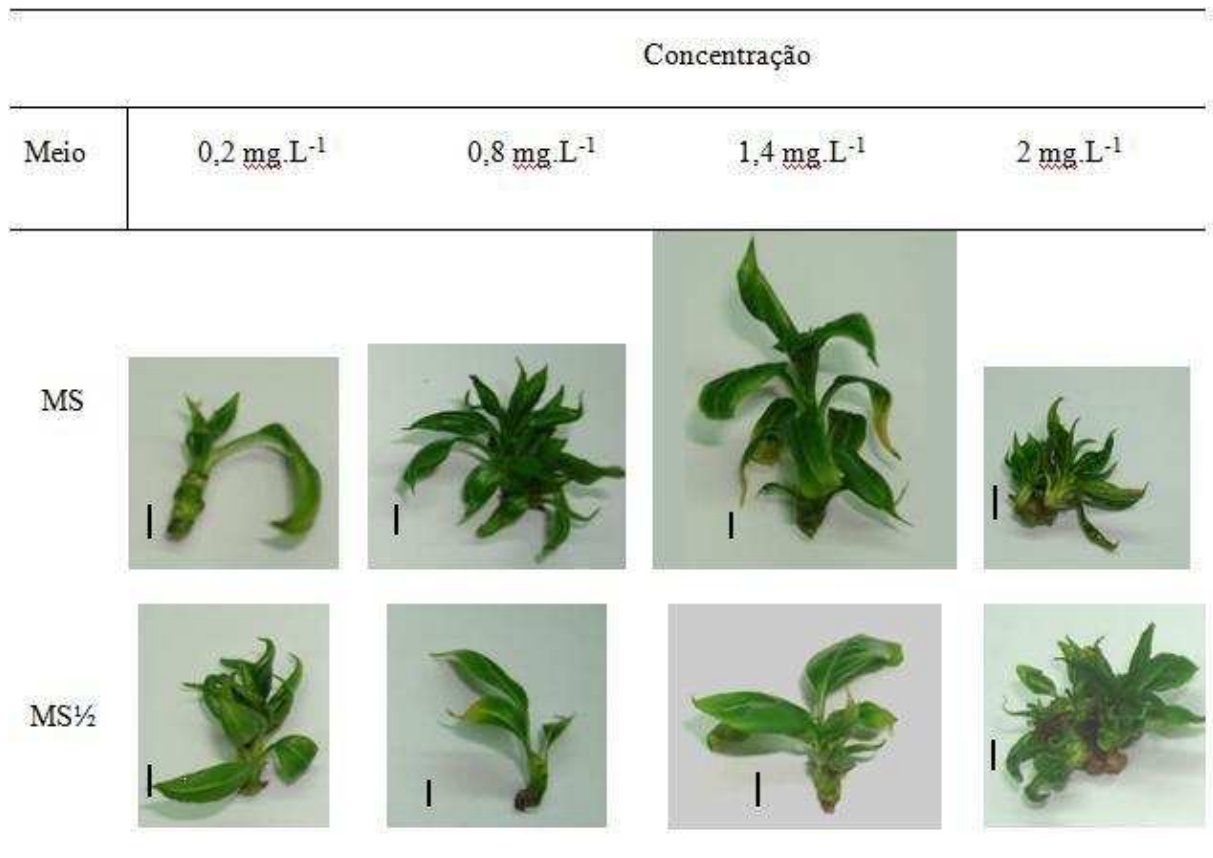


Figura 3 - Explantes de pereira cv. Packham's Triumph sob os diferentes meios e concentrações de BAP testados. A barra equivale a cinco milímetros.

#### 4.4 CONCLUSÕES

Para a multiplicação *in vitro* de pereira cv. Packham's Triumph os resultados indicaram que o meio de cultura mais adequado é o MS com a concentração original de sais, suplementado com 1,3 mg.L<sup>-1</sup> de BAP.

## **5 CAPÍTULO III: EFEITO DE DOSES DE AUXINAS SINTÉTICAS NO ENRAIZAMENTO *in vitro* DE PEREIRA CV. PACKHAM'S TRIUMPH.**

### **5.1 INTRODUÇÃO**

O estágio de enraizamento é caracterizado pela formação de raízes adventícias nas partes aéreas desenvolvidas anteriormente na fase de multiplicação. Os fenômenos envolvidos na formação de raízes são difíceis de isolar e caracterizar, em decorrência de sua complexidade, sendo assim um entrave para o conhecimento adequado desta etapa (ASSIS e TEIXEIRA, 1998). Segundo Hartmann et al. (1990), a formação das raízes adventícias ocorre em quatro estágios: desdiferenciação de células específicas; formação de raízes iniciais a partir de células próximas à tecidos vasculares, que por desdiferenciação transformaram-se em células meristemáticas; subsequente desenvolvimento das raízes iniciais em primórdios radiculares; crescimento e emergência dos primórdios radiculares, com formação de vasos condutores entre os primórdios e o tecido vascular do explante.

As plantas lenhosas encontram obstáculos durante a formação de raízes adventícias, pois possuem mais camadas de floema e xilema secundário. As raízes adventícias se formam a partir de células vivas do parênquima, primeiramente do floema secundário mais jovem. Segundo Hartmann et al. (1990) a idade dos explantes também influencia diretamente na capacidade de enraizamento. Material juvenil tem maior capacidade de enraizamento, por possuir um conteúdo maior de auxina endógena e de co-fatores de enraizamento (MONCOUSIN, 1991b). O tempo de desenvolvimento das raízes iniciais de lenhosas varia, entre as espécies, de 10 a 25 dias. (METIVIER et al., 2007; VIEIRA et al 2007).

Fatores como luminosidade, temperatura e turgidez do explante tem efeito sobre o enraizamento, porém o meio de cultura e os fitorreguladores adicionados a ele são de fundamental importância para a formação de raízes adventícias (COUVILLON, 1988; MONCOUSIN, 1991a). Para lenhosas da família das rosáceas as auxinas que mais estimulam a rizogênese são o ANA e o AIB (RADMANN et al., 2002). O AIB além de apresentar resultados satisfatórios, tem sido muito utilizado por ser fotoestável, atóxico e de ação localizada (MIRANDA et al., 2004). O AIA quando utilizado para aplicação exógena apresenta alta instabilidade química (ASSIS e TEIXEIRA, 1998).

O presente trabalho teve como objetivo testar o efeito de doses das auxinas ANA e AIB no enraizamento *in vitro* de explantes de pereira cv. Packham's Triumph.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em janeiro de 2009, no laboratório de biotecnologia da Estação Experimental de Pesquisa Agropecuária – Epagri em Lages – SC.

Foram utilizados como explantes partes aéreas de pereira cv. Packham's Triumph, previamente multiplicados *in vitro*. Cada explante com tamanho aproximado de 25 mm. O meio de cultura utilizado foi o MS com a concentração do nitrogênio reduzida 25% em todos os tratamentos. Foram testadas duas auxinas, ANA e AIB, nas seguintes doses 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mg.L<sup>-1</sup>. Todos os meios foram adicionados de 100 mg.L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar e tiveram o pH ajustado para 5,8 antes da adição do ágar. Os meios foram distribuídos em frascos de 250 mL, nos quais foram colocados 30 mL de meio por frasco, e autoclavados à temperatura de 121 °C durante 15 minutos. Em cada frasco foi colocado um explante e posteriormente os frascos foram levados para uma sala de

crescimento sob um fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Os resultados foram analisados após um período de 35 dias.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 8 repetições por tratamento. As variáveis analisadas para todos os explantes foram formação de raízes adventícias e formação de calo. As variáveis analisadas apenas para os explantes enraizados foram comprimento de raiz, número de raiz, massa fresca de raiz, massa seca de raiz e comprimento da parte aérea.

Os dados obtidos foram analisados empregando o programa SAS 9.1.3 (SAS Institute Inc., 2007), pelo procedimento PROC GENMOD. O nível mínimo de significância adotado em todos os testes foi de 5% de probabilidade de erro.

### 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise de variação para formação de raízes adventícias a interação Auxina e Dose foi considerada significativa. Porém, quando testado o efeito das auxinas aninhadas dentro de cada dose, não houve diferenças significativas (Tabela 06).

As duas auxinas testadas, AIB e ANA, promoveram a formação de raízes adventícias. As concentrações da auxina AIB mantiveram uma média de enraizamento constante, e, apesar de não haver formação de raízes nos explantes tratados com ANA nas doses  $0,5\text{ mg.L}^{-1}$  e  $1,0\text{ mg.L}^{-1}$ , nenhum dos tratamentos apresentaram diferenças significativas entre si. Já era esperado que o comportamento da auxina AIB fosse constante, assim como observado por Viaganó et al. (2007) onde concentrações de AIB acima de  $0,5\text{ mg.L}^{-1}$  não aumentaram a taxa de formação de raízes adventícias para explantes de espécies lenhosas. Porém, também era esperado que o AIB proporcionasse melhores respostas em relação ao ANA, como visto no enraizamento *in vitro* de lenhosas como amoreira, pessegueiro e macieira (MIRANDA et al.,

2004, RADMANN et al., 2002 e CENTELLAS et al., 1999), mas isso não ocorreu. A auxina AIB é mais utilizada em trabalhos de enraizamento, mas seu efeito pode sofrer alterações, pois durante a autoclavagem esta auxina apresenta decomposição, enquanto a auxina ANA é mais estável (MACHAKOVA et al., 2008).

O fato de não haver diferenças significativas entre as duas auxinas pode ser devido à amplitude de doses testadas, ou seja, a faixa de 0,1 a 3,0 mg.L<sup>-1</sup> de AIB e ANA testada não foi o suficiente para demonstrar diferenças no enraizamento. Porém, o ocorrido contraria o que é comumente utilizado no enraizamento *in vitro*, onde a faixa de auxinas fica entre 0,01 a 1,0 mg.L<sup>-1</sup> (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). É importante ressaltar que, assim como nos outros estágios da propagação *in vitro*, as concentrações e tipos de auxina variam entre espécies e cultivares. Algumas cultivares de macieira e amoreira enraízam somente na presença de baixas concentrações, outras cultivares destas mesmas espécies na presença de altas concentrações e algumas cultivares enraízam sem a necessidade de adição de auxinas ao meio (ZANOL et al., 1998 e RADMANN et al., 2003).

Portanto, cada sistema de cultura *in vitro* é único e os efeitos de diferentes concentrações de fitoreguladores devem ser testados individualmente para cada espécie (MACHAKOVA et al., 2008).

Em relação à formação de calo a análise de variação mostrou-se significativa para o fator dose. Através do valor do qui-quadrado foi possível estabelecer a significância do fator dose, que se mostrou maior quando comparado ao fator auxina e à interação. A interação entre auxina e dose não foi significativa, indicando não existir uma dependência entre os efeitos destes fatores (Tabela 06). Não foi possível ajustar uma regressão para o fator dose, pois nenhum dos componentes polinomiais (linear, quadrática e cúbica) foi significativo. Portanto, optou-se por mostrar uma tabela com as respectivas média de cada tratamento (Tabela 07). Foi observado que em todos os tratamentos houve formação de calo. Os

tratamentos com doses mais altas (1,5; 2,0 e 3,0 mg.L<sup>-1</sup>), independente da auxina, e o tratamento AIB 0,1 mg.L<sup>-1</sup>, apresentaram maior formação de calo.

Os explantes tratados com a auxina ANA nas doses mais baixas (0,1; 0,5 e 1,0 mg.L<sup>-1</sup>) apresentaram a menor formação de calo, corroborando resultados observados por Radmann et al. (2002) no enraizamento *in vitro* de porta-enxerto de macieira. Maiores doses das auxinas testadas induziram uma maior formação de calo. Este fato pode ser atribuído ao acúmulo de ANA e AIB que ocorre nas células dos explantes, podendo comprometer a qualidade do sistema radicular, afetando a conexão vascular da raiz com o explante, deste modo prejudicando a posterior aclimatação das brotações (FACHINELLO et al., 1995).

Para a análise de variação da variável comprimento de raiz houve interação significativa entre auxina e dose, portanto, não é possível estabelecer o efeito para cada fator separadamente, pois existe uma dependência entre os fatores (Tabela 08). Quando decomposta a variação nos componentes polinomiais linear e quadrático, apenas o componente linear para a auxina AIB foi significativo (Tabela 09). Foi ajustada uma equação de regressão, mostrando que à medida que a dose de AIB é aumentada, o comprimento médio das raízes dos explantes diminui (Figura 04). Resultados semelhantes foram observados por Silveira et al. (2007), tanto para o AIB quanto para o ANA no enraizamento de macieira, e por Pereira et al. (2000), em relação ao efeito do BAP no enraizamento de lenhosas. Indicando que a diminuição do tamanho médio de raízes ocorre com doses crescentes de fitorreguladores, pois maiores concentrações induzem a divisão celular, reduzindo o tamanho das células (PEREIRA et al., 2000).

A análise de variação para número de raiz também mostrou interação significativa entre auxina e dose (Tabela 10). Quando decomposta a variação nos componentes polinomiais linear e quadrático, mostrou-se significativo o componente quadrático para a auxina AIB

(Tabela 11). Sendo assim, ajustou-se uma equação de regressão, onde o maior número médio de raízes aconteceu na dose  $1,6 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB (Figura 05).

Radmann et al. (2002) encontraram o maior número médio de raízes utilizando  $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB em macieira (6,9 mm), uma quantidade de AIB consideravelmente baixa em relação ao presente trabalho. Porém, como já citado, cada sistema de propagação *in vitro* é único. Centellas et al. (1999) não observaram diferenças significativas entre as auxinas AIB e ANA em relação ao número de raízes, porém, observaram que o AIB proporciona melhor qualidade de raízes, sendo o mais indicado para uso em trabalhos de enraizamento.

As análises de variação para massa fresca e massa seca da raiz, bem como, para comprimento de parte aérea não se mostraram significativas para nenhum dos fatores, nem para a interação (Tabela 12). Estas variáveis não estão diretamente ligadas ao tipo e à dose de auxinas. Segundo Bosa et al. (2003) este tipo de variável mostra respostas em relação à quantidade de dias de cultivo do explante no meio de enraizamento. Porém, diferentes dias de cultivo do explante não foram testados no presente trabalho.

A Figura 06 mostra as raízes adventícias que foram formadas nos explantes de pereira, durante o estágio de enraizamento *in vitro*, sob a menor e a maior dose, de cada auxina testada.

Tabela 06 - Análise de variação para as variáveis formação de raízes adventícias e formação de calo dos explantes de pereira cv. Packham's Triumph.

<b>Variável</b>	<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	$\chi^2$
Formação de raízes adventícias	Auxina	1	2,48
	Dose	5	0,03*
	Auxina*Dose	5	1,04*
	Dose(Auxina)	11	16,92
Formação de calo	Auxina	1	0,19
	Dose	5	28,03*
	Auxina*Dose	5	6,42

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste do qui-quadrado.



Tabela 07. Médias observadas (mo) e médias transformadas (mt) por  $[\rho = \ln(\mu/1-\mu)]$ , para o efeito do AIB e ANA na formação de calo em explantes de pereira cv. Packham's Triumph.

Tratamento	Formação de Calo	
	mo	mt
AIB 0,1 mg.L <sup>-1</sup>	0,5 ab	0,00
AIB 0,5 mg.L <sup>-1</sup>	0,25 b	-1,0986
AIB 1,0 mg.L <sup>-1</sup>	0,375 b	-0,5108
AIB 1,5 mg.L <sup>-1</sup>	0,75 ab	1,0986
AIB 2,0 mg.L <sup>-1</sup>	0,625 ab	0,5108
AIB 3,0 mg.L <sup>-1</sup>	0,625 ab	0,5108
ANA 0,1mg.L <sup>-1</sup>	0,125 c	-1,9459
ANA 0,5 mg.L <sup>-1</sup>	0,125 c	-1,9459
ANA 1,0 mg.L <sup>-1</sup>	0,125 c	-1,9459
ANA 1,5 mg.L <sup>-1</sup>	0,875 a	1,9459
ANA 2,0 mg.L <sup>-1</sup>	0,875 a	1,9459
ANA 3,0 mg.L <sup>-1</sup>	0,75 ab	1,0986

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de qui-quadrado ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 08 - Análise de variação para a variável comprimento de raiz dos explantes enraizados de pereira cv. Packham's Triumph.

F.V.	G.L.	$\chi^2$
Auxina	1	0,37
Dose	5	66,91*
Auxina*Dose	3	248,39*
Dose(auxina)	9	476,34*

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste do qui-quadrado.

Tabela 09 - Decomposição da interação auxina\*dose nos componentes polinomiais linear e quadrático, para a variável comprimento de raiz dos explantes enraizados de pereira cv. Packham's Triumph.

Auxina	Componente	$\chi^2$
AIB	Linear	35.39*
AIB	Quadrática	1.03
ANA	Linear	3.47
ANA	Quadrática	1.36

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste do qui-quadrado.

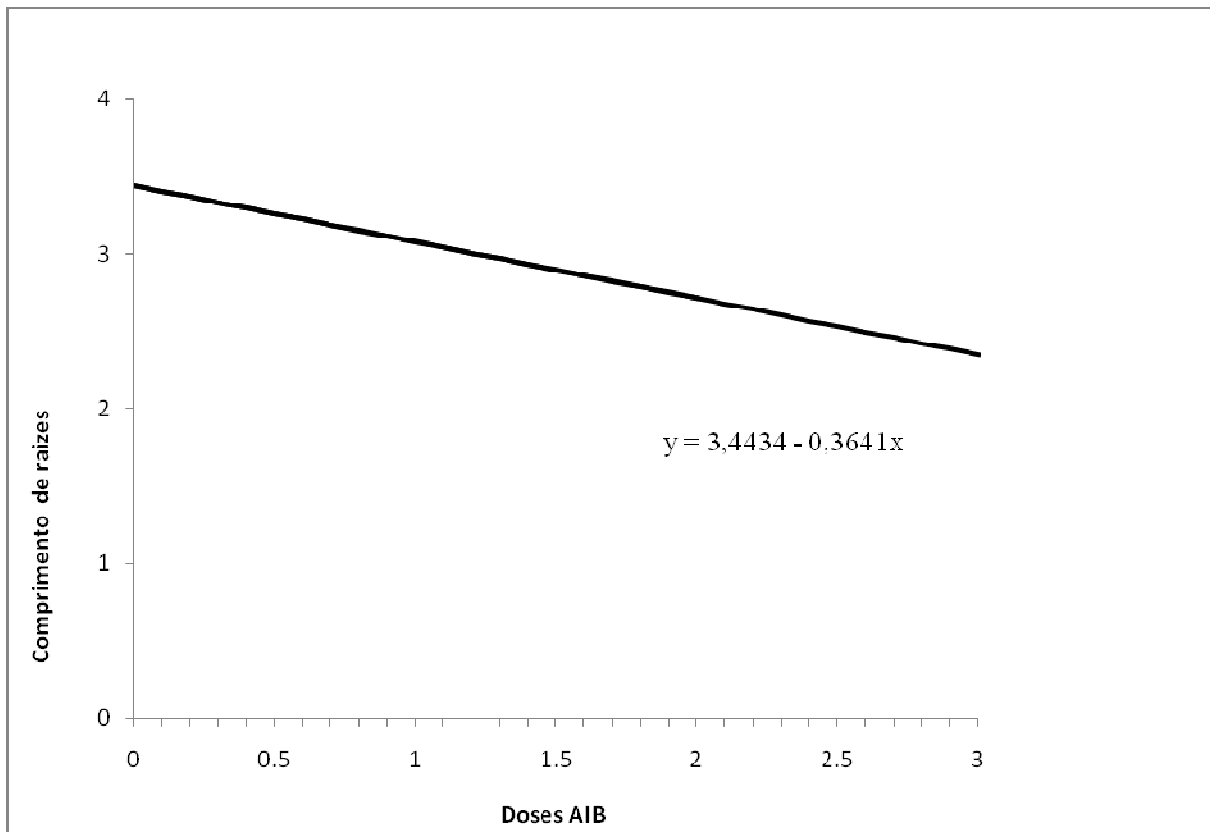


Figura 04 - Comportamento das doses da auxina AIB no comprimento de raiz em explantes enraizados de pereira cv. Packham's Triumph.

Tabela 10 - Análise de variação para a variável número de raiz dos explantes enraizados de pereira cv. Packham's Triumph.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	$\chi^2$
Auxina	1	2,35
Dose	5	8,49
Auxina*Dose	3	13,19*
Dose(auxina)	9	28,56*

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste do qui-quadrado.

Tabela 11 - Decomposição da interação auxina\*dose nos componentes polinomiais linear e quadrático, para a variável número de raiz dos explantes enraizados de pereira cv. Packham's Triumph.

<b>Auxina</b>	<b>Componente</b>	$\chi^2$
AIB	Linear	1.25
AIB	Quadrática	6.71*
ANA	Linear	0.52
ANA	Quadrática	0.77

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste do qui-quadrado.

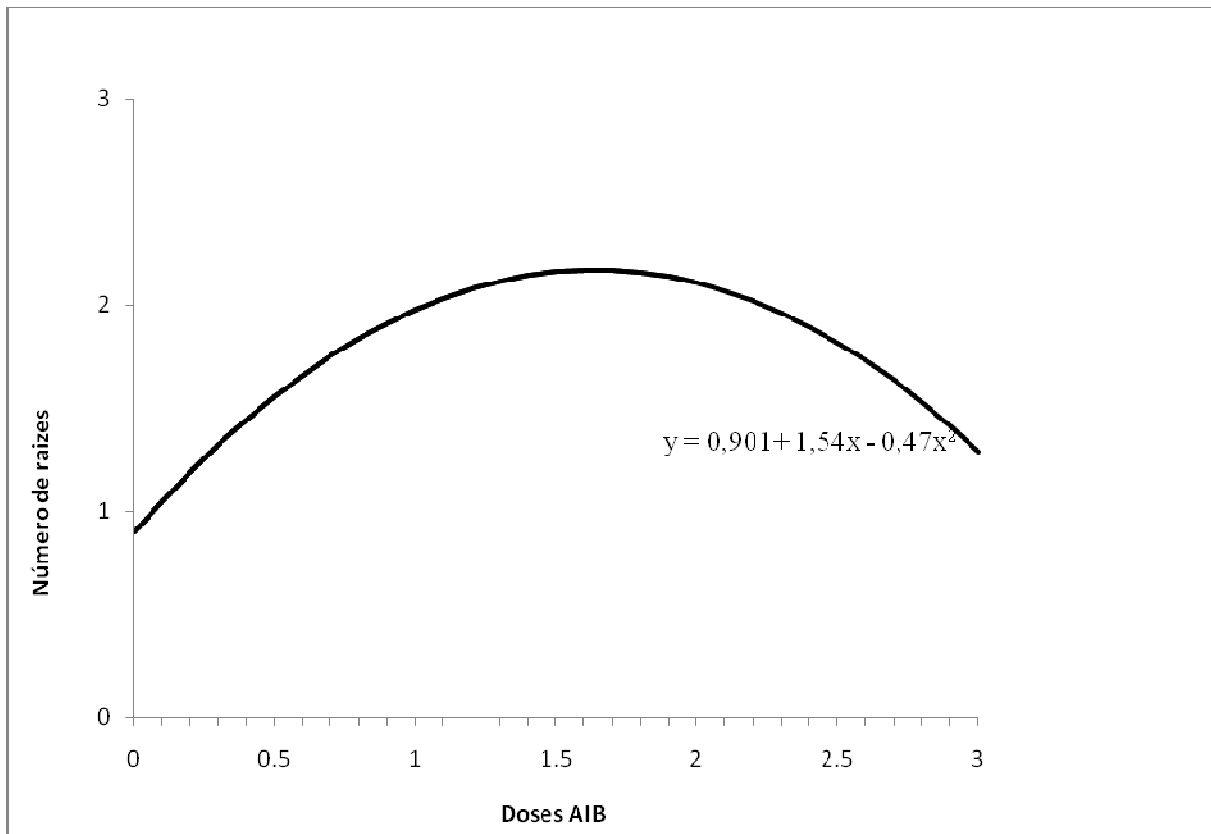
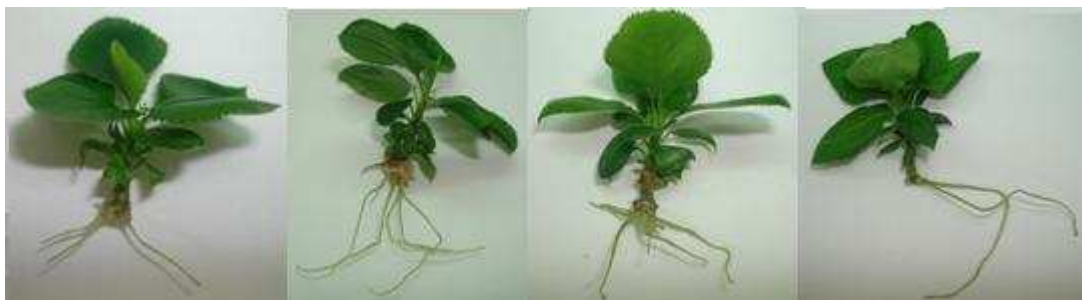


Figura 05 - Comportamento das doses da auxina AIB no número de raiz em explantes enraizados de pereira cv. Packham's Triumph

Tabela 12. Análise de variação para as variáveis massa fresca e massa seca de raiz e comprimento de parte aérea dos explantes enraizados de pereira cv. Packham's Triumph.

Variável	F.V.	G.L.	$\chi^2$
Massa Fresca	Auxina	1	0,96 <sup>NS</sup>
	Dose	5	0,33 <sup>NS</sup>
	Auxina*Dose	3	0,64 <sup>NS</sup>
Massa Seca	Auxina	1	0,01 <sup>NS</sup>
	Dose	5	0,10 <sup>NS</sup>
	Auxina*Dose	3	0,05 <sup>NS</sup>
Comprimento de Parte Aérea	Auxina	1	0,07 <sup>NS</sup>
	Dose	5	4,60 <sup>NS</sup>
	Auxina*Dose	3	4,20 <sup>NS</sup>

NS: não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste do qui-quadrado.



AIB 0,1mg.L<sup>-1</sup>

AIB 3,0mg.L<sup>-1</sup>

ANA 0,1mg.L<sup>-1</sup>

ANA 3,0 mg.L<sup>-1</sup>

Figura 06 - Explantes de pereira cv. Packham's Triumph enraizados com as auxinas AIB e ANA.

#### 5.4 CONCLUSÕES

As auxinas ANA e AIB apresentaram o mesmo comportamento na formação de raízes adventícias.

A menor formação de calo ocorreu com ANA nas menores doses.

A auxina AIB afetou significativamente o número de raízes e aumento crescente desta auxina causou uma diminuição no comprimento das raízes.

As variáveis massa fresca e seca de raiz, e comprimento de parte aérea não foram diretamente afetadas pelas doses de AIB e ANA.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os experimentos realizados permitiram a obtenção dos protocolos de estabelecimento e de multiplicação *in vitro* de pereira, cv. Packham's Triumph, consistindo na base para futuros estudos desta cultivar.

Durante o estabelecimento *in vitro* da cv. Packham's foi observado que explantes oriundos de plantas-matrizes acomodadas em casa de vegetação, desinfestados com soluções de hipoclorito podem ser utilizados com sucesso no estabelecimento livre de contaminação. No entanto, muitas vezes o número de plantas-matrizes acomodadas em casa de vegetação não é suficiente para atender a necessidade de mudas estabelecidas, tendo como alternativa, a utilização de explantes oriundos diretamente do campo. Nesse caso, o uso de meristemas é a opção mais viável.

Na multiplicação os experimentos permitiram estabelecer a melhor concentração de BAP para o desenvolvimento de gemas, porém, não permitiram estabelecer a melhor concentração de BAP para o desenvolvimento de brotos por explantes, que é relevante para a multiplicação. Outras concentrações de BAP podem ser testadas futuramente a fim de diminuir o número necessário de repicagens, o que reduziria a manifestação de contaminações endógenas.

Para o estágio de enraizamento, apesar das auxinas terem apresentado formação de raízes, outros trabalhos podem ser feitos para estabelecer a melhor concentração de auxina para o enraizamento desta cultivar. Sugere-se testar uma faixa mais ampla de concentrações

de auxinas, bem como outras auxinas disponíveis para cultura de tecidos e suas combinações, o que pode aumentar o poder sinérgico de cada auxina.

A maior dificuldade do presente trabalho foi o baixo número de explantes produzidos inicialmente. Contudo, com o protocolo de estabelecimento e de multiplicação *in vitro* estabelecidos aqui, se tornou possível superar esta dificuldade. A obtenção dos protocolos de estabelecimento e de multiplicação *in vitro* poderá embasar novos experimentos, a fim de se conseguir um protocolo completo de propagação *in vitro* para a pereira cv. Packham's Triumph.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, M.W. de, LUZ, J.M.Q., LACERDA, A.S., MELO, P.R. Micropropagação Da Aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência Agrotécnica**, Lavras. v.24, n.1, p. 174-180, 2000
- ASSIS, T.F., 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, 1998. Parte II, p.261-296.
- BHATIA, P., ASHWATH, N., SENARATNA, T., et al. Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.78, p. 1-21, jul. 2004.
- BOSA, N.; CALVETE, E.O.; NIENOW, A.A.; SUZIN, M.; Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de gipsofila. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p.207-210, 2003.
- BRUM, G.R., SILVA, A.B., PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na propagação *in vitro* da figueira (*ficus carica* l.) **Ciência Agrotécnica**, Lavras. Edição especial, p. 1403-1409, 2002.
- CALDAS, L.S., HARIDASAN, P., FERREIRA, M.E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 1998. Parte II, p. 81-130.
- CALVETE, E.O., KAMPF, A.N., SUZIN, M., et al. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 186-191, 2002.
- CASTRO, L. A. S. Viroses. In: QUEZADA, A. C. et al., **Pêra Produção**. Brasília. Embrapa Informação Tecnológica, 2003, v.1, p. 72-75

- CENTELLAS, A.Q., FORTES, G.R. de L., MULLER, N.T.G., et al. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.34, n.2, p.181-186, 1999.
- CHAVES, A. da C.; ROCHA, P. S.; BIANCHI, V. J.; SCHUCH, M. W.; FACHINELLO, J. C. Desinfestação de explantes de prunus cv. Mr. S 2/5 no estabelecimento *in vitro*. In: **congresso iberoamericano de tecnologia postcosecha y agroexportaciones**, 3. 2002, Santiago. Resumos... Santiago: [s.n.], 2002. v. 72, p. 111.
- CHAVES, A. da C., SCHUCH, M. W. ERIG, A.C. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana*. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 29, n.6, p. 1281-1287, 2005
- CHEVREAU, E., THIBAUT, B., ARNAUD, Y. Micropropagation of Pear (*Pyrus communis* L.) **Biotechnology in Agricultura and Forestry**. Berlin, v. 18, 244-261, 1992.
- CHEVREAU, E., LEBLAY, C. The effect of mother-plant pretreatment and explant choice on regeneration from *in vitro* pear leaves. **Acta Horticulturae**, Georgia, v.336, p.263-268, 1993.
- COUTO, M., OLIVEIRA, R.P. de, FORTES, G.R. de L., Multiplicação *in vitro* dos porta-enxertos de *prunus* sp. 'barrier' e 'cadaman' **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.26, n.1, p.5-7, 2004.
- COUVILLON, G.A. Rooting responses to different treatments. **Acta Horticulturae.**, Georgia, v.227, p.187-196, 1988.
- DAL VESCO, L.L.; GUERRA, M.G. Organogênese e micropropagação da goiabeira serrana (*Feijoa sellowiana* Berg.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.21, n.1, p.6064, 1999.
- DANTAS, A.C.M. NESI, A.M., MACHADO, L.B., et al. Estabelecimento e Multiplicação *in vitro* de Cultivares de *Pyrus spp*. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.8, p. 19-23, 2002.
- DONINI, L.P., FERREIRA-MOURA, I., GUISSO, A.P. *et al.* Preparo de lâminas foliares de aráceas ornamentais: desinfestação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.4, p.517-522, 2005.

DUSTAN, D.I., LASHTA, D.P., KIKCIO, S.I., *et al.* Factors affecting recurrent shoot multiplication *in vitro* cultures of 17 to 20 years-old douglas fir trees. ***In vitro Cell Development Biology***, Columbia, v.28, p.33-38, 1992.

ERIG, A.C., SCHUCH, M.W. Estabelecimento *in vitro* de mirtilo a partir de segmentos nodais. ***Scientia Agraria***, Curitiba, v.6, n.1, p. 91-96, 2005a.

ERIG, A.C., SCHUCH, M.W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. ***Ciência Rural***, Santa Maria, v.35, n.4, p. 961-965, 2005b.

ERIG, A.C., SCHUCH, M.W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*malus domestica* borkh.) cvs. galaxy, maxigala e mastergala. ***Revista Brasileira de Agrociência***, v.9, n. 3, p. 221-227, 2003.

ERIG, A.C., SCHUCH, M.W., BRAGA, E.J.B. Enraizamento *in vitro* de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Carrick. ***Ciência Rural***, Santa Maria, 34(1): 275-277, 2004.

FACHINELLO, C.A, BIANCHI, V.J. Produção de mudas certificadas. In: FACHINELLO, J.C., HOFFMANN, A., NACHTIGAL, J.C. **Propagação de Plantas Frutíferas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 2005. cap.10, p.207-220.

FRÁGUAS, C. B., PASQUAL, M., PEREIRA, A. R. Multiplicação *in vitro* de *ficus carica* L.: efeito da cinetina e do ácido giberélico. ***Ciência agrotécnica***. Lavras, v. 28, n. 1, p. 49-55, 2004.

GRATTAPLAGLIA, 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, 1998. Parte II, p.183-260.

GEORGE, E. F. Plant Tissue Culture Procedure – Background. In: GEORGE, E.F., HALL, M.A., DE KLERK, G.J. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Dordrecht, 2008. 3<sup>rd</sup> Edition, v. 1, p. 1-28.

HARTMANN, H.T., KESTER, D.E., DAVIES, F.T. **Plant Propagation: principles and practices**. 5<sup>a</sup> ed. New Jersey. 1990. 647p.

HOFFMANN, A., NACHTIGAL, J.C., FACHINELLO, J.C. Infra-Estrutura para Propagação de Plantas Frutíferas. In: FACHINELLO, J.C., HOFFMANN, A., NACHTIGAL, J.C. **Propagação de Plantas Frutíferas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 2005. cap.1, p.13-44.

LANE, W. D. IKETANI, H., HAYASHI, T. Shoot regeneration from cultured leaves of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.54, p. 9-14, 1998.

LEITE, D.L., SOUZA, C.M. de, Polinização. In: QUEZADA, A.C., NAKASU, B.H., HERTER, F.G. **Pêra Produção**. Brasília. Embrapa Informação Tecnológica, 2003, v.1, p.9.

LEITE, G.B. & BLEICHER, J. Viroses e microplasmoses da macieira no Estado de Santa Catarina. *Agropecuária Catarinense* v. 6, n. 3, p. 21-24. 1993.

LEITE, G.B., FINARDI, N., FORTES, G.R. de L. Efeitos de concentração de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de pereira OH X F971. **Ciência agrotécnica**, Lavras, v.24, n.2, p.353-357, abr./jun., 2000

LEONTIEV-ORLOV, O. ROGALSKI, M.; MOSSI, J.A.; CANSIAN, R.L. 6-benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de Prunáceas (*Prunus* sp.) **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.6, n.1, p. 42-46, 2000.

MACHAKOVA, I., ZAZIMALOVA, E., GEORGE, E.F. Plant Growth Regulator I: Introduction; Auxins, Their Analogues and Inhibitors. In: GEORGE, E.F., HALL, M.A., DE KLERK, G.J. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Dordrecht, 2008. 3<sup>rd</sup> Edition, v. 1, p. 1-28.

METIVIER, P.S.R., YEUNG, E.C., PATEL, K.R., et al. *In vitro* rooting of microshoots of *Cotinus coggygia* Mill, a woody ornamental plant. **In vitro cellular development biology plant**, Nova Iorque v.43, p. 119-123, 2007.

MINISTÉRIO da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=13008>> . Acesso em: 13 dez. 2008.

MIRANDA, C.S., CHALFUN, N.N.J., HOFFMANN, A., et al. Enxertia recíproca e AIB como fatores indutores do enraizamento de estaca lenhosas dos porta-enxertos de pessegueiro “Okinawa” e “Umezeiro”. **Ciência Agrotécnica**, Lavras. v.28, n.4, p. 778-784, 2004.

MONCOUSIN, C.H. Rooting of microcuttings: general aspects. **Acta Horticulturae**. Georgia, v.289, p. 301-308. 1991a.

MONCOUSIN, C.H. Rooting of microcuttings: unmanipulated factors. **Acta Horticulturae**. Georgia, v.289, p. 319-327. 1991b.

MORAES, L.K.A. de, FESLIBINO, C., CRESTANI, L., SILVA, A.L. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *pyrus calleryana* d-6 em sistema de cultura 'dupla-fase' **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 26, n. 3, p. 403-405, 2004

MURASHIGE, T., SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. - **Physiology plant**, Waterbury, v.15, p. 473-497, 1962.

NAKASU, B. H.; FAORO, I.D. Cultivares In: QUEZADA, A. C. et al., **Pêra Produção**. Brasília. Embrapa Informação Tecnológica, 2003, v.1, p. 29-36

NAKASU, B.H. Introdução. In: QUEZADA, A.C., NAKASU, B.H., HERTER, F.G. **Pêra Produção**. Brasília. Embrapa Informação Tecnológica, 2003, v.1, p.9.

OLIVEIRA, R.P., NINO, A.F.P., NICKEL, O. Limpeza de Patógenos e Propagação *in vitro* de Cultivares de Pereira. **Comunicado Técnico**. EMBRAPA. Pelotas- RS, 2004.

PATI, P.K. RATH, S.P., SHARMA, M., et al. *In vitro* propagation of rose – a review. **Biotechnology Advances**, Seoul, v. 24, p. 94-114, 2006.

PERAZZOLO, G. Tecnologia para a produção de pêras européias. In: IX ENFRUTE Encontro Nacional sobre Fruticultura de Clima Temperado), v. 1, 25-27 jul. 2006, Fraiburgo, SC. **Anais...** Caçador: EPAGRI. 2006. p. 109-115.

PEREIRA, F.D., PINTO, J.E.B.P., CARDOSO, M. das G., LAMEIRA, O.A. Propagação *in vitro* de chapéu – de – couro. **Ciência Agrotécnica**, Lavras. v.24, ed. especial, p. 74-80, 2000.

QUEZADA, A. C.; NAKASU, B. H. Classificação Botânica, origem e evolução. In: QUEZADA, A. C. et al., **Pêra Produção**. Brasília. Embrapa Informação Tecnológica, 2003, v.1, p.20-21

RADMANN, E.B., FACHINELLO, J.C., PETERS, J.A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxerto de macieira 'M9'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, 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 sp*), cv. ébano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v.25, n.1, p. 124-126, 2003.

REETZ, E.R., RIGON, L., VENCATO, A., et al. **Anuário brasileiro de fruticultura 2007 / ERNA**. Santa Cruz do sul, 2007.

RIBEIRO, P.A.; BRIGUENTI, E.; BERNARDI, J. Comportamento de algumas cultivares de pereira *Pyrus communis* L. e suas características nas condições do Planalto catarinense. **Boletim Técnico**, n.56, Florianópolis, EMPASC, 1991. 53p.

ROCHA, P.S.G. da., SCHUCH, M.W., BIANCHI, V.J., et al. Qualidade da luz na micropropagação do porta enxerto de *Prunus* cv. MR .S.2/5. **Bioscience**. Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 32-40, 2007.

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

ROGALSKI, M.; LEONTIEV-ORLOV, O. Estudo de Micropropagação e morfogênese em ameixeira e pessegueiro. **Relatório Técnico- Científico PIBIC/CNPq**. Erechim. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), 1999, 151p.

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

ROUT, G.R., SAMANTARAY, S., MOTTLEY, J., et al. Biotechnology of the rose: a review of recent progress. **Scientia Horticulturae**, Ohio, v.81, p. 201-228, 1999.

SCHUCH, M.W.; ERIG, A.C. Micropropagação de Plantas Frutíferas. In: FACHINELLO, J.C., HOFFMANN, A., NACHTIGAL, J.C. **Propagação de Plantas Frutíferas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 2005. cap.8, p.155-174.

SILVA, A.L. da, ROGALSKI, M., MORAES, L.K.A. de, FESLIBINO, C., et al. Estabelecimento e Multiplicação *in vitro* de Porta-Enxertos de *Prunus*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.2, p.297-300, 2003.

SILVEIRA, C.A.P., CITADIN, I., FORTES, G.R.de L. Multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de macieira M7, sob diferentes tipos e concentrações de auxinas. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 7, n. 2, p. 107-109, 2001.

SILVEIRA, C.A.P., FACHINELLO, J.C., FORTES, G.R.de L., CITADIN, I. et al. Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos do gênero *prunus* sob diferentes concentrações de bap em dois meios de cultura **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.3, p.488-492, 2001.

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

SOUZA, J. A., DONINI, L.P., SILVA, L.C., et al. Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira-M9 em função da vedação, sacarose e material de suporte no meio de cultura. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.8, n.2, p. 161-164, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Citocininas: reguladores da divisão celular. In: \_\_\_\_\_. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 517-540.

TEIXEIRA, J.B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. Embrapa – **Recursos Genéticos e Biotecnologia**, simpósios, 2001.

TORRES, A.C., CALDAS, L.S., FERREIRA, A.T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S., BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 1998. Parte I, p.11-20.

VIAGANÓ, R.C., BIANCHI, V.J., ROCHA, P.S.G. da, SCHUCH, M.W., et al. 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

VIEIRA, R.L., LEITE, G.B., WAMSER, A.F. Efeito de substratos porosos no enraizamento *in vitro* do porta enxerto de macieira M-9 *Malus pumilla*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.29, n.1, 2007.

VILLALOBOS, A. V.M. ; THORPE, T. A. Micropropagación conceptos, metodología y resultados. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. **Cultivo de tejidos em la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones**. Cali, Colombia: CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), p. 127-141, 1991.

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

ZANOL, G.C., FORTES, G.R.de L, SILVA, J.B. da, et al. Uso do ácido indol butírico e do escuro no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n. 3, p. 387-391, 1998.



## **8 ANEXOS**

Revisão bibliográfica publicada na Revista de Ciências Agroveterinárias, Lages, v.7, n.2, p 160-168, 2008.

# Enraizamento *in vitro* de frutíferas da família *Rosaceae*

*In vitro* rooting of fruit trees of the *Rosaceae* family

Fernanda Grimaldi<sup>1</sup>, Marco André Grohskopf<sup>2</sup>, Aleksander Westphal Muniz<sup>3</sup>, Altamir Frederico Guidolin<sup>4</sup>

Recebido em 07/02/2008; aprovado em 12/11/2008.

## RESUMO

A micropropagação vem sendo usada com a finalidade de multiplicar plantas com características genéticas desejáveis e livres de patógenos. Esta tecnologia tem um papel importante para a fruticultura brasileira, pois os produtores buscam maneiras de produzir rapidamente frutas com alta qualidade. Nessa revisão objetivou-se aprofundar o conhecimento sobre a etapa de enraizamento *in vitro*. O enraizamento *in vitro* encontra grandes dificuldades, especialmente para as espécies de plantas lenhosas. A resposta ao enraizamento é dependente dos fatores endógenos e exógenos. Os obstáculos encontrados no enraizamento se devem principalmente a interação destes fatores, que dificulta o isolamento e a caracterização das variáveis envolvidas na formação radicular. Cada espécie, ou cultivar de uma mesma espécie, apresenta resposta diferente ao enraizamento *in vitro*, devido às características genéticas. Portanto, não é possível estabelecer um protocolo geral de enraizamento *in vitro* para todas as espécies de rosáceas.

**PALAVRAS-CHAVE:** enraizamento *in vitro*, micropropagação, plantas lenhosas, *Rosaceae*.

## SUMMARY

The micropropagation has been used in order to multiply disease-free plants with desirable genetic traits. This technology has an important role to the Brazilian

production of fruits, because the producers seek ways to produce fruit quickly and with high quality. This review has the objective to increase the knowledge of the *in vitro* rooting stage. The *in vitro* rooting is very difficult, especially for woody plants species. The response to rooting depends on endogenous and exogenous factors. The obstacles found in rooting are mainly caused by the interaction of these factors that makes difficult to isolate and characterize the variables involved in root formation. Each species or even cultivar of the same specie has different responses to *in vitro* rooting, due to specific genetic traits. Therefore, it is not possible to establish a general protocol of *in vitro* rooting for all species of the *Rosaceae* family.

**KEY WORDS:** *In vitro* rooting, micropropagation, woody plants, *Rosaceae*.

## INTRODUÇÃO

A família das rosáceas abrange um grande número de espécies arbóreas, arbustivas e herbáceas. As rosáceas podem ser plantas ornamentais ou frutíferas, sendo em sua maioria hermafroditas. As espécies frutíferas contribuem com parte significativa de nossa alimentação. Maçã, pêssego, ameixa, pêra e morango são alguns exemplos que demonstram a importância econômica dessa família. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de frutas, entretanto possui uma pequena participação no mercado internacional. A exportação de frutas tropicais está

<sup>1</sup> Bióloga, Mestrado em Produção Vegetal, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC).

<sup>2</sup> Acadêmico do curso de Agronomia, UDESC.

<sup>3</sup> Eng. Agr., M.Sc., Epagri – Lages.

<sup>4</sup> Eng. Agr., Doutor, UDESC, Departamento de Agronomia, Instituto de Melhoramento e Genética Molecular. Av. Camões 2090, Conta Dinheiro, Lages-SC, Brasil. 88520-000. E-mail: guidolin@cav.udesc.br. Autor para correspondência.

aos poucos ganhando espaço no mercado e nos últimos anos a quantidade de frutas exportadas, como a ameixa, pêra, pêssego e morango vêm aumentando. (REETZ et al, 2007).

A fruticultura brasileira é reconhecida mundialmente como uma das mais diversificadas. As cadeias produtivas nacionais se dedicaram nos últimos anos a arrojados investimentos na tecnificação de seus pomares e estruturas industriais, buscando principalmente qualidade (REETZ et al, 2007). Instituições governamentais vêm investindo em pesquisas com a finalidade de melhorar os sistemas de produção em uso. A introdução de novas espécies, o melhoramento genético e a produção de mudas sadias contribuem para o aumento da eficiência do sistema produtivo. A muda de qualidade potencializa a resposta à tecnologia aplicada no pomar, auxiliando na redução de custos e na produção de frutas com alta qualidade e produtividade (OLIVEIRA et al., 2004). O objetivo principal da fruticultura é dispor de frutas com aparência uniforme, polpa de textura sucosa, doce, bom sabor e aroma (NAKASU, 2003). Para que esse objetivo seja alcançado necessita-se primeiramente de infra-estrutura apropriada, mudas sadias e conhecimento tecnológico da cultura, tornando a produção eficiente e economicamente viável (HOFFMANN et al. 2005).

Na produção comercial de mudas frutíferas utiliza-se mais comumente a propagação assexuada, ou seja, por estruturas vegetativas, pois se deseja manter as características agrônomicas da planta matriz. Há uma grande variabilidade entre as espécies produzidas sexuadamente, e na propagação vegetativa tem-se espécies morfológicamente uniformes (ASSIS e TEIXEIRA, 1998). Nos métodos de propagação vegetativa uma limitação encontrada é o baixo potencial de enraizamento das mudas, que podem não sobreviver após o plantio (FACHINELLO e BIANCHI, 2005).

A micropropagação ou propagação *in vitro* tem sido muito estudada e utilizada porque permite o controle de variáveis responsáveis pelo desenvolvimento da planta. Esse método de propagação vem sendo utilizado desde 1902, quando iniciou a cultura de células em soluções nutritivas (TORRES et al., 1998). Porém, o método foi introduzido com sucesso somente nos anos 30, e vem

progredindo até hoje (BHATIA et al., 2004).

## DESENVOLVIMENTO

### Micropropagação

A micropropagação consiste na regeneração e multiplicação de mudas a partir de uma célula ou de segmentos sadios de tecidos da planta (ERIG e SCHUCH, 2005a). O método permite a produção massal de mudas, independente da época do ano e com ótimas condições sanitárias (SCHUCH e ERIG, 2005). Para espécies frutíferas a micropropagação tem sido utilizada com sucesso técnico e econômico, pela sua rapidez e eficiência de produção. O pleno potencial de produção depende da interação dos fatores da planta e dos fatores ambientais (ERIG e SCHUCH, 2005b).

Para o estabelecimento de uma cultura *in vitro* é necessária uma planta-matriz sadia para a obtenção de explantes. Os explantes podem ser gemas axilares ou apicais, meristemas e tecidos diferenciados (FACHINELLO e BIANCHI, 2005). Os explantes são introduzidos *in vitro* em meios de cultura, sob condições adequadas de temperatura e iluminação, para que ocorra o seu desenvolvimento e a emissão de brotação. Para atender a demanda dos produtores, uma grande quantidade de mudas é necessária, caracterizando a etapa de multiplicação *in vitro*. As brotações são cultivadas a fim de propagar o material obtido anteriormente. Somente quando atingido o número desejado de mudas elas serão enraizadas, completando seu desenvolvimento e estando prontas para as condições *ex vitro*.

O enraizamento é uma etapa caracterizada por dificuldades, apresentando limitações para algumas espécies. Porém para outras espécies, e até mesmo para cultivares de uma mesma espécie tem oferecido bons resultados (ASSIS e TEIXEIRA, 1998).

### Formação de raízes adventícias

Durante a etapa de enraizamento ocorre a formação de raízes adventícias nas partes áreas formadas anteriormente na fase de multiplicação. A rizogênese ocorre de uma a três semanas em um meio próprio para enraizamento (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Os fenômenos envolvidos no enraizamento são difíceis de isolar e caracterizar, em decorrência de sua complexidade, sendo assim um

entreve para o conhecimento adequado desta etapa (ASSIS e TEIXEIRA, 1998). A formação das raízes adventícias ocorrem, de acordo com Hartmann et al. (1990), em quatro estágios: desdiferenciação de células específicas; formação de raízes iniciais a partir de células próximas à tecidos vasculares, que por desdiferenciação transformaram-se em células meristemáticas; subsequente desenvolvimento das raízes iniciais em primórdios radiculares; crescimento e emergência dos primórdios radiculares, com formação de vasos condutores entre os primórdios e o tecido vascular do explante.

### Plantas herbáceas

O enraizamento de partes aéreas de plantas herbáceas é considerado mais fácil em relação às lenhosas, sendo uma etapa que não constitui grandes problemas (ASSIS e TEIXEIRA, 1998). As raízes adventícias em plantas herbáceas emergem de células parenquimáticas do floema, das células da epiderme ou das células do periciclo, dependendo da espécie (HARTMANN et al., 1990).

### Plantas lenhosas

No enraizamento de plantas lenhosas muitas generalizações não podem ser feitas. As plantas lenhosas têm menor adaptabilidade à cultura de tecidos *in vitro* e poucas espécies são micropropagadas com sucesso (ROUT et al., 1999). O enraizamento encontra obstáculos nos fenômenos envolvidos com a formação de raízes adventícias, em virtude dos fatores relacionados a este processo possuem interação entre si (ASSIS e TEIXEIRA, 1998). As plantas lenhosas possuem mais camadas de floema e xilema secundário e as raízes adventícias se formam a partir de células vivas do parênquima, primeiramente do floema secundário mais jovem. O tempo de desenvolvimento das raízes iniciais de lenhosas varia amplamente entre as espécies. Para *Continus cogygria* as raízes adventícias se desenvolvem em dez dias (METIVIER et al., 2007). De acordo com Vieira et al (2007), as raízes de *Mallus pumilla* levam cerca de 20 dias para se desenvolverem completamente.

### Enraizamento *in vitro*

O sucesso do enraizamento dos explantes é

pré-requisito para qualquer protocolo de micropropagação, pois é importante para facilitar o estabelecimento da muda no solo (PATI et al., 2006).

A resposta ao enraizamento depende de muitos fatores endógenos e exógenos que vêm sendo estudados ao longo dos anos, principalmente para promover a formação de raízes em espécies com difícil enraizamento. Esses fatores quando empregados separadamente ou combinados mostraram efeitos significativos no enraizamento, porém, para algumas espécies não tiveram efeito algum (COUVILLON, 1988).

### Fatores Exógenos

#### a) Relações hídricas

O estado de turgidez da planta-matriz tem grande influência no enraizamento. Quando a planta-matriz apresenta déficit hídrico ocorre uma redução do enraizamento, pois a falta de água compromete os níveis endógenos de hormônios, podendo afetar sua síntese e transporte (ASSIS e TEIXEIRA, 1998). Recomenda-se que os explantes sejam retirados logo de manhã, quando a planta apresenta células túrgidas. Explantes de cacau e ervilha quando retirados de plantas-matrizes em condições de estresse hídrico apresentaram pouco enraizamento (HARTMANN et al., 1990).

#### b) Luminosidade

A luminosidade interfere nas fases de indução e iniciação do enraizamento. Durante estas fases faz-se necessário que as partes aéreas sejam mantidas em condições de pouca ou nenhuma luminosidade, pois a presença de luz diminui os níveis endógenos de auxina, inibindo o processo de formação de raízes (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). A luminosidade pode inativar fatores que promovem o enraizamento e aumentar a atividade de peroxidase (HARTMANN et al., 1990). Após o período de indução e iniciação a luz é importante para o crescimento das partes aéreas e das raízes (ASSIS e TEIXEIRA, 1998). Assim, durante o enraizamento *in vitro* controla-se a duração da exposição das plantas à luz, ou seja, o fotoperíodo. O fotoperíodo influencia no enraizamento, aumentando a qualidade da raiz, bem como a percentagem de enraizamento (COUVILLON, 1988). Ele pode variar de zero hora

de luz (escuro) até 24 horas (iluminação contínua), dependendo da espécie, porém a maioria das plantas necessita entre 8 e 18 horas (ASSIS e TEIXEIRA, 1998).

Para *Rosa damascena* e *Rosa bourboniana* a iniciação do enraizamento na presença de luz decresceu 20% comparado à iniciação do enraizamento no escuro (PATI et al., 2006). Para *Pyrus communis* foram observados diferentes efeitos no alongamento radicular em função do tempo de cultivo no escuro e da duração do fotoperíodo (BERTAZZA et al., 1995). Vater e Arena (2005) observaram em *Rubus sp* que a duração da fase escura teve efeito significativo sobre o enraizamento. Porém, em *Mallus sp* foram testadas duas condições de incubação para o porta-enxerto M-9 e a presença de luz na iniciação radicular não afetou o enraizamento (RADMANN et al., 2002).

Uma prática para evitar a intensidade luminosa exclusivamente região de formação de raízes é o uso do carvão ativado no meio de cultura (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Porém, o uso de concentrações muito altas desse carvão pode levar a inibição do processo de formação radicular devido à adsorção de substâncias do meio de cultura (ASSIS e TEIXEIRA, 1998). Além disso, em alguns casos a utilização de carvão ativado não traz nenhum benefício ao enraizamento de explantes, como observado por Erig et al. (2004) em cultivares de *Pyrus sp*.

#### c) Temperatura

Altas temperaturas contribuem para o aumento do metabolismo, favorecendo o desenvolvimento do primórdio radicular (MONCOUSIN, 1991a). A temperatura ideal para propagação de espécies de clima temperado varia entre 23°C e 25°C (LANE et al., 1998; CALVETE et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2004). Espécies de *Prunus domestica*, *Mallus sp* e *Pyrus sp* enraizaram sob temperatura de 25°C (ERIG et al., 2004; ROCHA et al., 2007; SOUZA et al., 2007). Para cultivares de *Rosa hybrida* observou-se uma boa resposta de propagação dos explantes a 21°C (PATI et al., 2006). Temperaturas acima de 30°C não são favoráveis para as plantas e provocam a evaporação de água do meio, o deixando mais concentrado

podendo causar toxidez (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

#### d) Meio de cultura

Os meios de cultura fornecem às plantas substâncias para seu crescimento e desenvolvimento. Segundo Hartmann et al. (1990) o meio de enraizamento tem quatro finalidades: Manter o explante no lugar durante o período de formação da raiz; prover umidade para o explante; permitir trocas gasosas na base do explante e criar um ambiente escuro ou opaco, reduzindo a penetração de luz na base do explante. Um bom meio de enraizamento fornece porosidade suficiente para trocas gasosas, possui uma ótima capacidade de retenção de água e é livre de patógenos.

Durante a rizogênese o meio de enraizamento usado é diluído cerca de 50 a 75% em relação ao meio de multiplicação. O meio de enraizamento é suplementado com compostos orgânicos e minerais para suprir as necessidades energética, metabólica e estrutural das células da planta. Os componentes do meio são água, macro e micronutrientes, carboidratos, vitaminas, inositol, regulador de crescimento e ágar - para meio geleificado (CALDAS et al., 1998). O meio geleificado é usado com a finalidade de diminuir ou evitar a vitrificação dos explantes (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Rout et al. (1999) obtiveram para cultivares de *Rosa hybrida* uma melhor taxa de enraizamento em meio geleificado comparado ao meio líquido.

#### e) Nutrientes

Existem muitas formulações de meios de cultura em relação aos nutrientes. O meio de cultura MS foi desenvolvido em 1962 por Murashige e Skoog, sendo o mais difundido e utilizado na micropropagação. O meio MS é composto por nitrogênio, cálcio, magnésio, potássio, fósforo, enxofre, cobalto, cloro, ferro, boro, manganês, sódio, zinco, cobre e molibdênio (MURASHIGE e SKOOG, 1962).

Erig et al. (2004) observaram a ocorrência de enraizamento em marmeleiro cv. MC e Adams com apenas 75% da concentração original de nutrientes do meio MS. Magalhães Junior e Peters (1991) também obtiveram enraizamento com 75% da

concentração original do meio MS. Justificando a importância da diluição do meio de enraizamento e representando também uma redução de custos do processo.

O nitrogênio é fornecido para o explante na forma de amônio e nitrato, porém quando fornecido somente na forma de amônio pode causar toxidez (CALDAS et al., 1998). Woodward et al. (2006) observaram que o nitrato, como fonte principal de nitrogênio, produz maiores raízes em relação ao amônio. Explantes que apresentam deficiência em nitrogênio possuem um melhor enraizamento, no entanto deficiências severas são prejudiciais, pois afetam na síntese de aminoácidos e ácidos nucleicos (ASSIS e TEIXEIRA, 1998).

O boro é fornecido na forma de ácido bórico e possui efeito positivo no enraizamento de explantes, principalmente no crescimento de raízes, estando associado ao transporte de carboidratos, metabolismo de auxinas e fenóis (MONCOUSIN, 1991a).

O zinco é fornecido na forma de sulfato de zinco e favorece o aumento de AIA endógeno (ASSIS e TEIXEIRA, 1998). Para a obtenção de explantes com níveis nutricionais excelentes para enraizamento, devem-se escolher na planta-matriz ramos laterais, onde o crescimento rapidamente diminuiu e há um acúmulo de carboidratos (HARTMANN et al., 1990).

#### f) Carboidratos

A fotossíntese realizada pelos explantes durante a etapa de enraizamento é muito baixa. Devido ao requerimento de energia destinado para a formação de raízes é necessário fornecer carboidratos aos explantes (ASSIS e TEIXEIRA, 1998). Os carboidratos fornecem energia e contribuem no equilíbrio do potencial osmótico do meio de cultura (PATI et al., 2006). O carboidrato universalmente usado na micropropagação de células, tecidos ou órgãos é a sacarose (BHATIA et al., 2004).

As concentrações utilizadas de sacarose variam de acordo com a espécie. Calvete et al. (2002) observaram que em morango a biomassa do sistema radicular teve um aumento crescente até a concentração de 45g L<sup>-1</sup> de sacarose, concentrações acima desta provocaram uma diminuição na biomassa e a ausência do carboidrato não formou raiz. A concentração de sacarose recomendada para a

propagação *in vitro* de rosáceas como pêra, pêssego e maçã é 30g L<sup>-1</sup> (DANTAS et al., 2002; RADMANN et al., 2002 e OLIVEIRA et al., 2004). No entanto, alguns estudos ressaltam a importância da diminuição de concentração de sacarose durante a etapa de enraizamento, a fim de promover a nutrição autotrófica à planta (LEITE et al. 2000; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

### Fatores endógenos

#### a) Características do explante

Teoricamente qualquer tecido vegetal pode expressar totipotência, porém na micropropagação o ideal é a utilização de explantes jovens, retirados de uma planta matriz com crescimento ativo. A escolha do explante pode determinar o sucesso da micropropagação (ERIG e FORTES, 2002). Os explantes preferencialmente utilizados para a micropropagação são gemas e meristemas, pois possuem uma maior proporção de tecido meristemático (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). A etapa de enraizamento de uma planta é controlada e determinada geneticamente, variando entre espécies e cultivares, o que dificulta estabelecer protocolos gerais de enraizamento (ASSIS e TEIXEIRA, 1998). A idade da planta doadora de explantes influencia diretamente na capacidade de enraizamento, principalmente em espécies lenhosas. Material juvenil possui maior capacidade de enraizamento, porque possui um conteúdo maior de auxina e de co-fatores de enraizamento (MONCOUSIN, 1991b). Materiais considerados adultos podem sofrer um processo de rejuvenescimento com a finalidade de promover o enraizamento (ASSIS e TEIXEIRA, 1998). O tamanho dos explantes também é determinante. Não há formação de raízes em explantes muito pequenos, eles devem ser homogêneos e de qualidade, definindo assim o sucesso do enraizamento (DANTAS et al., 2002).

#### b) Efeito de gemas

É essencial que os explantes apresentem pelo menos uma gema para que ocorra a formação de raízes, pois a gema sintetiza substâncias que estimulam o enraizamento (HARTMANN et al., 1990). Segundo Couvillon (1988) as gemas podem ter um

pequeno ou grande efeito sobre o enraizamento, dependendo da espécie. No entanto, qualquer lesão feita na gema cessa o efeito que promove o enraizamento.

De acordo com Grattapaglia e Machado (1998) as gemas apicais, em sua maioria, apresentam maior capacidade de crescimento em relação às gemas axilares, especialmente em espécies herbáceas. Portanto, a posição em que a gema se encontra no ramo da planta-matriz é um fator importante para o enraizamento (NICOLOSO et al., 2001).

### c) Efeito de folhas

A presença de folhas no explante estimula a iniciação radicular. Porém, esse estímulo não pode ser atribuído à fotossíntese, já que o processo fotossintético é muito baixo durante o enraizamento, acreditando-se que as folhas produzem alguma substância que promove o enraizamento (COUVILLON, 1988). De acordo com Hartmann et al. (1990) explantes de cultivares de abacate com dificuldade para enraizar perdiam suas folhas, enquanto cultivares com fácil enraizamento mantinham suas folhas por até nove meses. Esse autor ressalta que além das folhas translocarem carboidratos, contribuindo para a formação de raízes, elas também são produtoras de substâncias denominadas *rizocalinas*, que potencializam auxinas, promovendo o enraizamento. Em 1946, Overbeek et al., já haviam observado que a combinação entre auxina e folhas era necessária para o enraizamento de hibisco branco. A presença de auxina e a ausência de folhas, bem como a presença de folhas e ausência de auxina apresentaram pouca formação de raízes. Entretanto, quando auxinas e folhas foram combinadas, promoveram um aumento significativo de enraizamento em hibisco branco.

### **Papel dos reguladores de crescimento no enraizamento**

Os hormônios vegetais são produzidos pela planta, atuando no crescimento e no desenvolvimento. Eles atuam em um local diferente daquele onde foram sintetizados. Já os reguladores de crescimento são substâncias sintéticas que produzem efeitos semelhantes aos efeitos dos hormônios. Os reguladores usados na micropropagação são as

giberelinas, as citocininas e as auxinas.

As giberelinas atuam no alongamento de caules. Em níveis altos as giberelinas inibem a formação de raízes adventícias, principalmente por interferirem na divisão celular (ASSIS e TEIXEIRA, 1998) e pela interferência deste regulador na síntese de proteínas (HARTMANN et al., 1990). De acordo com Grattapaglia e Machado (1998) a adição de giberelina ao meio é desnecessária e pode ser prejudicial. Contudo, Carvalho et al. (1999) observaram que a presença de giberelina no meio de cultura pode estimular a iniciação de zonas meristemáticas radiculares.

A adição de citocininas ao meio pode provocar inibição do enraizamento. Foi constatado que explantes de espécies com dificuldade para enraizar possuem um alto nível de citocinina endógena, enquanto espécies com facilidade para enraizar possuem baixos níveis (HARTMANN et al. 1990). Entretanto, algumas espécies respondem positivamente à citocinina exógena, quando em baixas concentrações, já que as citocininas estão envolvidas na divisão e diferenciação celular (ASSIS e TEIXEIRA, 1998).

As auxinas são os reguladores que mais influenciam o enraizamento. Os mais usados na micropropagação são o AIA (ácido indolacético), o ANA (ácido naftalenoacético) e o AIB (ácido indolbutírico). Picloram, 2,4-D (2,4 ácido diclorofenoxiacético) e ANOA (ácido beta-naftoxiacético) também podem ser usados para micropropagação, porém estimulam a formação de calo, não sendo utilizados em trabalhos de enraizamento (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Metivier et al. (2007) utilizaram 2,4-D no enraizamento de lenhosas, porém não houve formação de raízes.

Miranda et al. (2004) obtiveram um aumento no percentual de enraizamento e comprimento médio de raízes de porta-enxertos de pessegueiro utilizando AIB. Já Tofanelli et al. (2002) observaram um baixo potencial de enraizamento para cultivares de pessegueiro utilizando AIB, e mostraram que não somente a auxina tem influência sobre o enraizamento. Para cultivares de oliveira, Radmann et al. (2002) observaram melhor enraizamento com AIB. Assim como Centellas et al. (1999) que ao estudarem o

efeito das auxinas ANA, AIA e AIB no enraizamento *in vitro* de macieira observaram que o AIB proporcionou o melhor enraizamento. Embora o ANA tenha apresentado respostas semelhantes ao AIB neste trabalho, provocou a formação de calo. O AIA se degradou facilmente com a luz, tendo melhor resposta em altas concentrações. Pati et al. (2006) ressaltam que a resposta à diferentes auxinas no enraizamento dependem da cultivar ou da espécie.

Segundo Grattapaglia e Machado (1998) compostos fenólicos, como o floroglucinol, podem atuar como co-fatores de enraizamento para fruteiras de clima temperado. Porém Rufato et al. (2001) observaram que o floroglucinol não promoveu o enraizamento para estacas de marmeleiro das cv. Pineapple, Meliform, Alongado, Radaelli, Portugal, Inta e MC.

## CONCLUSÕES

A revisão relacionou a influência de vários fatores na micropropagação de rosáceas, demonstrando que a etapa de enraizamento é dependente da interação dos fatores endógenos e exógenos. A juvenalidade do explante, a presença de gemas e de folhas é essencial para todas as espécies. Porém, em relação aos fatores exógenos, a característica genética da planta é determinante. O fotoperíodo, a temperatura, a concentração de nutrientes e de carboidratos, os tipos e concentrações de reguladores de crescimento variam de acordo com cada espécie. A inconstância desses fatores inviabiliza o estabelecimento de um protocolo geral de enraizamento *in vitro* para todas as espécies da família das rosáceas. Uma área que deve ser melhor estudada é a interação destes fatores endógenos e exógenos. Na literatura cada espécie ou cultivar é estudada isoladamente e os fatores são analisados sem o objetivo de verificar a interação. A análise da interação dos fatores responsáveis pelo enraizamento *in vitro* poderá apresentar maior acuracidade na determinação do tratamento que melhor responde à formação radicular.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSIS, T.F.; 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, 1998. Parte II, p.261-296.

BERTAZZA, G.; BARALDI, R.; PREDIERI, S. Light effects on *in vitro* rooting of pear cultivars of different rhizogenic ability. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.41, p.139-143, jan. 1995.

BHATIA, P. et al. Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.78, p. 1-21, jul. 2004.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 1998. Parte II, p. 81-130.

CALVETE, E.O. et al. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 186-191, jun. 2002.

CARVALHO, G.R. et al. Efeitos do ácido giberélico e benzilaminopurina no desenvolvimento de plântulas de cafeeiro *in vitro*. **Revista da Universidade de Alfenas**, Alfenas, v.5, p. 185-187, 1999.

CENTELLAS, A.Q. et al. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.34, n.2, p.181-186, fev. 1999.

COUVILLON, G.A. Rooting responses to different treatments. **Acta Horticulturae**. Georgia, v.227, p.187-196, 1988.

DANTAS, A.C.M. et al. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de cultivares de *Pyrus spp.* **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.8, p. 19-23, jan/abr, 2002.

ERIG, A.C.; FORTES, G.R.L. Estabelecimento de pereira (*Pyrus spp.*) *in vitro* a partir de meristemas e gemas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.4, p. 577-582, 2002.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W.; BRAGA, E.J.B. Enraizamento *in vitro* de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Carrick. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.1, p. 275-277, 2004 .

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Estabelecimento *in vitro* de mirtilo a partir de segmentos nodais. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.6, n.1, p. 91-96, 2005a.



- ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p. 961-965, 2005b.
- FACHINELLO, C.A.; BIANCHI, V.J. Produção de mudas certificadas. In: FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 2005. p.207-220.
- GRATTAPLAGLIA, 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, 1998. Parte II, p.183-260.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, F.T. **Plant propagation: principles and practices**. 5.ed. New Jersey: [s.n.], 1990. 647p.
- HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; FACHINELLO, J.C. Infra-Estrutura para propagação de plantas frutíferas. In: FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 2005. cap.1, p.13-44.
- LANE, W. D.; IKETANI, H.; HAYASHI, T. Shoot regeneration from cultured leaves of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Dordrecht, v.54, p. 9-14, 1998.
- LEITE, G.B.; FINARDI, N.; FORTES, G.R.L. Efeitos de concentração de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de pereira OH X F971. **Ciência Agrotécnica**. Lavras, v.24, n.2, p.353-357, abr./jun., 2000
- MAGALHÃES JÚNIOR, A.M.; PETERS, J.A. Cultura *in vitro* de ameixeira: efeito do ácido indolbutírico, tipo de lâmpada e intensidade luminosa no enraizamento. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.3, n.1, p.57-61, 1991.
- METIVIER, P.S.R. et al. *In vitro* rooting of microshoots of *Cotinus coggygia* Mill, a woody ornamental plant. **In vitro cellular development biology plant**, New York, v.43, p. 119-123, 2007.
- MIRANDA, C.S. et al. Enxertia recíproca e AIB como fatores indutores do enraizamento de estaca lenhosas dos porta-enxertos de pessegueiro “Okinawa” e “Umezeiro”. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.28, n.4, p. 778-784, jul-ago. 2004.
- MONCOUSIN, C.H. Rooting of microcuttings: general aspects. **Acta Horticulturae**. Georgia, v.289, p. 301-308. 1991a.
- MONCOUSIN, C.H. Rooting of microcuttings: unmanipulated factors. **Acta Horticulturae**, Georgia, v.289, p. 319-327, 1991b.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, v.15, p. 473-497, 1962.
- NAKASU, B.H. Introdução. In: QUEZADA, A.C.; NAKASU, B.H.; HERTER, F.G. **Pêra produção**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p.9.
- NICOLOSO, F.T.; CASSOL, L.F.; FORTUNATO, R.P. Comprimento da estaca de ramo no enraizamento de Giseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.1, p. 57-60, 2001.
- OLIVEIRA, R.P.; NINO, A.F.P.; NICKEL, O. Limpeza de patógenos e propagação *in vitro* de cultivares de pereira. Pelotas: EMBRAPA, 2004.
- OVERBEEK, J.V.; SOLON, A.G.; GREGORY, L.E. An analysis of the function of the leaf in the process of root formation in cuttings. **American Journal of Botany**. Saint Louis, v.33, p.100-107, 1946.
- PATI, P.K. et al. *In vitro* propagation of rose: a review. **Biotechnology Advances**, Seoul, v. 24, p. 94-114, 2006.
- RADMANN, E.B., FACHINELLO, J.C., PETERS, J.A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.3, p. 624-628, dez. 2002.
- REETZ, E.R. et al. **Anuário brasileiro de fruticultura 2007 / ERNA**. Santa Cruz do Sul : [s.n.], 2007.
- ROCHA, P.S.G. da. et al. Qualidade da luz na micropropagação do porta enxerto de *Prunus* cv. MR .S.2/5. **Bioscience**, Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 32-40, jul/set. 2007.
- ROUT, G.R. et al. Biotechnology of the rose: a review of recent progress. **Scientia Horticulturae**. v.81, p. 201-228, 1999.
- RUFATO, L. et al. Enraizamento de estacas lenhosas de cultivares de marmeleiro (*Cydonia oblonga*) tratadas com floroglucinol. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v.23, n.3, dez. 2001.
- SCHUCH, M.W.; ERIG, A.C. Micropropagação de

plantas frutíferas. In: FACHINELLO, J.C., HOFFMANN, A., NACHTIGAL, J.C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 2005. p.155-174.

SOUZA, J. A. et al. Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira-M9 em função da vedação, sacarose e material de suporte no meio de cultura. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.8, n.2, p. 161-164, 2007.

TOFANELLI, M. B. D.; ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D. Enraizamento de estacas lenhosas de pessegueiro tratadas com ácido indol-butírico em diferentes concentrações e métodos de aplicação. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.8, n.3, p.265-266, set./dez., 2002.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; FERREIRA, A.T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 1998. Parte I, p.11-20.

VATER, G.; ARENA, M. *In vitro* propagation of *Rubus geoides*. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v.33, p. 277-281, 2005.

VIEIRA, R.L.; LEITE, G.B.; WAMSER, A.F. Efeito de substratos porosos no enraizamento *in vitro* do porta enxerto de macieira M-9 *Malus pumilla*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.29, n.1, abr. 2007.

WOODWARD, A.J.; BENNETT, I.J.; PUSSWONGE, S. The effect of nitrogen source and concentration, medium pH and buffering on *in vitro* shoot growth and rooting in *Eucalyptus marginata*. **Scientia Horticulturae**, Ohio, v.110, p. 208-213, 2006.