

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

**PROPAGAÇÃO *in vitro* E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE  
PORTA-ENXERTOS DE *Prunus* POR MARCADORES  
MICROSSATELITES (SSR)**

PAULO DE TARSO L. TEIXEIRA

FLORIANÓPOLIS – SC

2004

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

**PROPAGAÇÃO *in vitro* E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE  
PORTA-ENXERTOS DE *Prunus* POR MARCADORES  
MICROSSATELITES (SSR)**

PAULO DE TARSO L. TEIXEIRA

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

**Orientação:** Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva  
**Co-orientação:** Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra

FLORIANÓPOLIS – SC

2004

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, em especial à minha mãe, exemplo de dedicação e trabalho, pelo apoio não só nesta etapa, mas no decorrer de toda a minha vida. À minha irmã Gina, pela compreensão, convívio e apoio neste período.

Aos amigos Leonardo, Aparício e Chanan, pela amizade, pelo apoio e convivência durante esta etapa.

Ao professor Dr. Aparecido Lima da Silva, pela orientação, amizade, confiança e pelos conhecimentos transmitidos.

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

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, pela agradável convivência, amizade, disponibilidade e transmissão de conhecimentos.

À equipe do LMBV, em especial a colega Luciana Fogaça, e à equipe do LFDGV, em especial a colega Liziane Kadine, pela estrutura disponibilizada, pelo auxílio nos trabalhos práticos, pelo ótimo convívio durante esse período e principalmente pela grande amizade.

Aos colegas do curso de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, pelo excelente convívio, em especial: Luciana Fogaça, Josiane Arsego, Patrícia Flores, Douglas Steinmacher e Giampaolo Marchesini.

E, por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	página
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	v
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>RESUMO</b> .....	x
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>ESTABELECIMENTO E MULTIPLICAÇÃO <i>in vitro</i> DE SELEÇÕES DE PORTA-ENXERTO DE <i>Prunus</i></b> .....	7
Introdução.....	9
Material e Métodos.....	10
Resultados e Discussão.....	12
Conclusões.....	22
Referências Bibliográficas.....	23
<b>ENRAIZAMENTO <i>in vitro</i> DO PORTA-ENXERTO de <i>Prunus</i> ‘CARELLE’</b> .....	28
Introdução.....	29
Material e Métodos.....	30
Resultados e Discussão.....	31
Conclusões.....	37
Referências Bibliográficas.....	37
<b>CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PORTA-ENXERTOS DE <i>Prunus</i> POR MARCADORES MICROSSATELITES (SSR)</b> .....	41
Introdução.....	42
Material e Métodos.....	44
Resultados e Discussão.....	47
Conclusões.....	53
Referências Bibliográficas.....	53
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

A – número de alelos por loco;  
AIB – Ácido indolbutírico;  
ANA – Ácido naftalenoacético;  
BAP – 6-benzilaminopurina;  
CCA – Centro de Ciências Agrárias;  
cm – centímetro;  
CTAB - Cethyltrimethylammonium Bromide;  
CV – Coeficiente de Variação;  
Epagri – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S. A.;  
g – grama;  
°C – graus Celsius;  
GA3 – Ácido giberélico;  
He – heterozigossidade esperada;  
Ho – heterozigossidade observada;  
L – litro;  
Lepoivre – Meio de cultura de Quoirin et al. (1977);  
LFDGV – Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal;  
LMBV – Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal;  
MS – Meio de cultura de Murashige e Skoog (1962);  
mg – miligrama;  
µmol – micromol;  
mm – milímetro;  
mM – milimolar;  
NTSYS - Numerical taxonomic and multivariate analysis system - pc 2.0 package (Rohlf, 1997);  
P – percentagem de locos polimórficos;  
PCR - Polymerase Chain Reaction;  
pH – potencial hidrogeniônico;  
% - percentagem;

PIC - Polymorphism Information Content;

$R^2$  – coeficiente de determinação;

RAPD - Random Amplified Polymorphism DNA;

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism;

SC – Santa Catarina;

SSR – Simple Sequence Repeats;

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina;

UPGMA - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average.

## LISTA DE TABELAS

	página
1. Valores observados na porcentagem de sobrevivência e contaminação no estabelecimento <i>in vitro</i> do porta-enxerto de <i>Prunus</i> 'Carelle' após 25 dias de cultura <i>in vitro</i> . LMBV/CCA/UFSC, Florianópolis, 2004.....	12
2.Efeito de cinco concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L <sup>-1</sup> ) sobre o número de brotos por explante na multiplicação <i>in vitro</i> dos porta-enxertos de <i>Prunus</i> : seleções 'Carelle', VP 411 e VP 417. UFSC/CCA/LMBV, Florianópolis, 2003.....	15
3 Efeito de cinco concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L <sup>-1</sup> ) sobre o altura das brotações (mm) na multiplicação <i>in vitro</i> dos porta-enxertos de <i>Prunus</i> : seleções 'Carelle', VP 411 e VP 417. UFSC/CCA/LMBV, Florianópolis, 2003.....	18
4 Número médio de raízes por explante e porcentagem média de enraizamento do porta-enxerto de <i>Prunus</i> 'Carelle' cultivado 30 dias de cultura <i>in vitro</i> , (n=16), LMBV/CCA/UFSC, 2003.....	32
5 Identificação da origem, local de coleta e observações sobre as 11 seleções de porta-enxertos de <i>Prunus spp.</i> utilizados no estudo.....	45
6 Iniciadores microssatélites de pessegueiro [ <i>Prunus persica</i> (L) Batsch] selecionados para a análise das 11 seleções do porta-enxertos de <i>Prunus spp.</i> , UFSC/CCA/LFDGV, 2004.....	46
7 Parâmetros de variabilidade genética de 11 seleções de porta-enxertos de <i>Prunus</i> analisados com 12 iniciadores de microssatélites. UFSC/CCA/LFDGV, 2004.....	49
8 Similaridade genética observada entre 11 seleções de porta-enxertos de <i>Prunus spp.</i> utilizando marcadores de DNA obtidos com iniciadores de seqüências simples repetidas, UFSC/CCA/LFDGV, 2004.....	51

## LISTA DE FIGURAS

	<b>página</b>
1. Efeito de diferentes concentrações de BAP no número de brotos por explante dos porta-enxertos de <i>Prunus</i> ‘Carelle’, VP 411 e VP 417, após 21 dias em cultura <i>in vitro</i> em meio de lepoivre (Quoirin, et al., 1977), UFSC/CCA/LMBV, Florianópolis, 2003.....	<b>16</b>
2. Valores médios totais do efeito de diferentes concentrações de BAP no número de brotos por explante dos porta-enxertos de <i>Prunus ssp</i> , após 21 dias em cultura <i>in vitro</i> em meio de lepoivre (Quoirin, et al., 1977), UFSC/CCA/LMBV, Florianópolis, 2003.....	<b>17</b>
3. Efeito de diferentes concentrações de BAP na altura das brotações (mm) dos porta-enxertos de <i>Prunus</i> ‘Carelle’, VP 411 e VP 417, após 21 dias em cultura <i>in vitro</i> em meio de lepoivre (Quoirin, et al., 1977), UFSC/CCA/LMBV, Florianópolis, 2003.....	<b>19</b>
4. Valores médios totais do efeito de diferentes concentrações de BAP na altura das brotações (mm) dos porta-enxertos de <i>Prunus spp</i> , após 21 dias em cultura <i>in vitro</i> em meio de lepoivre (Quoirin, et al., 1977), UFSC/CCA/LMBV, Florianópolis, 2003.....	<b>21</b>
5.Aspectos morfogenéticos na multiplicação <i>in vitro</i> de pessegueiro seleção ‘Carell Brotações cultivadas em meio de Lepoivre suplementado com 0,5 mg.L <sup>-1</sup> de BAP <b>b</b> ). Segr nodais após 21 dias <i>in vitro</i> em meio Lepoivre suplementado com 0,5 mg.I BAP. <b>c</b> ).Dissecação da cultura anterior com detalhe das brotações. <b>d</b> ). Culturas depois de 2 em meio de Lepoivre <i>dupla-fase</i> e <b>e</b> ). Dissecação de segmentos nodais 25 dias no m Lepoivre <i>dupla-fase</i> LMBV/CCA/UFSC, 2003.....	<b>22</b>
6. Efeito do AIB no número de raízes por explante no enraizamento <i>in vitro</i> do porta-enxerto de <i>Prunus</i> ‘Carelle’, 30 dias de cultura <i>in vitro</i> , (n=16), LMBV/CCA/UFSC, 2003.....	<b>33</b>

7. Efeito do AIB na percentagem de enraizamento <i>in vitro</i> do porta-enxerto de <i>Prunus</i> ‘Carelle’, 30 dias de cultura <i>in vitro</i> , (n=16), LMBV/CCA/UFSC, 2003.....	34
8. Aspectos morfogénéticos no enraizamento <i>in vitro</i> do porta-enxerto de <i>Prunus</i> ‘Carelle’ submetido a diferentes concentrações de AIB, após 30 dias de cultura <i>in vitro</i> . LMBV/CCA/UFSC, Florianópolis-SC, 2003.....	36
9. Dendograma de 11 seleções de porta-enxertos de <i>Prunus spp</i> construído a partir dos produtos de amplificação com primers de SSR, usando o método de agrupamentos UPGMA, UFSC/CCA/LFDGV,2004.....	52

## RESUMO

A cultura do pessegueiro apresenta uma substancial importância na economia agrícola das regiões Sul e Sudeste, produzindo mais de 150 mil toneladas em uma área superior a 20 mil hectares. Para acompanhar o crescimento do mercado de frutas, cada vez mais surge a necessidade de pomares produtivos e frutos de qualidade. Desta maneira, a produção de mudas com controle genético-sanitário é essencial para obtenção de pomares uniformes e livres de patógenos. Neste contexto, as técnicas de cultura *in vitro* e de marcadores moleculares auxiliam na seleção varietal, propagação clonal, controle e certificação genético-sanitária. Este trabalho objetivou desenvolver metodologias para propagação *in vitro* de seleções do porta-enxerto de *Prunus* ‘Capdeboscq’, principalmente a seleção ‘Carelle’ e contribuir para caracterização genética de 11 seleções de porta-enxertos de *Prunus*. Foram usados como explantes gemas axilares e ápices caulinares, introduzidos em meio de cultura de Lepoivre suplementado com BAP ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ), que apresentaram 60,0% e 50,0% de sobrevivência, respectivamente. O porta-enxerto ‘Carelle’ foi comparado com outras seleções do porta-enxerto ‘Capdeboscq’ quanto a diferentes concentrações de BAP no potencial de multiplicação *in vitro*. Ocorreu efeito significativo da interação do genótipo X concentração de BAP no número de brotos por explante e tamanho das brotações. Concentrações de BAP maiores que  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  promoveram hiperhidricidade e redução no tamanho dos brotos. Na fase de enraizamento *in vitro* a presença de AIB foi determinante e a concentração AIB que apresentou o maior número de raízes por explante e maior percentagem de enraizamento foi de  $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ , com 1,75 raízes/explante e 75 % de enraizamento, porém resultou na formação de calos na base dos explantes. As seleções de porta-enxertos foram analisadas com 12 primers SSR, sendo que o grau de polimorfismo detectado pelos marcadores SSR confirma o potencial da técnica na análise de “fingerprinting” e sua utilidade na estimativa da variabilidade genética entre porta-enxertos de pessegueiro. A análise de agrupamento realizada com o método UPGMA produziu um dendograma que permitiu uma clara separação dos porta-enxertos em três grupos diferentes.

**Termos para indexação:** Pessequeiro; micropropagação; microssatélites, fingerprinting mudas; porta-enxerto

## ABSTRACT

The peach tree culture presents great agricultural economic importance in South and Southeast Brazilian regions, the total production overcomes 150 thousand tons in more than 20 thousand hectares cultivated area. The increasing growth of the market is related with the need of fruits with quality, competitive prices and high productivity. Thus, the production of planting with genetic and sanitary control is essential for the establishment of uniform orchards, free from pathogens and productive. Nowadays, the plant stock production is done by grafting the rootstocks obtained from seeds, causing problems as lack of genetic uniformity. Technique of *in vitro* culture and molecular markers may help in the varietal selection, the clonal propagation and the control of genetic-sanitary certification. This work aimed at to develop methodologies for *in vitro* propagation of *Prunus* rootstocks 'Carelli', selection of 'Capdeboscq' rootstocks and to contribute for genetic characterization of 11 *Prunus* rootstocks. It was used as explants lateral buds and vegetative buds established in culture medium of Lepoivre's supplemented with BAP cytokinins ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), that showed 60,00 and 50,00 % of survival, respectively. The 'Carelli' rootstock was compared with other selections of 'Capdeboscq' regarding different concentrations of BAP. There was significant effect of interaction BAP concentration X genotype for number of buds/explant and bud height. BAP concentrations higher than  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  resulted in a reduction in height of buds and an increment in the hyperhydricity of shoots. In the *in vitro* rooting phase, the presence of IBA was decisive and IBA concentration that showed the highest number of roots/explant and rate of rooting was  $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ , with 1,75 roots/explant and 75 % of rate rooting, but showed the formation of basal callus in the explant. The rootstocks were analyzed with 12 SSR primers. The degree of polymorphism detected by SSR markers confirmed the potential of technique in fingerprinting analysis and its usefulness in the estimate of the genetic variability among peach rootstocks. The cluster analysis made with UPGMA method produced a dendrogram allowing a clear separation of rootstocks in three different groups.

**Index terms:** peach tree, micropropagation, microsatellite, fingerprinting, seedlings, rootstock

## INTRODUÇÃO

A fruticultura nacional pode ser vista como alternativa de crescimento e desenvolvimento econômico, apresentando um enorme potencial ainda a ser explorado. Deve-se levar em consideração que essa atividade é geradora de renda e emprego, além de contribuir com um importante papel social, na distribuição de riquezas e de terra, permitindo a permanência do agricultor no campo e melhorando sua qualidade de vida (Gonçalves e Souza, 1998; Epagri, 2003 e IBRAF, 2004).

A cultura do pessegueiro, assim como toda a fruticultura de clima temperado, tem uma relevante importância econômica centrada nas regiões Sul e Sudeste, ocupando uma área superior a 22.000 hectares e uma produção de cerca de 200 mil toneladas nestas regiões (Epagri, 2003). Apesar do potencial dessas regiões, a produção nacional de frutas de caroço é insuficiente para abastecer o mercado interno. Assim, há necessidade da importação de frutos que acabam contribuindo negativamente para a balança comercial.

O pessegueiro (*Prunus persica* (L.) Batsch) é uma espécie nativa da China, sendo introduzido no Brasil em 1532 por Martin Afonso de Souza. No sul do Brasil, maior importância foi dada a esta fruteira a partir da década de 60. Nesta época, um agricultor notou que uma planta oriunda de caroços jogados no solo apresentava boa adaptação e produção. Essa planta foi multiplicada, recebendo o nome de 'Aldrighi', cultivar que deu grande impulso à expansão da cultura (Sachs e Campos, 1998).

A produção nacional tem como destaque o Estado do Rio Grande do Sul como o maior produtor, com uma área de 13,8 mil hectares e uma produção superior a 105 mil toneladas de frutos, seguido pelos Estados de Santa Catarina, São Paulo e Paraná. Em Santa Catarina, a safra de 2001/02, apresentou uma área de 3,7 mil hectares e uma produção de 36,6 mil toneladas de frutos (Epagri, 2003).

Dentre os principais problemas encontrados na produção de plantas frutíferas de caroço estão a falta de mudas com qualidade genética-sanitária comprovada e uso de porta-enxertos clonal (Fachinello, 2000). As mudas comerciais de Prunáceas, especialmente o pessegueiro, são obtidas através da enxertia sobre porta-enxertos originários de sementes de qualquer cultivar de maturação tardia, que apresente boa adaptação. Essas sementes são oriundas da indústria de conserva, onde geralmente ocorrem misturas varietais e segregação

varietal, causando a desuniformidade genética e conseqüentemente a desuniformidade de plantas e morte precoce (Fachinello, 2000).

Nesse contexto, produção de mudas certificadas é de fundamental importância para a obtenção de pomares uniformes, livres de patógenos e com alta produtividade.

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

Portanto, são necessárias novas alternativas de porta-enxertos para substituir os utilizados atualmente, que sejam de origem clonal, permitindo a captura e fixação de ganhos genéticos (Fachinello, 2000; Rogalski, 2002).

Trabalhos de seleção de novas cultivares de porta-enxertos e métodos de propagação clonal são fundamentais para a produção de mudas, alta produtividade, qualidade de frutos e principalmente a sustentabilidade das Prunáceas (Fachinello, 2000; Silva et al., 2003 e Rogalski et al., 2003).

Neste trabalho os materiais vegetais denominados de seleções, são na verdade plantas provenientes de 'seedlings' de pessegueiro originários de empresas de conserva de Pelotas (RS) e utilizados como porta-enxertos para produção de mudas de prunáceas, sendo estes possivelmente da cultivar 'Capdeboscq'.

A seleção 'Carelle,' alvo principal deste trabalho, foi selecionado através de uma coleta de um rebento de porta-enxerto de uma planta de menor porte e frutos de melhor qualidade em relação as demais plantas de um pomar de ameixeira da cultivar América, no município de Videira/SC. Este material é originário da região de Farroupilha/RS, sendo pessegueiro do tipo conserva, presumivelmente oriundo de um caroço de 'Capdeboscq'.

Assim, diferentes seleções de porta-enxertos, tais como: 'Carelle', 'VP 411' e 'VP 417' apresentam grande interesses para estudos de propagação *in vitro* e produção de mudas, devido suas possíveis características de induzir baixo vigor (ananizante) em ameixeira, o que permite a implantação de pomares adensados facilitando o manejo e aumentando a produtividade da área.

Segundo, Salim (1998), pode ocorrer ação do porta-enxerto sobre o enxerto alterando o comportamento deste em relação ao seu desenvolvimento, produtividade, época de maturação, qualidade, resistência a baixas temperaturas e a patógenos.

Além disso, a utilização de marcadores moleculares com o intuito de caracterizar e estimar divergências genéticas cada vez mais tem se mostrado apropriado para a análise de genótipos de diferentes espécies. Nesse contexto os marcadores moleculares microssatélites ou SSR (simple sequence repeats) possuem grande aplicabilidade. Atualmente, vários primers microssatélites têm sido relatados para pessegueiro (Cipriani et al., 1999; Sosinski et al., 2000; Testolin et al., 2000; Aranza et al., 2001; Dierlewanger et al., 2002) e utilizados na caracterização e discriminação de genótipos de prunáceas (Testolin et al., 2000; Sosinski et al., 2000; Hormaza, 2001; Aranza et al., 2001; Hormaza, 2002; Wunsch e Hormaza, 2004)

A tecnologia de cultura *in vitro* aliada ao o uso de genótipos adequados vem demonstrando grande importância nas pesquisas básicas e aplicadas, principalmente em relação à genética, fisiologia, fitossanidade e propagação de espécies do gênero *Prunus* (Pérez-Tornero et al., 1999; Pérez-Tornero e Burgos, 2000; Silva et al., 2003; Rogalski et al., 2003)

Entretanto, as diferenças genotípicas manifestam-se no comportamento *in vitro*, fazendo-se necessário determinar as condições ideais de propagação *in vitro* para cada genótipo. Assim, procura-se conhecer as concentrações e os reguladores de crescimento (Leontiev-Orlov et al., 2000; Pérez-Tornero et al., 2000; Silva et al., 2003; Rogalski et al., 2003 ab), intervalo e número de subculturas (Marino et al., 1985; Rogalski, 2002), potencial genético de multiplicação e enraizamento *in vitro* (Pérez-Tornero et al., 1999; Pérez-Tornero e Burgos, 2000; Rogalski, 2002; Silva et al., 2003; Rogalski et al., 2003 ab) e aclimatização (Preece e Sutter, 1991; Rogalski et al., 2003 c).

No contexto deste trabalho o objetivo foi estabelecer, avaliar e otimizar metodologias para propagação *in vitro*, em suas diferentes fases: estabelecimento, multiplicação, enraizamento de porta-enxertos de *Prunus*, principalmente para a seleção 'Carelle' e identificar geneticamente diferentes seleções de porta-enxertos de *Prunus* utilizando para isso, marcadores moleculares do tipo microssatélites desenvolvidos para *Prunus persica* (L.) Batsch.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARANZA, J.M.; GARCIA-MAS, J.C.; ARÚS, P. Development and variability analyses of microsatellites markers in peach. **Plant Breeding**, v. 121, p. 87-92, 2001.

CIPRIANI, G.; LOT, G.; HUANG, W.G.; MARRAZZO, M.T.; PETERLUNGER, E.; TESTOLIN, R. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*. **Theor. Appl. Genet.**, v. 99, p. 65-72, 1999.

DIERLANGUER, E.; COSSON, P.; TAVAUD, M.; ARANZA, M.J.; POIZAT, C.; ZANETTO A.; ARÚS, P.; LAIGRED, F. Development microsatellites markers in peach [*Prunus persica* (L) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). **Theor. Appl. Genet.**, v. 105, p. 127-138, 2002.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA S.A. Epagri. **Frutas de Clima Temperado**: situação da safra 2001/2002, Previsão da safra 2002/2003. Videira: Epagri, 2003. 21p.

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

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; FORTES, G.R. de L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Pelotas/RS: Editora UFPel, 1995.178p.

FINARDI, N.L. Métodos de propagação e descrição de porta-enxertos, In: MEDEIROS, C.A B.; RASEIRA, M.C.B. **A cultura do pessegueiro**. 1ed. Pelotas: Embrapa-CPACT, 1998, volume único, p.100-129.

GONÇALVES, J. S.; SOUZA, S. A. M. Porque o Chile exporta mais frutas frescas que o Brasil ? **Revista Informações Econômicas**, v. 28, p. 54-57, 1998.

HORMAZA, J.I. Identification of apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using microsatellite and RAPD markers. **Acta Hort.** V. 546, p. 209-215, 2001.

HORMAZA, J.I. Molecular characterization and similarity relationship among (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. **Theor. Appl. Genet.**, v. 104, p. 321-328, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. IBRAF. **Boletim IBRAF nº 30**. capturado em 26 jul. 2004. Online. Disponível na Internet <http://www.ibraf.org.br>.

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

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

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

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

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

PREECE, J.E.; SUTTER, E.G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field, In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Eds.), *Micropropagation. Technology and Application*, Kluwer, Dordrecht, 1991, p. 71-93.

ROGALSKI, M. Propagação *in vitro* de Porta-enxertos de *Prunus*: cultura de embriões, estabelecimento, multiplicação, enraizamento e aclimatização. Florianópolis, 2002, 93 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

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

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

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

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

SALIM, S. **Tratado de Fruticultura**. Piracicaba/SP: FEALQ, 1998. 760p.

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

SOSINSKI, B., GUANNAPARAVU; M. HAGER, L.D.; BECK, L.E.; KING, G.J.; RYDER, C.D.; RAJAPAKSE, S.; BAIRD, W.V.; BALLARD, R.E.; ABBOTT, A.G. Characterization of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]. **Theoretical and Applied Genetics**, Belfast, v. 101, p. 421-428, 2000.

TESTOLIN, R.; MARAZZO, T.; CIPRIANI, G.; QUARTA, R.; VERDE, I.; DETTORI, M.T.; PANCALDI, M.; SANSAVINI, S. Microsatellite DNA in peach [*Prunus persica* (L) Batsch] and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. **Genome**, v. 43, p. 512-520, 2000.

WÜNSCH, A. and HORMAZA, J.I. Molecular evaluation of genetic diversity and S-allele composition of local Spanish sweet cherry (*Prunus avium* L) cultivars. **Genetic Resources and Crop Evolution**, n. 51, p. 635-641, 2004.

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

**RESUMO** – Na fruticultura tecnificada, a qualidade genética e sanitária das mudas é de fundamental importância para o sucesso da atividade. Para a cultura do pessegueiro, a micropropagação tem permitido a produção clonal de plantas matrizes e mudas de qualidade genética-sanitária comprovada. Este trabalho teve como objetivo avaliar a taxa de sobrevivência de explantes na fase de estabelecimento, bem como avaliar o potencial de multiplicação *in vitro* dos porta-enxertos ‘Carelle’, VP 411 e VP 417 sob efeito de diferentes concentrações de citocininas 6-benzilaminopurina (BAP). O material vegetal foi introduzido *in vitro* empregando-se ápices caulinares e gemas laterais como explantes em meio de cultura de Lepoivre suplementado com BAP ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Verificou-se que a percentagem média de sobrevivência para o porta-enxerto seleção ‘Carelle’ foi de 50 % para ápices caulinares e 60 % para gemas laterais. Os ápices caulinares apresentaram 20 % e as gemas laterais 35 % de contaminação. Segmentos nodais com 0,5 cm de comprimento foram inoculados em meio de cultura de Lepoivre, suplementados com 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e  $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP. As avaliações para número de brotos por explante, altura média das brotações foram realizadas após 21 dias de cultura *in vitro*. Os resultados mostraram que as seleções ‘Carelle’, VP 411 e VP 417 apresentaram diferenças significativas entre si, quando submetidos a diferentes concentrações de BAP, para a variável número de brotos por explante. A concentração de BAP que promoveu os melhores resultados foi de  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  com 3,40; 6,25; 6,19 brotações/explante para os porta-enxertos ‘Carelle’, ‘VP 411’ e ‘VP 417’, respectivamente. A altura média dos brotos foi significativamente afetada pela concentração de BAP, pelo genótipo e pela interação concentração de BAP x genótipo. O genótipo que se mostrou superior foi o VP 417, que apresentou brotos com 23,42 e 21,20 (mm), quando submetidos às concentrações de 0,5 e  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP, respectivamente. Concentrações de BAP superiores a  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP reduziram o comprimento das brotações e promoveram a hiperhidricidade.

**Termos para indexação:** Pessegueiro; micropropagação; mudas; porta-enxerto

## ***In vitro* ESTABLISHMENT AND MULTIPLICATION OF SEEDLING *Prunus* ROOTSTOCKS**

**ABSTRACT** – In the modern fruit production, genetic and sanitary quality is very important to the success of the activity. For the peach tree culture, the micropropagation techniques allow the clonal production of plants with high genetic quality. The present study aimed at to evaluate the explant survival rate during *in vitro* establishment period, as well evaluate the potential of *in vitro* multiplication of ‘Carelle’, 411 VP and 417 VP rootstocks under the effect of different concentrations of 6-benzylaminepurine (BAP). Nodal segments of 0,5 cm length were inoculated in Lepoivre’s culture medium, supplemented with BAP 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 and 4,0 mg.L<sup>-1</sup>. The estimation of the numbers of buds/explant, and height of the shoots were done after 21 days in culture. The plant material was introduced *in vitro* using as explants apices and lateral buds, and Lepoivres’ medium supplemented with BAP (0,5 mg.L<sup>-1</sup>). The mean values of explant survival for the rootstocks ‘Carelle’ were 50 % e 60 % for apices and lateral buds, respectively. Cultures of apices showed 20 % and lateral buds 35 % of contamination. The results showed that *Prunus* spp. rootstocks ‘Carelle’, 411 VP and 417 VP have presented significantly difference amongst each other when submitted to different concentrations of BAP to the variable number of buds/explant. The BAP concentration that promoted the best results was 1,0 mg.L<sup>-1</sup> with 3,40; 6,25 and 6,19 buds/explant to ‘Carelle’, 411 VP and 417 VP rootstocks, respectively. The height of the shoots was significantly affected by the BAP concentration, the genotype and the interation BAP concentration X genotype. The 417 VP genotype showed with 23,42 and 21,20 mm, when submitted to BAP concentrations of 0,5 and 1,0 mg.L<sup>-1</sup>, respectively. BAP concentrations superior than 1,0 mg. L<sup>-1</sup> reduced the length of the shoots and promoted hiperhydricity.

**Index terms:** peach tree, micropropagation, seedlings, rootstock

## **INTRODUÇÃO**

A piscicultura nacional concentra sua produção principalmente nas regiões Sul e Sudeste, estimando-se uma produção superior a 220 mil toneladas de frutos. O Estado do

Rio Grande do Sul é o maior produtor brasileiro, com uma produção de 105 mil toneladas de frutos e uma área de 13,8 mil hectares. O Estado de Santa Catarina apresenta atualmente uma área de 3,7 mil hectares e uma produção de superior a 36 mil toneladas de frutos ((Sachs e Campos, 1998; Epagri, 2003).

Na busca de um sistema de produção mais tecnicada visando à alta produtividade dos pomares e a produção de frutos de qualidade, a muda torna-se um insumo de grande importância, principalmente na implantação de pomares uniformes (Fachinello, 2000).

Atualmente, no Brasil, os porta-enxertos são obtidos de sementes remanescentes da indústria de conserva, proporcionando a desuniformidade genética das mudas, devido as possíveis misturas varietais, e também a conseqüente desuniformidade dos pomares (Fachinello, 2000).

Quanto a propagação vegetativa por estaquia, as principais limitações são a baixa capacidade de enraizamento da maioria das cultivares de pessegueiro (Chalfun e Hoffmann, 1997) e o efeito do genótipo, dependendo das cultivares utilizadas (Fachinello et al., 1994; Rufato e Kersten, 2000).

Portanto, existe a necessidade de novas alternativas de porta-enxertos para substituir os utilizados atualmente, que sejam de origem clonal, permitindo a captura e fixação de ganhos genéticos (Fachinello, 2000). Assim, as seleções da cultivar Capdeboscq, ‘Carelle’ (Epagri), ‘VP411’ e ‘VP417’ (Vitroplanta – Biotecnologia Ltda) tem apresentados grande interesse para a propagação *in vitro* e produção de mudas, devido suas possíveis características de induzir baixo vigor (ananizante) em ameixeira, o que poderá permitir a implantação de pomares adensados, facilitando no manejo e aumentando a produtividade da área.

Nos últimos anos, vários trabalhos vêm sendo realizados com diversas espécies do gênero *Prunus*, principalmente para porta-enxertos, na tentativa de otimização de protocolos regenerativos *in vitro*. Dentre estes trabalhos destacam-se os de Hammerschlag et al. (1982), Radice et al. (1999), Perez-Tornero e Burgos (2000) e Silva et al. (2003 ab) que apresentaram sucesso no estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Prunus*.

Entretanto, outros autores demonstraram dificuldades ao estabelecer e multiplicar *in vitro* diferentes porta-enxertos de *Prunus*, como Pérez-Tornero et al. (1999), Rodrigues et al. (1999) e Silveira et al. (2001). Para estes autores, a micropropagação de espécies do

gênero *Prunus* apresentam alguns problemas, tais como oxidação e contaminação dos explantes durante a fase de estabelecimento e também uma menor taxa de desenvolvimento durante a fase de multiplicação.

Entretanto, as diferenças genotípicas manifestam-se no comportamento *in vitro*, tornando-se necessário determinar as condições ideais de propagação *in vitro* para cada genótipo. Neste sentido, é imperativo conhecer as concentrações e reguladores de crescimento (Leontiev-Orlov et al., 2000; Pérez-Tornero et al., 2000), intervalo e número de subculturas (Marino et al., 1985), potencial genético de multiplicação.

Na multiplicação *in vitro* do gênero *Prunus*, o tipo e a concentração de citocinina são fatores determinantes relacionados com a taxa de multiplicação (Pérez-Tornero et al., 2000), alongamento de brotações (Leontiev-Orlov et al., 2000) e hiperhidricidade (Ambrozic-Turk et al., 1991).

O BAP tem sido a citocinina mais eficaz para promover a quebra de dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares em diversas espécies, inclusive as do gênero *Prunus* (Leontiev-Orlov et al., 2000 a e b, Pérez-Tornero e Burgos 2000; Pérez-Tornero et al., 2000; Channuntapipat et al., 2003; Silva et al., 2003 b; Rogalski et al., 2003).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver metodologias de estabelecimento e multiplicação *in vitro*, visando a propagação clonal de seleções de porta-enxertos de *Prunus* e avaliar o efeito de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* dos porta-enxertos de *Prunus spp*: seleções ‘Carelle’, ‘VP 411’ e ‘VP 417’.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

Os porta-enxertos ‘Carelle’, ‘VP 411’ e ‘VP 417’ (*Prunus persica* (L.) Batsch) são seleções do porta-enxerto ‘Capdeboscq’, o primeiro é originário da Estação Experimental de Videira (Epagri).e os outros são oriundos da empresa Vitroplanta Biotecnologia Vegetal de Videira/SC. Plantas matrizes destas seleções são mantidas com controle sanitário e nutricional em casa de vegetação no Departamento de Fitotecnia do CCA/UFSC.

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

Os experimentos de cultura *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal do Departamento de Fitotecnia/CCA/UFSC. Das plantas matrizes foram coletados brotos em crescimento ativo, que foram seccionados em segmentos de três a quatro gemas e posteriormente submetidos ao seguinte processo de desinfestação: lavagem em água e detergente (10 gotas.L<sup>-1</sup> de Tween 20), e posteriormente, sob agitação por 1 minuto em etanol 70%, 15 minutos em hipoclorito de sódio (1,25%) e, finalmente, em câmara de fluxo laminar, os explantes foram submetidos a três lavagens com água destilada autoclavada. Os ápices caulinares e gemas laterais foram inoculados em tubos de ensaio (25x150mm) contendo 15 mL de meio de cultura composto de sais de Lepoivre (Quoirin et al., 1977) e vitaminas MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 20g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 7g.L<sup>-1</sup> de ágar e 0,5mg.L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP).

Após 25 dias, para a seleção 'Carelle' os explantes de ápices caulinares e gemas laterais foram avaliados quanto ao índice de sobrevivência e contaminação.

### **Multiplicação *in vitro***

O material vegetal foi multiplicado através de segmentos nodais de 4-5 gemas (1-2cm), desprovidos dos ápices caulinares. Foram testadas diferentes concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup>). Após um período de cultura *in vitro* de 21 a 25 dias foram avaliados o número de brotos por explante e a altura média das brotações (mm).

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

Para as diferentes fases, o pH do meio de cultura foi ajustado para 5,2-5,3 e todos os componentes do meio foram adicionados antes da autoclavagem a 121°C durante 15 minutos. O material vegetal foi mantido em câmara de crescimento com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40-45μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, fornecidas pôr lâmpadas fluorescentes brancas frias.

### Analise Estatística

O delineamento experimental utilizado é o inteiramente casualizado (IC), com cinco explantes por repetição e cinco repetições por tratamento. Os dados foram transformados para raiz quadrada ( $x+1$ ) e submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e ao teste de separação de médias SNK (5%), de acordo com Sokal e Rohlf (1995).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as diferentes fontes de explantes no estabelecimento *in vitro* da seleção de *Prunus* 'Carelle', foi observada uma percentagem de sobrevivência de 60,0% para gemas axilares e de 50,0% para ápices caulinares (Tabela 1). Segundo Hammerschlag et al. (1982), estes resultados podem ser considerados satisfatórios, pois, estão dentro de uma ampla faixa de sobrevivência (27% a 93%) observada por estes autores no estabelecimento *in vitro* de 11 cultivares de pessegueiro. Silva et al. (2003 a) encontrou taxas médias de sobrevivência de 62,9 % para gemas axilares e de 58,8 % para ápices caulinares, trabalhando com três porta-enxertos de *Prunus*.

**TABELA 1.** Valores observados na porcentagem de sobrevivência e contaminação no estabelecimento *in vitro* da seleção de *Prunus* 'Carelle' após 25 dias de cultura *in vitro*. LMBV/CCA/UFSC, Florianópolis, 2004.

Total Ápices caulinares	Total Gemas laterais	Sobrevivência (%)		Contaminação (%)	
		Ápices caulinares	Gemas Laterais	Ápices Caulinares	Gemas Laterais
8	42	(4,0) 50,00	(25) 60,00	(1,0) 25,00	(15) 35,00

As taxas de contaminação observadas foram de 35% e 20% para gemas axilares e ápices caulinares, respectivamente (Tabela 1). Estes resultados foram semelhantes aos observados por Silva et al. (2003) na contaminação de gemas axilares e ápices caulinares de diferentes porta-enxertos de *Prunus*. Já Rodrigues et al. (1999) obtiveram taxas de contaminação superiores variando de 50% a 95,8% no estabelecimento *in vitro* de seis

porta-enxertos de *Prunus*. Estes autores concordam que há um efeito significativo do genótipo no estabelecimento *in vitro* do gênero *Prunus* e que gemas laterais apresentam em geral, uma maior taxa de contaminação quando comparados aos ápices caulinares. Hammerschlag et al. (1982), obtiveram uma maior taxa de contaminação (70%) em gemas dormentes que em brotos em crescimento ativo (27%) no estabelecimento *in vitro* de pessegueiro.

Após o estabelecimento *in vitro*, verificou-se que o material vegetal apresentou contaminação nas duas primeiras subculturas. Demonstrando, possivelmente uma contaminação microbial endógena mesmo sendo explantes originários de plantas matrizes, mantidas em casa de vegetação, com controle sanitário e nutricional.

Segundo Kamoun et al. (1998) a contaminação microbial endógena é um dos problemas responsáveis pelas perdas nas diferentes etapas do processo de micropropagação, até chegar ao produto final (mudas em casa de vegetação ou viveiros comerciais). Estes autores observaram e identificaram, através de testes bioquímicos, contaminações endógenas em mudas de *Prunus cerasus* assepticamente micropropagadas, as quais podem persistir em forma latente e se manifestar em qualquer etapa da micropropagação. Pérez-Tornero et al. (1999) relatam ser quase impossível estabelecer material vegetal *in vitro* de damasco (*Prunus armeniaca* L.) via cultura de gemas axilares, principalmente pela alta contaminação, não somente depois de iniciada a cultura (83% - média na introdução de brotos), mas também pelos contaminantes internos de muitos explantes que permaneceram latentes inicialmente.

O mesmo protocolo também foi utilizado com a adição de oxitetraciclina (terramicina) + estreptomicina (Agri-Micina® - Pfizer) na concentração de 0,3 g.L por uma hora. As gemas axilares introduzidas *in vitro* com a presença de estreptomicina apresentaram uma taxa de contaminação de 10 %, mas não sobreviveram ao tratamento e também foi observado a oxidação dos tecidos.

O meio de cultura de Lepoivre (Quoirin et al., 1977), que apresenta menor concentração total de Nitrogênio, pela redução dos íons  $\text{NH}_4^+$ , ausência de íons  $\text{Cl}^-$  e aumento de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , mostra resultados promissores para a cultura *in vitro* de espécies do gênero *Prunus*, proporcionando um aumento na taxa de multiplicação *in vitro* e reduzindo a

hiperhidricidade dos brotos ( Pérez-Tornero et al., 1999; Pérez-Tornero e Burgos, 2000;; Silveira et al., 2002; Silva et al., 2003 a Rodrigues et al., 2003).

Para Pérez-Tornero e Burgos (2000) o meio de Lepoivre (Quoirin e Lepoivre, 1977) foi o mais produtivo para quatro cultivares de damasco (*Prunus armeniaca* L.), propiciando um incremento no número de brotos produzidos pelo explante inicial. Silva et al. (2003 a) revelou em ensaios preliminares com porta-enxertos de *Prunus* que a formulação salina de Lepoivre (Quoirin et al., 1977) mostrou-se superior ao meio MS (Murashige e Skoog, 1962) no estabelecimento e multiplicação *in vitro*.

Silveira et al. (2002) obtiveram resultados semelhantes na multiplicação *in vitro* dos porta-enxertos de *Prunus* GxN<sub>22</sub> e Mr.S 2/5 utilizando meio de cultura MS com  $\frac{3}{4}$  da concentração de sais e adicionado de 0,7 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e para o porta-enxerto ‘Mirabolano’ adicionado de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP.

Rodrigues et al. (2003) observaram menor porcentagem de oxidação de segmentos nodais de nove cultivares de *Prunus spp.* utilizando a concentração de sais de Villegas (Villegas et al., 1992) no meio de cultura. Para estes autores o meio MS com  $\frac{3}{4}$  da concentração de sais foi superior na taxa de multiplicação *in vitro* desta cultivares.

O intervalo de subcultura utilizado variou entre 21 e 28 dias. A referencia de base foi outros autores que estudaram esta variável em espécies do gênero *Prunus* (Grant e Hammatt, 1999; Silva et al., 2003 a). Grant e Hammatt (1999) obtiveram bons resultados na multiplicação *in vitro* de cerejeira (*Prunus avium* L.) cultivar F12/1, com um intervalo de subcultura de 28 dias. Para Silva et al. (2003 b) o número de brotos e a porcentagem de explantes hiperhídricos foram significativamente afetados pelo intervalo, número de subculturas e pela interação intervalo X número de subculturas, sendo que os melhores resultados foram encontrados nos intervalos de 14 e 21 dias.

O número de brotos por explantes foi afetado significativamente pela concentração de BAP, pelo genótipo e pela interação concentração de BAP x genótipo. Os genótipos VP 411 e VP 417 apresentaram maior número de brotações que a seleção ‘Carelle’ e não apresentaram diferenças significativas entre si. (Tabela 1). De um modo geral, o tratamento na ausência de 6-benzilaminopurina apresentou um menor número de brotações (Tabela 1).

Para o porta-enxerto ‘Carelle’ os tratamentos com BAP adicionado no meio de cultura não apresentaram diferenças significativas entre si (Tabela 2). Para o genótipo VP

417 a concentração de BAP que proporcionou o maior número de brotos por explante foi de 1,0 mg.L<sup>-1</sup>, com 6,25 brotações. Já o genótipo VP 411 regenerou 7,06 brotações na concentração de 4,0 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 2).

A Figura 1 apresenta para o intervalo de 0 a 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, as distribuições dos pontos médios, suas respectivas equações e os coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>). Segundo as projeções infere-se que o maior número de brotos por explante seriam obtidos nas concentrações 1,5; 4,0 e 1,3 mg.L<sup>-1</sup> de BAP para os genótipos 'Carelle', VP 411 e VP 417, respectivamente.

A concentração de BAP que apresentou melhor desempenho foi de 4,0 mg.L<sup>-1</sup> com 5,4 brotações, seguida pela concentração de 1,0 mg.L<sup>-1</sup> com 5,28 brotações (Figura 2).

**TABELA 2.** Efeito de cinco concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup>) sobre o número de brotos por explante na multiplicação *in vitro* dos porta-enxertos de *Prunus*: seleções 'Carelle', VP 411 e VP 417. UFSC/CCA/LMBV, Florianópolis, 2003.

Genótipo	Número de brotos por explante					Média
	BAP (mg.L <sup>-1</sup> )					
	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0	
Carelli	1,00 a	3,40 abc	3,30 abc	3,40 abc	3,30 abc	2,88 A
VP411	1,06 a	2,88 ab	6,19 cd	5,88 bcd	7,06 d	4,61 B
VP417	1,44 a	4,56 bcd	6,25 cd	3,94 abc	5,75 bcd	4,39 B
<b>Média</b>	1,17 a	3,58 b	5,28 c	4,37 bc	5,40 c	
CV (%)	17,28					
F (Genótipo)	11,32					
F (BAP)	21,02					
F (Genótipo X BAP)	2,58					

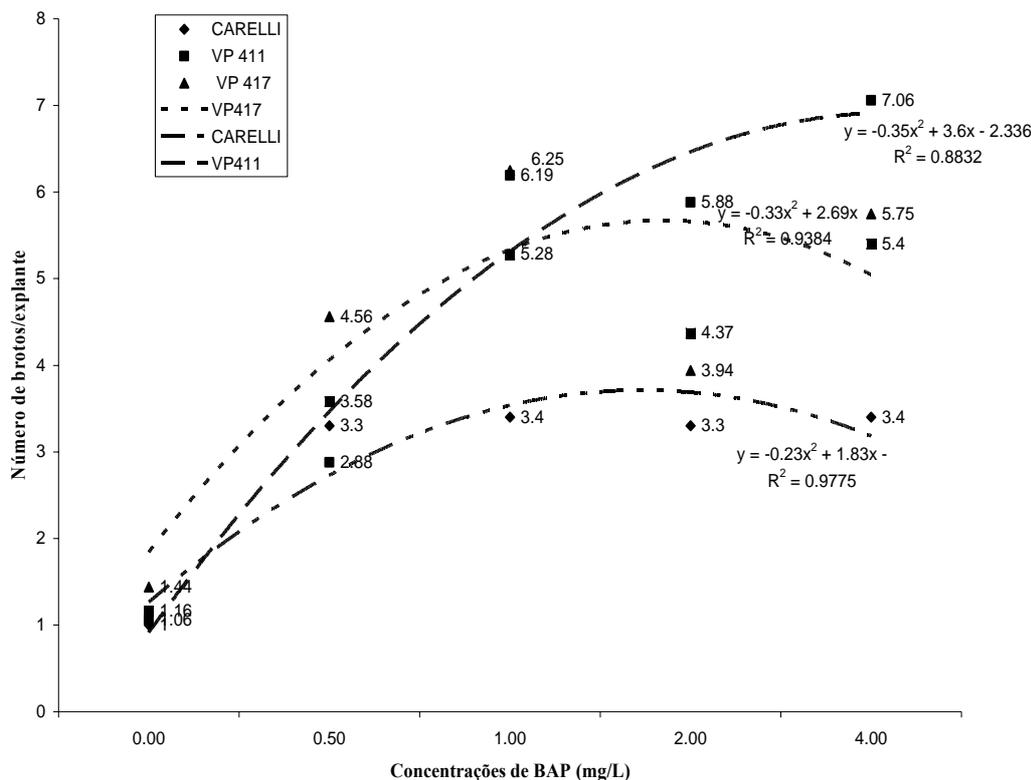
Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha (fator nível de BAP) e interação entre fatores e maiúsculas na coluna (genótipo) não diferem significativamente pelo teste SNK (5%). P≤0,05

Esses resultados foram semelhantes aos citados na literatura para as diferentes espécies do gênero *Prunus* (Harada e Murai, 1996; Pérez-Tornero et al., 2000; Silveira et al. 2001; Channuntapipat et al., 2003). Variedades de *Prunus domestica* e *Prunus cerasus*

resultaram em taxas de multiplicação *in vitro* de 9,8 a 22,6 brotos por explante (Leontiev-Orlov et al., 2000b).

Silveira et al. (2001) obtiveram os melhores resultados para cinco porta-enxertos de *Prunus*, com concentrações de 0,5 e 0,7 mg.L<sup>-1</sup>, com um número médio de brotos por explante de 1,7. Channuntapipat et al. (2003) trabalhando com um porta-enxerto híbrido de *Prunus* encontrou um ótimo número médio de brotos por explante (36,0) com a concentração de BAP de 5 µM (1,125 mg.L<sup>-1</sup>). Silva et al. (2003 a) observaram maior número de brotos (25,9) na concentração de BAP de 1,5 mg.L<sup>-1</sup>, trabalhando com o pessegueiro ‘Capdeboscq’. Arena e Caso (1992), obtiveram uma variação de 5,0 a 37,0 brotos por explantes utilizando concentrações de 0,5 a 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, na multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de *prunus*.

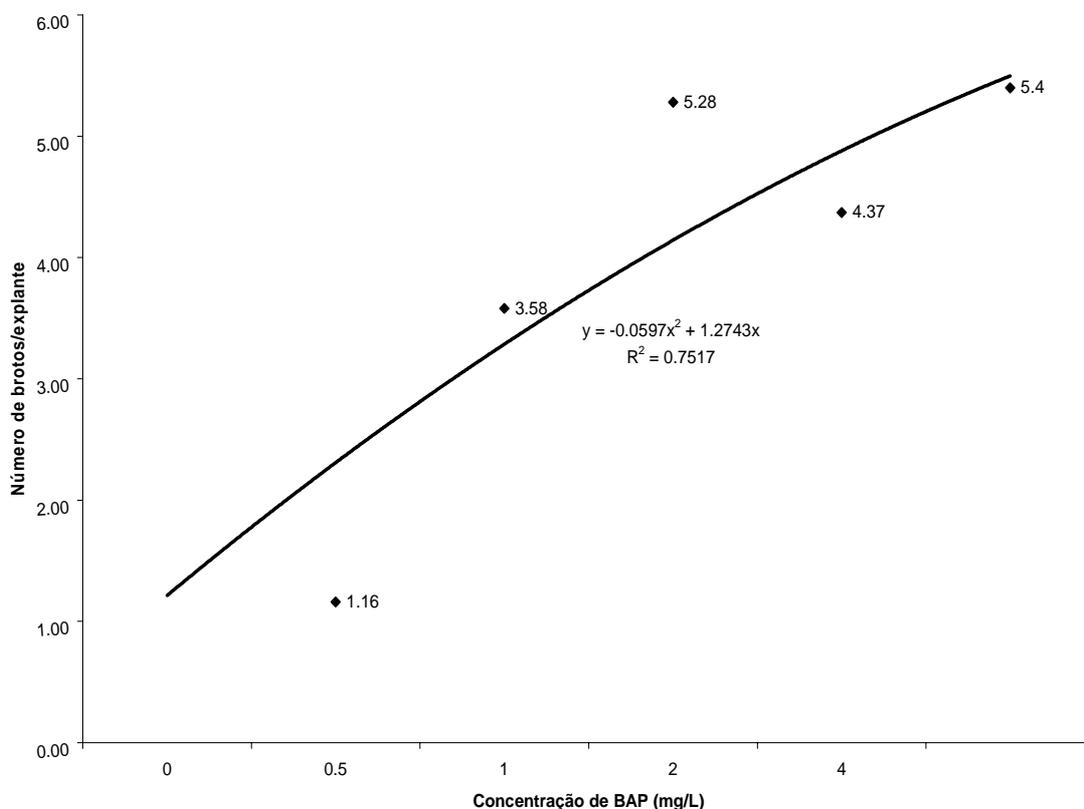
Silva et al. (2003 a) não observaram diferença significativa entre os porta-enxertos ‘Capdeboscq’ e VP 411, quando avaliaram a multiplicação *in vitro* destes, quando submetidos a concentração de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP.



**FIGURA 1.** Efeito de diferentes concentrações de BAP no número de brotos por explante dos porta-enxertos de *Prunus*: seleções ‘Carelle’, VP 411 e VP 417, após 21 dias em cultura *in vitro* em meio de lepoivre (Quoirin et al., 1977). UFSC/CCA/LMBV, Florianópolis, 2003.

Rogalski et al. (2003) trabalhando com ameixeira Santa Rosa, também não encontraram diferenças significativas para a variável número de brotos por explante, testando diferentes concentrações de BAP. Entretanto, o maior número de brotos por explante (3,6) encontrado foi na concentração de 2,0 mg.L<sup>-1</sup>.

As concentrações de 2,0 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP apresentaram hiperhidricidade dos explantes. Isso pode ser explicado, já que a hiperhidricidade é um desequilíbrio fisiológico frequentemente relacionado a altas concentrações de citocininas, menor intensidade luminosa, composição salina do meio de cultura, alta umidade relativa na atmosfera do frasco, acúmulo de gases na atmosfera dos frascos, entre outros (Quoirin et al., 1977; Arena e Caso, 1992; Debergh et al., 1992; Pérez-Tornero et al., 2001; Silva et al., 2003 a).



**FIGURA 2.** Valores médios totais do efeito de diferentes concentrações de BAP no número de brotos por explante dos porta-enxertos de *Prunus ssp*, após 21 dias em cultura *in vitro* em meio de lepoivre (Quoirin et al., 1977).

A altura média dos brotos foi significativamente afetada pela concentração de BAP, pelo genótipo e pela interação concentração de BAP x genótipo. O genótipo superior foi o VP 417, que apresentou brotos com 23,75 e 21,25 (mm), quando submetidos às concentrações de 0,5 e 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, respectivamente (Tabela 3).

O genótipo ‘Carelle’ apresentou a maior altura das brotações na ausência de BAP no meio de cultura, 16,00 mm, e as concentrações que proporcionaram o maior tamanho de brotações foram de 0,5 e 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, com 10,96 e 10,80 mm, respectivamente (Figura 3). Já o genótipo VP 411 apresentou os menores tamanhos de brotações e a concentração de BAP com melhor desempenho foi de 0,5 mg.L<sup>-1</sup>, com 15,00 mm (Figura 3).

**TABELA 3.** Efeito de cinco concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup>) sobre o altura das brotações (mm) na multiplicação *in vitro* dos porta-enxertos de *Prunus*: seleções 'Carelle', VP 411 e VP 417. UFSC/CCA/LMBV, Florianópolis, 2003.

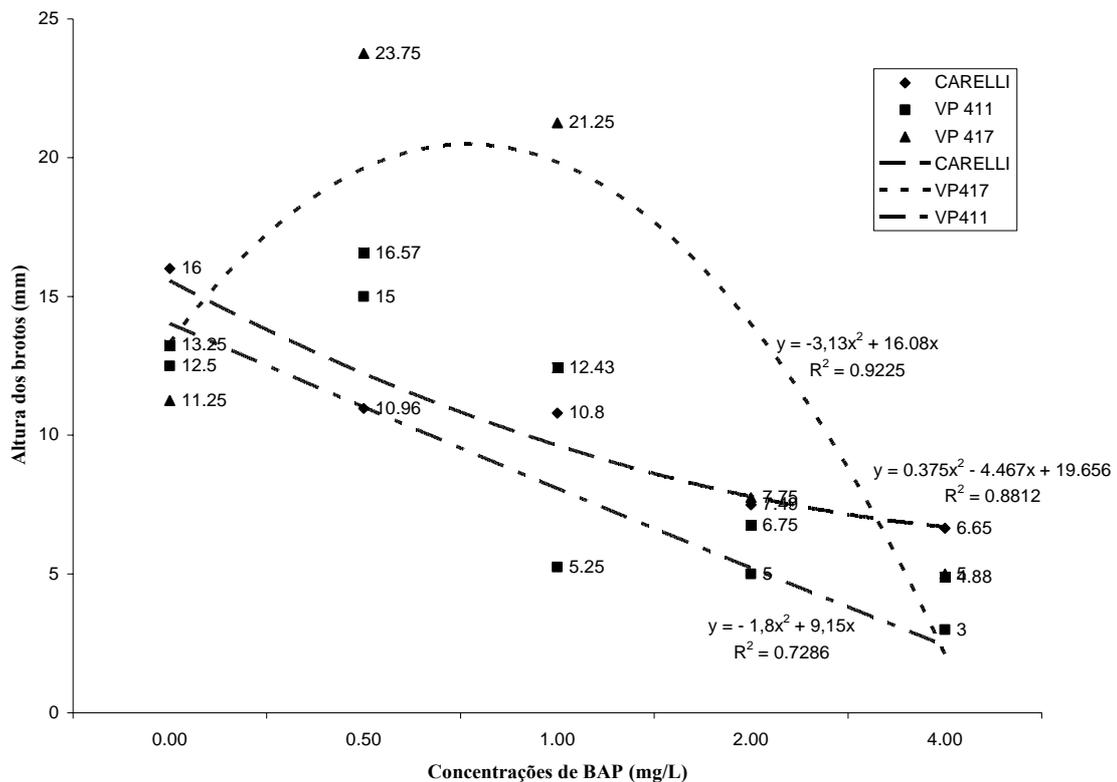
Genótipo	Altura das brotações (mm)					Média
	BAP (mg.L <sup>-1</sup> )					
	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0	
Carelli	16,00 d	10,96 bcd	10,80 bcd	7,49 abc	6,65 abc	10,38 B
VP411	12,50 cd	15,00 d	5,25 ab	5,00 ab	3,00 a	8,15 A
VP417	11,25 bcd	23,75 e	21,25 e	7,75 abc	5,00 ab	13,80 C
<b>Média</b>	<b>13,25 b</b>	<b>16,57 c</b>	<b>12,43 b</b>	<b>6,74 a</b>	<b>4,88 a</b>	
CV (%)						8,40
F (Genótipo)						14,74
F (BAP)						27,16
F (Genótipo X BAP)						7,89

Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha (fator nível de BAP) e interação entre fatores e maiúsculas na coluna (genótipo) não diferem significativamente pelo teste SNK (5%). \*P≤0,05

A concentração de BAP que apresentou melhor desempenho foi de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> (16,57 mm), seguida pela ausência de BAP no meio de cultura e a concentração de 1,0 mg.L<sup>-1</sup>, com brotos de 13,25 e 12,43mm, respectivamente (Figura 4).

Rogalski et al. (2003) observaram o mesmo comportamento com a ameixeira Santa Rosa, encontrando uma correlação negativa entre altura de brotos e concentração de BAP, revelando que o aumento nos níveis de BAP reduziu o crescimento dos brotos, e a concentração ótima testada foi de 0,5 mg.L<sup>-1</sup>, proporcionando uma altura de 6,0 mm por broto. Silva et al. (2003 b) também observaram este comportamento para porta-enxerto de *Prunus spp* 'Capdeboscq', pois um incremento nas concentrações de citocininas proporcionou uma redução no tamanho médio das brotações.

Resultados semelhantes também foram encontrados por Leontiev-Orlov et al. (2000 ab), Pérez-Tornero e Burgos (2000) e Pérez-Tornero et al. (2000), que observaram que concentrações crescentes de citocininas inibiram o alongamento das brotações em Prunáceas.



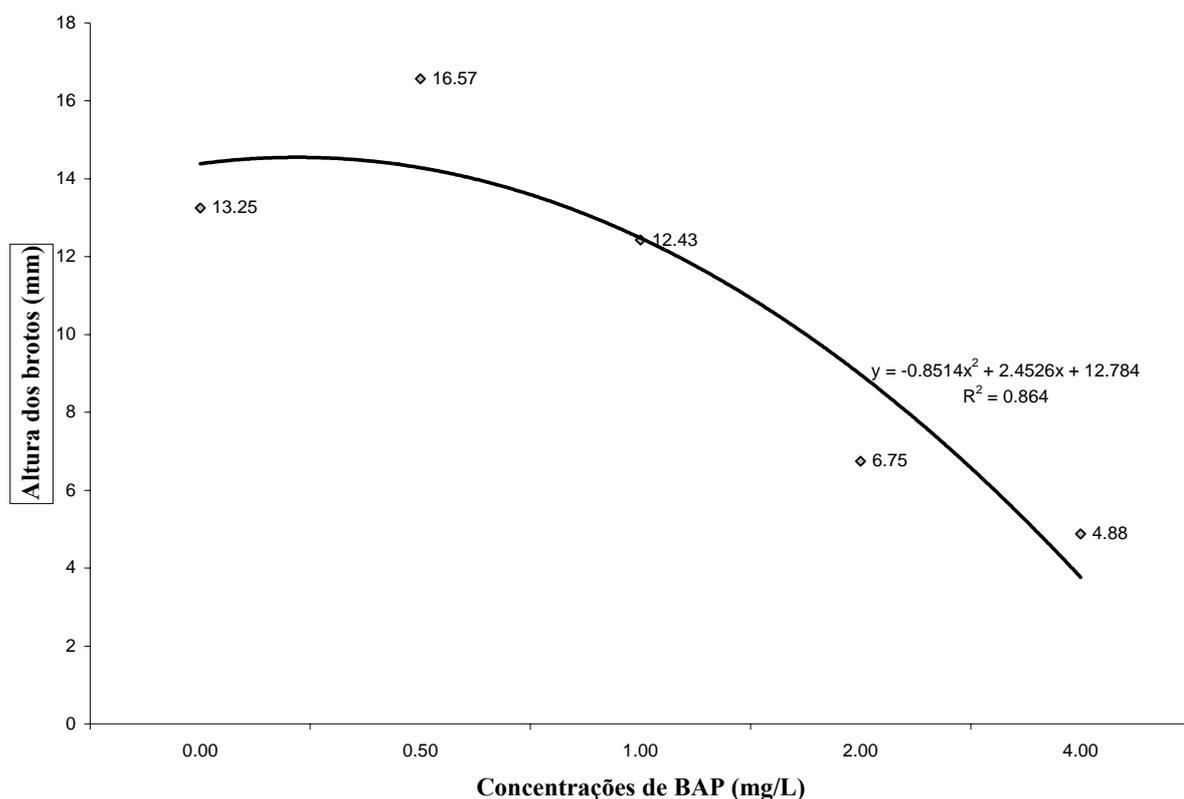
**FIGURA 3.** Efeito de diferentes concentrações de BAP na altura das brotações (mm) dos porta- enxertos de *Prunus* ‘Carelle’, VP 411 e VP 417, após 21 dias em cultura *in vitro* em meio de lepoivre (Quoirin et al., 1977).

Para Leontiev-Orlov et al. (2000 a) concentrações superiores a 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP inibiram o tamanho das brotações em ameixeira. Harada e Murai (1996), em *Prunus mume*, observaram que o tamanho médio das brotações não foi influenciado pela concentração de BAP, quando utilizada até 1,125 mg.L<sup>-1</sup>.

Silva et al. (2003 a) observaram maior número de brotos superior a 20 mm com a concentração de 0,8 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Para Arena e Caso (1992) o maior numero de brotos superior a 15 mm foi observado na concentração de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Channuntapipat et al. (2003) trabalhando com um porta-enxerto híbrido de pêsego X amêndoa observou o maior número de brotos superior a 10 mm com 3 μM de BAP (0,675 mg.L<sup>-1</sup>).

Silva et al. (2003 a), também observaram diferenças significativas entre os porta-enxertos ‘Capdeboscq’ e VP 411, quando avaliaram a altura média dos brotos. Sendo esta

variável determinada principalmente pela concentração e o tipo de regulador de crescimento (Harada e Murai, 1996; Leontiev-Orlov et al., 2000; Rogalski, 2002), meios de cultura (Arena e Caso, 1992; Pérez-Tornero e Burgos, 2000; Pérez-Tornero et al., 2000) e genótipo (Arena e Caso, 1992; Pérez-Tornero e Burgos, 2000; Silva et al., 2003 a).



**FIGURA 4.** Valores médios totais do efeito de diferentes concentrações de BAP na altura das brotações (mm) dos porta-enxertos de *Prunus spp*, após 21 dias em cultura *in vitro* em meio Lepoivre

Altas concentrações de BAP podem induzir à redução de alongamentos de brotos e hiperhidricidade em prunáceas (Ambrozic-Turk et al., 1991; Arena e Caso 1992; Pérez-Tornero e Burgos 2000).



**FIGURA 5.** Aspectos morfológicos na multiplicação *in vitro* de pessegueiro seleção ‘Carelle’. **a)** Brotações cultivadas em meio de Lepoivre suplementado com  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP **b).** Segmentos nodais após 21 dias *in vitro* em meio Lepoivre suplementado com  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP. **c).** Dissecação da cultura anterior com detalhe das brotações. **d).** Culturas depois de 25 dias em meio de Lepoivre *dupla-fase* e **e).** Dissecação de segmentos nodais 25 dias no meio de Lepoivre *dupla-fase* LMBV/CCA/UFSC, 2003.

## CONCLUSÕES

A introdução *in vitro* da seleção 'Carelle' foi possível através de ápices caulinares e gemas laterais. O meio de cultura de Lepoivre mostrou-se eficaz para as fases de estabelecimento e multiplicação *in vitro*.

A multiplicação *in vitro* das seleções do porta-enxerto 'Capdeboscq' mostrou resultados promissores visando a produção de mudas. As concentrações de BAP mais eficientes para a multiplicação *in vitro* destes porta-enxertos foram de 0,5 e 1,0 mg.L<sup>-1</sup>. O genótipo VP 411 foi superior para a variável número de brotos por explante e o VP 417 foi superior para a altura média dos brotos.

As concentrações maiores que 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP inibiram o alongamento das brotações e promoveram a hiperhidricidade, assim houve necessidade de se utilizar uma etapa intermediária entre a fase de multiplicação e enraizamento *in vitro*, para o alongamento das brotações, através do meio de cultura *dupla-fase*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBROZIC-TURK, B.; SMOLE, J. SIFTAR, A. Micropropagation of a plum ecotype (*Prunus domestica* L.) as rootstock for apricots, **Acta Horticulturae**, Leuven, v.300, p.111-114, 1991.

ARENA, M.E.; CASO, O.H. Factores Que Afectan La Multiplicación *In Vitro* De Los Brotes De Portainjertos De *Prunus*, **PHYTON**, Buenos Aires, V.53, P.29-38, 1992.

CHALFUN, N.N.G.; HOFFMANN, A. Propagação do pessegueiro e da ameixeira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, p. 23-29, 1997.

CHANNUNTAIPAT, C.; SEDGLEY, M.; COLLINS, G. Micropropagation of almond cultivars Nonpareil and Ne Plus Ultra and the Hybrid rootstock Titan X Nemaguard. **Scientia Horticulturae**. Amsterdam. v.98, p.473-484, 2003

DEBERGH,P.; AITKEN-CHRISTIE, J.; COHEN, D.; GROUT, B.; VON-ARNOLD, S.; ZIMMERMAN, R.; ZIV, M. Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.30, p.135-140, 1992.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA S.A. Epagri. **Frutas de Clima Temperado: situação da safra 2001/2002, Previsão da sagra 2002/2003**. Videira: Epagri, 2003. 21p.

FACHINELLO, J.C. Problemática Das Mudas De Plantas Frutíferas De Caróço. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE FRUTAS DE CAROÇO: PÊSSEGOS, NECTARINAS E AMEIXAS, 1., 2000, Porto Alegre. **Anais...** P.25-40.

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; FORTES, G.R. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Pelotas/RS: Editora UFPel, 1994. 179p.

FINARDI, N.L. Métodos de propagação e descrição de porta-enxertos, In: MEDEIROS, C.A B.; RASEIRA, M.C.B. **A cultura do pessegueiro**. 1ed. Pelotas: Embrapa-CPACT, 1998, volume único, p.100-129.

GUERRA, M. P; ROGALSKI, M.e SILVA, A.L Embryo culture and *in vitro* clonal multiplication of *Prunus* 'Capdeboscq' rootstock, **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 141-148, 2003.

GRANT, N.J.; HAMMATT, N. Increased root and shoot production during micropropagation of cherry and apple rootstocks: effect of subculture frequency. **Tree Physiology**, Victoria, v. 63, p. 899-903, 1999.

HAMMERSCHLAG, F. Factors influencing *in vitro* multiplication and rooting of the plum rootstock Myrobalan (*Prunus cerastifera* Ehrh.), **Journal of America Society for Horticulturae Science**, Alexandria, v. 107, p. 44-47, 1982.

HARADA, H.; MURAI, Y. Micropropagation of *Prunus mume*, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.46, p.265-267, 1996.

KAMOUN R.; LEPOIVRE P.; BOXUS P. Evidence for the occurrence of endophytic prokaryotic contaminants in micropropagated plantlets of *Prunus Cerasus* cv. 'Montmorency', **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 52, p. 57-59, 1998.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SILVA, A.L.; ROGALSKI, M.; GUERRA, M. P. Effects of different cytokinins *in vitro* multiplication of *Prunus* ‘Capdeboscq’ rootstocks. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 149-156, 2003.

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

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

VILLEGAS, M. A.; BECERRIL, A. E. R.; AGUILAR, M. A. C. Respuesta *in vitro* de três cultivares de fresa a niveles de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , In: CONGRESSO NACIONAL DE FITOGENETICA, Nº, 1992, Chiapas.

## ENRAIZAMENTO *in vitro* DO PORTA-ENXERTO DE *Prunus* SELEÇÃO 'CARELLE'

**RESUMO** A rizogênese é uma fase crítica da micropropagação, pois determina o sucesso na sobrevivência das plantas na etapa de aclimatização. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de AIB no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* 'Carelle', seleção do porta-enxerto 'Capdeboscq'. A multiplicação e alongamento das brotações foram realizadas em meio de cultura dupla-fase constituído de sais e vitaminas de Lepoivre suplementado com sacarose (20 g.L<sup>-1</sup>), ágar (7 g.L<sup>-1</sup>) e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP), na fase sólida. Para o enraizamento *in vitro*, brotos com 2 a 3 cm foram introduzidos em meio de Lepoivre suplementado com ácido indolbutírico (AIB) nas concentrações de 0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup>. Os resultados demonstram que a percentagem enraizamento *in vitro* e o número de raízes por explante foram afetados significativamente pelas concentrações de auxinas (AIB). A concentração de AIB que apresentou o maior número de raízes por explante e maior percentagem de enraizamento foi de 4,0 mg.L<sup>-1</sup>, com 1,75 raízes por explante e 75 % de enraizamento.

**Termos para indexação:** Pessegueiro, micropropagação, rizogênese, mudas.

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

**ABSTRACT** – The rooting phase is critical for the micropropagation as it establishes the successful in the survival of the plants in the stage of acclimatization. The objective of this work was to evaluate the effect of different IBA concentrations in the *in vitro* rooting of 'Carelle' *Prunus* rootstocks, selection of 'Capdeboscq' rootstock. The multiplication of the shoots were done in double phase cultivate medium consisted of Lepoivre's salts and vitamins (Quoirin et al., 1997) supplemented with sucrose (20g.L<sup>-1</sup>), agar (7 g.L<sup>-1</sup>) and 0,5 mg.L<sup>-1</sup> of 6-benzylaminepurine (BAP) in the solid phase. Concerning the *in vitro* rooting, the buds with 2 to 3 cm length were reoculated in Lepoivre's medium (Quoirin et al., 1997) supplemented with indolbutyric acid (IBA) at the concentrations 0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup>. The *in vitro* rooting and the number of roots by explant were significantly affected by the IBA concentrations. The presence of auxins was fundamental for the *in vitro* rooting

and the IBA concentration most efficient was 4,0 mg.L<sup>-1</sup>, with 1,75 roots/explants and 75% of rooting.

**Index terms:** Peach tree, *in vitro* micropropagation, rhizogenesis, seedling

## INTRODUÇÃO

A cultura do pessegueiro ocupa, no Brasil, uma área superior a 22 mil hectares, produzindo anualmente mais de 200 mil toneladas (Sachs e Campos, 1998; Epagri, 2003).

A produção de mudas de prunáceas é realizada pela enxertia sobre porta-enxertos obtidos de sementes provenientes da indústria de conserva. Assim, devido à falta de controle ocorrem misturas varietais, originando desuniformidade de plantas, morte precoce e falta de identidade genética (Fachinello, 2000).

Para a fruticultura comercial, a qualidade genética e sanitária das mudas é um fator determinante para o aumento da produtividade e o sucesso da atividade. Então, a definição de porta-enxertos torna-se prioridade, principalmente para a produção de mudas livres de doenças e pragas, com variedades adaptadas as condições de solo e clima, de vigor definido e crescimento uniforme. Sendo fundamental o desenvolvimento de novos porta-enxertos para substituir os tradicionais, de preferência de origem clonal, permitindo a captura e fixação de ganhos genéticos (Rufato e Kersten, 2000; Rufato et al., 2000; Fachinello, 2000).

Assim, a seleção 'Carelle', possivelmente originária da cultivar 'Capdeboscq' e selecionada na região de Videira (SC), apresenta um grande interesse para estudos de propagação *in vitro* e produção de mudas para avaliações posteriores, devido suas possíveis características de induzir baixo vigor (ananizante) em ameixeira, o que permite a implantação de pomares adensados, facilitando no manejo do pomar e aumentando a produtividade da área.

A micropropagação em prunáceas é uma técnica empregada para a produção clonal de porta-enxertos e também auxilia a indexação de matrizes (Hammerschlag, 1982; Campana et al., 1994; Pérez-Tornero et al., 2000; Rogalski et al., 2003).

Na micropropagação, a rizogênese é uma fase crítica, pois determina o sucesso na aclimatização, fase em que ocorre a transição das condições *in vitro* para *ex vitro*. A indução e a iniciação de raízes adventícias são afetadas pela interação de vários fatores: o genótipo (Caboni et al., 1997); o meio de cultura (Skirvin et al., 1982) e os reguladores de crescimento, dentre os quais as auxinas são determinantes para o sucesso no enraizamento *in vitro* (Magalhães e Peters, 1991; Caboni e Damiano, 1993; Campana et al., 1994; Pérez-Tornero et al., 2000; Pruski et al., 2000; Channuntapipat et al., 2003; Rogalski et al., 2003).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus*: seleção ‘Carelle’.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material vegetal**

O porta-enxerto ‘Carelle’ (*Prunus persica* (L.) Batcsh) é uma seleção do porta-enxerto ‘Capdeboscq’ obtida na região de Videira-SC. Este foi estabelecido e multiplicado *in vitro* através de plantas-matrizes mantidas em casa de vegetação no Departamento de Fitotecnia, CCA/UFSC. Os experimentos de cultura *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, Departamento de Fitotecnia, CCA/UFSC.

### **Multiplicação e alongamento *in vitro***

Para a multiplicação e alongamento das brotações utilizou-se o meio de cultura *dupla-fase*, (geleificado-líquido) constituído de sais e vitaminas de Lepoivre (Quoirin et al., 1977) suplementado com 20 g.L<sup>-1</sup> sacarose, 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP), na fase sólida. Após 15 dias de cultura *in vitro*, foi adicionado o meio líquido de composição igual o citado anteriormente, porém isento de BAP. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,2-5,3 antes da autoclavagem a 121°C durante 15 minutos.

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

Após 25 dias de cultura *in vitro*, brotos com 2 a 3 cm foram introduzidos em meio de enraizamento contendo sais e vitaminas de Lepoivre (Quoirin et al., 1977) suplementado com sacarose (20 g.L<sup>-1</sup>), ágar (7 g.L<sup>-1</sup>) e ácido indolbutírico (AIB) nas concentrações de 0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup>. Durante um período inicial de 10 dias as culturas foram mantidas no escuro como técnica de indução ao enraizamento.

Após 30 dias de cultura, o experimento foi avaliado quanto à percentagem de enraizamento e ao número de raízes por explante.

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

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40-45µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, fornecidas por lâmpadas fluorescentes brancas frias, sendo estas as mesmas condições de incubação utilizadas na fase de multiplicação.

### **Análise estatística**

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com quatro explantes por repetição e quatro repetições por tratamento. Os dados referentes aos efeitos das diferentes concentrações de reguladores de crescimento foram transformados para raiz quadrada (x+1) e submetidos à análise da variância (ANOVA) e ao teste de separação de médias SNK (5%) de acordo com Sokal e Rohlf (1995).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A porcentagem de enraizamento e o número de raízes por explantes foram afetados significativamente pelas concentrações de auxinas (AIB). A porcentagem de enraizamento variou de 0 a 73 % e o número de raízes por explante de 0 a 1,75 (Tabela 1).

A variável número de raízes por explantes apresentou um comportamento linear proporcional as doses de AIB testadas (Figura 1). A concentração de auxina que apresentou maior número de raízes por explante foi de 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de AIB (1,75 raízes), que diferiu significativamente das demais concentrações de AIB. As concentrações de 1,0; 2,0 e 3,0

mg.L<sup>-1</sup> de AIB não diferiram significativamente entre si, mas apresentaram um número de raízes significativamente maior que a concentração de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIB.

O tratamento sem inclusão de auxina no meio de cultura não proporcionou a formação do sistema radicular nos explantes (Tabela 1).

Estes resultados sobre a micropropagação e enraizamento de *Prunus* são semelhantes aos observados por diferentes autores, entre eles, Magalhães e Peters (1991), Pruski et al. (2000), Rogalski et al. (2003) e Channuntapipat et al. (2003). Magalhães e Peters (1991) trabalhando com a ameixeira Santa Rosa (*Prunus salicina*) observaram que as concentrações mais baixas de AIB proporcionaram um menor número de raízes/brotos. Para Rogalski et al. (2003), a concentração ótima de AIB foi de 2,0 mg.L<sup>-1</sup> com a formação de 5,4 raízes por explante. Channuntapipat et al. (2003) observaram os melhores resultados para o número de raízes por explante nas concentrações entre 2,4 e 7,3 µM de AIB (2,4 – 3,4 raízes/explante) para um porta-enxerto híbrido de *Prunus*. Entretanto, as concentrações superiores proporcionaram o declínio do crescimento radicular.

**TABELA 1.** Número médio de raízes por explante e porcentagem média de enraizamento do porta-enxerto de *Prunus* seleção ‘Carelle’ avaliado 30 dias de cultura *in vitro*, (n=16). LMBV/CCA/UFSC, 2003.

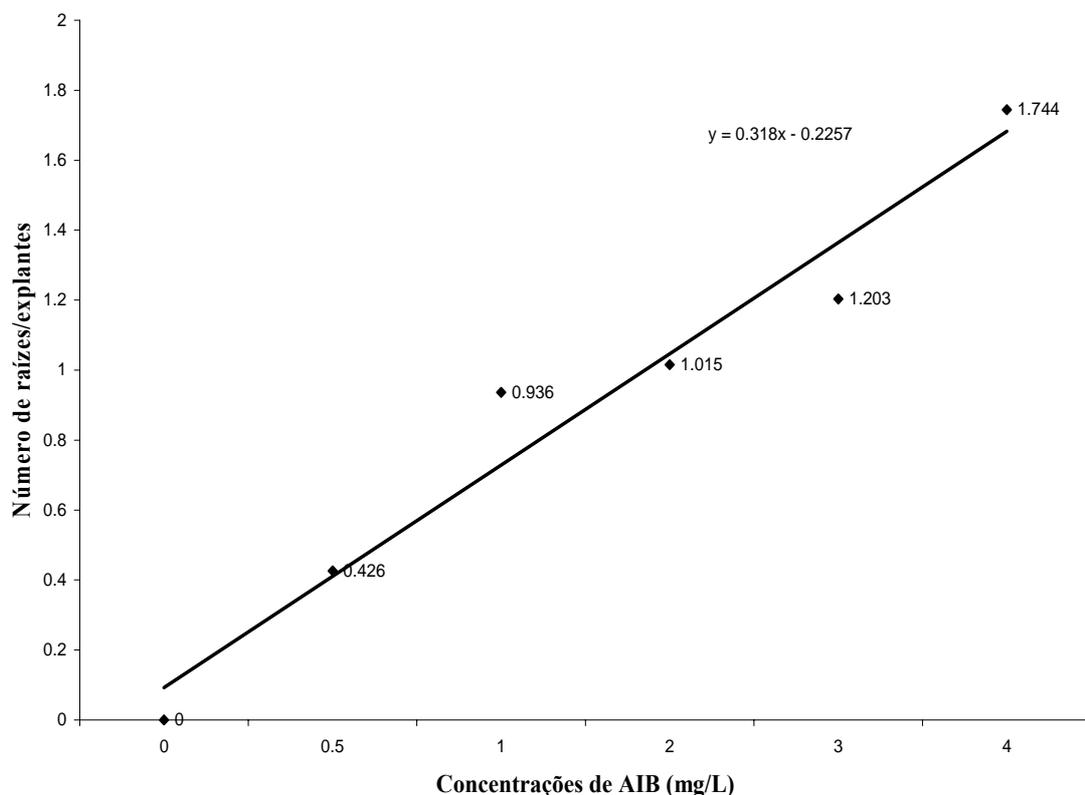
Concentrações de AIB (mg.L <sup>1</sup> )	Número de raízes por explante*	% enraizamento *
0,0	0,00 d	0,00 c
0,5	0,426 c	14,63 b
1,0	0,936 b	48,34 ab
2,0	1,015 b	59,09 ab
3,0	1,203 b	61,88 ab
4,0	1,744 a	72,88 a
<b>F Teste</b>	5,4584	8,6754
<b>C.V. (%)</b>	14,518	33,241

\*Médias obtidas de quatro explantes por repetição e de quatro repetições por explante. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK ( $\alpha = 0,05$ ), dados transformados (raiz quadrada X+ 1).

A Figura 2 apresenta para o intervalo de 0 a 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de AIB, as distribuições dos pontos médios, a equação de regressão e o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>). A concentração de AIB que apresentou a maior porcentagem de enraizamento foi de 4,0 mg.L<sup>-1</sup> (73 %), mas não diferiu significativamente das concentrações de 1,0; 2,0 e 3,0 mg.L<sup>-1</sup> de AIB (Tabela 1).

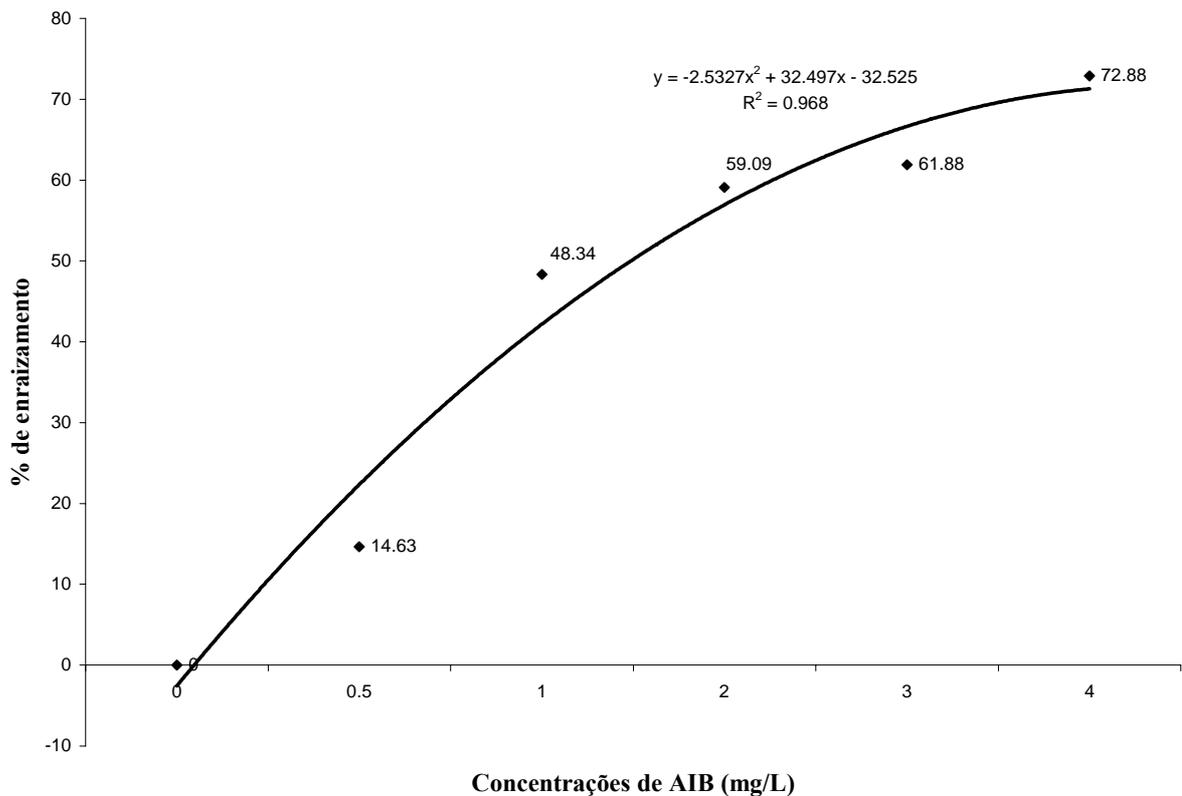
Rogalski et al. (2003), encontraram a maior porcentagem de enraizamento na concentração de 1,4 mg.L<sup>-1</sup> de AIB, com 75,3 %. Channuntapipat et al. (2003) observaram as melhores porcentagens de enraizamento nas concentrações entre 2,4 e 7,3 µM de AIB (88,0 – 96,0%).

O processo de rizogênese mostrou-se lento, pois após a retirada dos explantes do período de 10 dias de escuro, ainda foram necessários 7-10 dias para se visualizar as protuberâncias na base dos explantes e/ou pequenas raízes.



**FIGURA 1.** Efeito do AIB no número de raízes por explante no enraizamento in vitro do porta-enxerto de *Prunus* 'Carelle', 30 dias de cultura in vitro, (n=16). UFSC, Florianópolis-SC, 2003.

O processo de enraizamento não se mostrou uniforme no decorrer do tempo para o porta-enxerto avaliado. Alguns explantes formaram raízes mais precocemente que outros. Entretanto, verificou-se que as concentrações de AIB (1,0; 2,0 e 3,0 mg.L<sup>-1</sup>) aceleraram a emissão do sistema radicular. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Rogalski et al. (2003), que trabalhando com diferentes porta-enxertos de *Prunus* observaram emissão mais rápida das raízes nas concentrações de 0,5; 1,0; e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de AIB. Segundo Gebhardt (1985), a auxina exerce seu principal efeito no estágio inicial de formação dos primórdios; sua concentração e o tempo de permanência dos explantes no meio determinam o número de raízes e a velocidade de crescimento dos primórdios radiculares.



**FIGURA 2.** Efeito do AIB na porcentagem de enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* seleção 'Carelle', 30 dias de cultura *in vitro*, (n=16). UFSC, Florianópolis-SC, 2003.

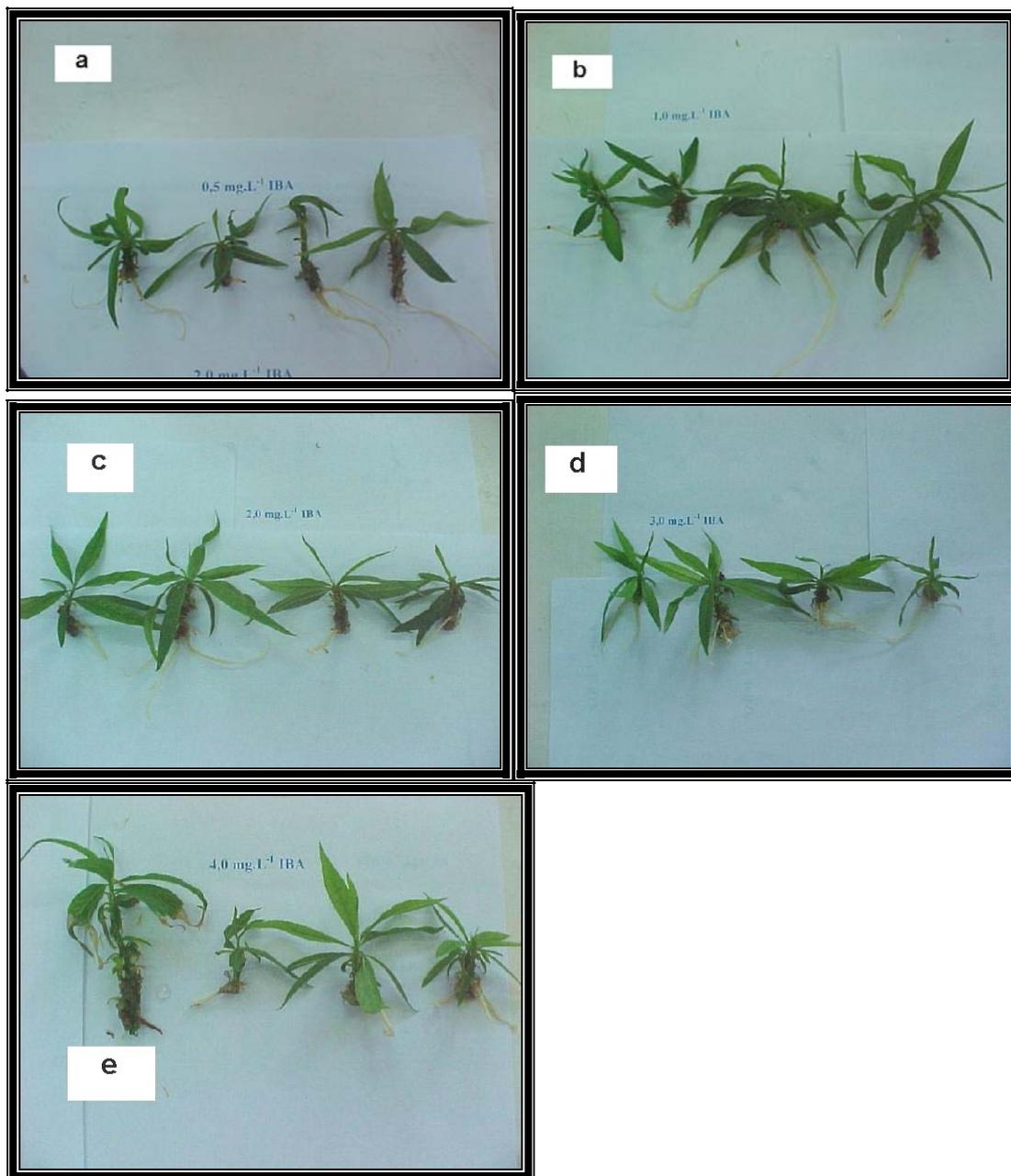
O período de escuro (10 dias) para a indução ao enraizamento é uma etapa recomendada para a multiplicação *in vitro* em prunáceas (Standardi et al., 1978; Hammerschiag, 1982; Reeves et al., 1985; Caboni e Damiano, 1993; Channuntapipat et al., 2003).

Standardi et al. (1978), mantendo brotos de diferentes variedades de *Prunus* no escuro por cinco dias e após luminosidade conseguiram aumentar as porcentagens de enraizamento. Hammerschiag (1982) declarou que um período de escuro de duas semanas era essencial para o máximo enraizamento da ameixeira 'Calita', sendo que a presença da luz inibiu a formação de raiz. Reeves et al. (1985) utilizaram um período inicial de incubação no escuro para enraizar *in vitro* o porta-enxerto *Prunus* spp. 'St Julien A'. Para

Caboni e Damiano (1994) a cultivar de amêndoa Supernova enraizou somente com AIB e um período de escuro, atingindo 58% de enraizamento. Channuntapipat et al. (2003) observaram ótimas porcentagens de enraizamento para um porta-enxerto híbrido de pêsego X amêndoa quando as culturas foram submetidas a um período de incubação de sete dias no escuro e posteriormente mantidas por duas semanas em um fotoperíodo de 16 horas.

A formação de calos na base dos explantes foi observada na concentração de 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de AIB. Para Magalhães et al. (1991) as concentrações mais elevadas de AIB levaram a formação de calos na base dos brotos, retardando o enraizamento e diminuindo o comprimento das raízes. Para Filiti et al. (1987), Campana et al. (1994) e Rogalski et al. (2003) este efeito é determinado por uma excessiva concentração de auxina no meio de cultura. Para estes autores, a concentração ideal de AIB no meio de cultura previne a formação de calos e promove rapidamente a formação e o desenvolvimento de raízes adventícias. Sabe-se que raízes formadas na presença de calos apresentam descontinuidade do sistema vascular com a parte aérea e/ou falhas nas conexões, com efeitos negativos em sua funcionalidade (Filiti et al., 1987).

A concentração de AIB afetou o crescimento das raízes, sendo que as concentrações de 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 mg.L<sup>-1</sup> proporcionaram um bom crescimento radicular, enquanto que na concentração de 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de AIB, formaram-se raízes curtas (Figura 3). Para Tricoli et al. (1985) e Campana et al. (1994), a auxina favorece a diferenciação celular dando origem aos primórdios radiculares, mas, não sendo necessária para o alongamento do sistema radicular, podendo até ser inibitória.



**FIGURA 3.** Aspectos morfológicos no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* da seleção 'Carelle' submetido a diferentes concentrações de AIB, após 30 dias de cultura *in vitro*. a). 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIB; b). 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de AIB; c). 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de AIB; d). 3,0 mg.L<sup>-1</sup> de AIB; e). 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de AIB LMBV/CCA/UFSC, Florianópolis-SC, 2003.

## CONCLUSÕES

Os resultados mostraram um aumento na porcentagem de enraizamento com o aumento na concentração de AIB, comportamento semelhante foi observado para o número de raízes. Confirmando assim, a necessidade de reguladores de crescimento para a iniciação e formação de raízes adventícias do porta-enxerto de *Prunus* 'Carelle'. A concentração de 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de AIB foi a que apresentou maior porcentagem de enraizamento e número de raízes por explante, porém apresentou a formação de calos na base dos explantes, o que pode vir a ser prejudicial na fase de aclimatização.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CABONI, E.; DAMIANO, C. Rooting in two almond genotypes. **Plant Science**, v. 96, p. 163-165, 1994.
- CABONI, E.; TONELLI, M.G.; LAURI, P.; IACOVACCI, P.; KEVERS, C.; DAMIANO, C.; GASPAR, T. Biochemical aspects of almond microcuttings related to *in vitro* rooting ability, **Biologia Plantarum**, Prague, v.39, n.1, p.91-97, 1997.
- CAMPANA, B.M.; CASTAGNARI, F.; COVATTA, F.; HENNINGS, M.; POLERO, H.J. Enraizamiento *in-vitro* del portainjerto Damas GF 1869 (*Prunus insititia* x *Prunus spinosa*), **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.16, n.3, p. 85-94, 1994.
- CHANNUNTAIPAT, C.; SEDGLEY, M.; COLLINS, G. Micropropagation of almond cultivars Nonpareil and Ne Plus Ultra and the Hybrid rootstock Titan X Nemaguard, **Scientia Horticulturae**. v.98, p.473-484, 2003.
- EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA S.A. Epagri. **Frutas de Clima Temperado**: situação da safra 2001/2002, Previsão da safra 2002/2003. Videira: Epagri, 2003. 21p.

FACHINELLO, J.C. Problemática Das Mudas De Plantas Frutíferas De Caroço. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE FRUTAS DE CAROÇO: PÊSSEGOS, NECTARINAS E AMEIXAS, 1., 2000, Porto Alegre. **Anais...** P.25-40.

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

GEBHARDT, K. Self-rooted sour cherries *in vitro*: auxin effects on rooting and isoperoxidases, **Acta Horticulturae**, Leuven, v.169, p. 341-349, 1985.

HAMMERSCHLAG, F. Factors influencing *in vitro* multiplication and rooting of the plum rootstock Myrobalan (*Prunus cerastifera* Ehrh.), **Journal of America Society for Horticulturae Science**, Alexandria, v. 107, p. 44-47, 1982.

MAGALHÃES, J. R.; 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**, v. 3, p. 57-61, 1991.

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

PRUSKI, K. W.; LEWIS, T.; ASTATKIE, T.; NOWAK, J. Micropropagation of Chokecherry and Pincherry cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.63, p. 93-100, 2000.

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

REEVES, D., W. COUVILLON, G., A. HORTON, B., D. Effect of Gibberellic Acid (GA<sub>3</sub>) on elongation and rooting of 'St Julien' A' rootstocks *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 26, n. p. 253-259, 1985.

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

RUFATO, L.; BUSO, L.H.; TRVISAN, R.; ROSSI, A. de; GUARDA, V. da C.; KERSTEN, E. Influência de gemas floríferas no enraizamento de estacas lenhosas de pessegueiro 'BR2' tratadas com diferentes concentrações de IBA, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n.2, p.297-299, 2000.

RUFATO, L.; KERSTEN, E. Enraizamento de estacas de pessegueiro (*Prunus persica* (L.) Batsch), cvs Esmeralda e BR2, submetidas à estratificação e ao ácido indolbutírico, **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n.2, p.191-194, 2000.

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

SKIRVIN, R.M.; CHU, M.C.; RUKAN-KERNS, H. An Improved Medium for the *In Vitro* of Harbrite Peach. **Fruit Varieties Journal**, v.36, p.15-17, 1982.

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

STANDARDI, A., BOXUS Ph, DRUART Ph. Preliminary research into effect of light on the development of axillary buds and rooting of plantlets cultivated *in vitro*. **Round Table Conf In vitro Multipi Wood Spec**. Gembloux, Belgium, June 6-8, pp 269-282, 1978.

TRICOLI, D.N.; MAYNARD, C.A.; DREW, A.P. Tissue culture of propagation of mature trees of *Prunus serotina* Enh. I. establishment; multiplication, and rooting in vitro. **Forestsic**, v. 31, p. 201-208, 1985.

## **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PORTA-ENXERTOS DE *Prunus* POR MARCADORES MICROSSATELITES (SSR)**

**RESUMO** Marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados nas mais variadas espécies frutíferas para análise de “fingerprinting”, para a identificação e certificação de material vegetal, bem como uma ferramenta auxiliar em programas de melhoramento para acessar a variabilidade genética entre genótipos. Dada a importância da cultura do pessegueiro para a região sul do Brasil, o presente trabalho teve por finalidade contribuir para a caracterização genético-molecular de 11 seleções de porta-enxertos de *Prunus*. Os porta-enxertos foram analisados com 12 primers SSR sendo que destes, oito apresentaram polimorfismo e produziram entre um a cinco (média 2,16) alelos/loco. O marcador UDP96-013 foi o mais polimórfico e detectou cinco alelos distintos. A análise de agrupamento realizada com o método UPGMA produziu um dendograma que permitiu uma clara separação das seleções de porta-enxertos em três grupos diferentes. O grau de polimorfismo detectado pelos marcadores SSR confirma o potencial da técnica na análise de “fingerprinting” e sua utilidade na estimativa da variabilidade genética entre genótipos de pessegueiro.

**Termos para indexação:** *Prunus*, marcadores moleculares, identificação varietal, microssatélites, fingerprinting.

## **MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Prunus* ROOTSTOCKS ANALYZED BY SSR MARKERS**

**ABSTRACT-** Molecular markers have been used thoroughly in many fruit crops species for fingerprinting analysis during the vegetal material certification process, and as an auxiliary tool in breeding programs to access genetic variability among genotypes. The peach is an important crop in Southern Brazil. The present paper aimed at to contribute for the genetic-molecular characterization of 11 peach rootstocks, which were analyzed with 12 SSR primers that showed eight polymorphic primers and detected among one – five (mean 2,16) allele/loco. The UDP96-013 marker was most polymorphic producing five allele different. The cluster analysis was represented by a dendogram using UPGMA method, and

showed a clear separation in to three groups different. A degree of polymorphism was detected by SSR markers in the peach, confirms the potential of the technique of fingerprinting analysis and is usefulness in the estimate of the genetic variability among peach genotypes.

**Index terms:** *Prunus*, molecular markers, variety identification, microsatellite, fingerprinting.

## INTRODUÇÃO

Dentro do gênero *Prunus* existem várias espécies originadas principalmente no Hemisfério Norte. A classificação botânica das espécies dentro deste gênero é bem controversa, em parte devido à facilidade de ocorrência de hibridação interespecífica (Dosba et al., 1994), a qual originou diversos tipos intermediários e diminuiu os limites entre as espécies do gênero *Prunus*.

O pêsego [*Prunus persica* (L.) Batsch] é uma espécie frutífera de autofecundação com uma baixa variabilidade genética (Scorza e Okie, 1990). A estreita base genética deve-se ao uso e propagação extensiva do pêsego tipo “Chinese Cling”, a partir do século XIX. Posteriormente esses genótipos foram incluídos como progenitores nos programas de melhoramento devido às características do fruto, como o tamanho, a polpa firme e também a sua ótima qualidade. Conduzindo, assim, a um alto nível de endogamia e co-ancestralidade entre as cultivares de pêsego (Scorza et al., 1985).

No sul do Brasil, a maioria dos porta-enxertos utilizados na produção de mudas de pessegueiro e ameixeira é originário da cultivar Capdeboscq [*Prunus persica* (L.) Batsch], cultivar de ciclo tardio, com boa germinação e cultivada para fins industriais (Fachinello et al., 1995). Esta cultivar é originária da Estação Experimental de Pelotas, obtida por polinização livre de um cruzamento entre ‘Lake City’ e uma seleção local chamada ‘Intermediário’ (Finardi, 1998).

Portanto, ocorre à necessidade de novas alternativas de porta-enxertos para substituir os utilizados atualmente, que sejam de origem clonal, permitindo a captura e fixação de ganhos genéticos (Fachinello, 2000). Desta forma, verifica-se que trabalhos de seleção de novas cultivares de porta-enxertos e métodos de propagação clonal são

fundamentais para a produção de mudas e a sustentabilidade das Prunáceas (Fachinello, 2000; Rogalski, 2002; Silva et al., 2003). Uma vez que o sucesso no cultivo de plantas frutíferas depende muito da qualidade do material vegetal, garantias de correspondência genético-sanitárias são fundamentais devido ao alto investimento de tempo e dinheiro requeridos para implantar um pomar.

A identificação de cultivares realizada através de características morfo-fenológicas e pomológicas dos materiais vegetais pode ser utilizada, pois há uma substancial variação intraespecífica, principalmente nas características de folhas e frutos (Sansavini, 1998). Mas no caso de porta-enxertos, torna-se mais difícil à observação dessas características morfológicas após o processo de enxertia (Lu et al., 1996; Casas et al., 1999; Bianchi et al., 2003). Adicionalmente, este tipo de análise apresenta várias limitações pois requer muito tempo para ser realizada, além de não permite acessar todo o genoma da planta, deixando várias dúvidas quando se trata de genótipos com características muito similares (como verificado em pessegueiro), e não pode ser realizada em qualquer período do ano ou ciclo da planta.

Com o advento das técnicas de detecção de polimorfismo do DNA, gerou-se um amplo alcance na identificação de cultivares e estudos de divergência genética (Rafalski et al., 1996).

A utilização de marcadores moleculares com o intuito de estimar divergências genéticas cada vez mais tem-se mostrado apropriado para a análise de genótipos de vários organismos. Nesse contexto, os marcadores moleculares microsatélites ou SSR (simple sequence repeats) possuem grande aplicabilidade. Os locos de SSR são constituídos de pequenas seqüências de um a quatro nucleotídeos de comprimento, repetidas em tandem (Litt e Luty, 1989). No genoma dos eucariotos, estas seqüências simples são mais freqüentes, melhor distribuídas ao acaso, formam locos genéticos bem polimórficos, parecem ser somaticamente estáveis, são altamente multialélicos e apresentam um padrão de herança co-dominante, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados e possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo “PIC” (“Polymorphism Information Content”) (Morgante e Oliveira, 1993; Powell et al., 1996; Cipriani et al., 1999; Sosinski et al., 2000; Testolin et al., 2000; Aranza et al., 2001).

Vários primers microssatélites foram relatados para pessegueiro (Cipriani et al., 1999; Sosinski et al., 2000; Testolin et al., 2000; Aranza et al., 2001; Dierlewanger et al., 2002). Estes marcadores foram utilizados com sucesso na discriminação de genótipos de prunáceas por Testolin et al. (2000); Sosinski et al. (2000); Hormaza, (2001); Aranza et al. (2001); Hormaza, (2002) e Wünsch e Hormaza, (2004).

O presente trabalho teve por finalidade utilizar marcadores moleculares obtidos por amplificação do DNA via PCR com primers de seqüências simples repetidas (SSR) desenvolvidos para *Prunus persica* (L.) Batsch, para detectar a similaridade genética entre 11 seleções de porta-enxertos de *Prunus spp.*

## MATERIAL E MÉTODOS

Amostras foliares de plantas de 11 porta-enxertos de pêsego (Tabela 1) foram coletadas e acondicionadas em uma caixa de isopor com gelo e posteriormente transferidas para o laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal do CCA/UFSC, onde foram mantidas a -20°C, até a extração do DNA.

O método de extração de DNA vegetal foi o descrito por Doyle e Doyle, (1987) com algumas modificações. Cerca de 150 mg de tecido vegetal foi pulverizado com nitrogênio líquido, através de maceração manual e colocado em microtubos de centrifuga. Ao material macerado foram adicionados 700 uL de tampão de extração (2% CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCL pH 8,0, 2,0% PVP e 2% de  $\beta$ -mercapto-etanol). O DNA foi purificado através de duas lavagens com 1 mL de acetato de Amônio + álcool 76% por 10 minutos e uma vez com 1 mL de álcool 95% por 1 minuto. O “pellet” foi seco na bancada à temperatura ambiente durante 10 minutos e resuspenso em 70 uL tampão TE (10mM Tris-HCL pH8,0 e 1 mM EDTA), contendo 10 ug/mL de RNase.

O DNA foi quantificado e a sua qualidade avaliada através de eletroforese em tampão TBE 1X, em gel de agarose 0,8 %, corado com brometo de etídio, através de comparação com DNA de fago  $\lambda$  nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 ng/uL. Após a quantificação o DNA foi diluído em TE, para concentração de 10 ng/uL.

**TABELA 1.** Identificação da origem, local de coleta e observações sobre as 11 seleções de porta-enxertos de *Prunus spp.* utilizados no estudo.

<b>Porta-enxertos</b>		<b>Local</b>		
<b>Numero</b>	<b>Seleção</b>	<b>Coleta</b>	<b>Origem</b>	<b>Observações</b>
01	<b>PAL</b>	Vitroplanta/ Videira	Sel. Capdeboscq	Porta-enxerto Ananizante (Letícia)
02	<b>VP 411</b>	Vitroplanta/ Videira	Sel. Capdeboscq	Porta-enxerto de Prunaceas
03	<b>MAL</b>	Vitroplanta/ Videira	Sel. Capdeboscq	Porta-enxerto Ananizante (Letícia)
04	<b>VP 419</b>	Vitroplanta/ Videira	Sel. Capdeboscq	Porta-enxerto de Prunaceas
05	<b>GF 677</b>	Epagri/ Videira	<i>Prunus persica x Prunus amygdalus</i>	Porta-enxerto origem INRA (França)
06	<b>Baldissera 2</b>	Vitroplanta/ Videira	Sel. Capdeboscq	Porta-enxerto Ananizante (Letícia)
07	<b>PAF 1</b>	Vitroplanta/ Videira	Sel. Capdeboscq	Porta-enxerto Ananizante (Frontier)
08	<b>PAF 2</b>	Vitroplanta/ Videira	Sel. Capdeboscq	Porta-enxerto Ananizante (Frontier)
09	<b>VP Enraizador</b>	Vitroplanta/ Videira	Sel. Capdeboscq	Porta-enxerto de Prunaceas
10	<b>Carelle 1</b>	Epagri/Pinto Preto	Sel. Capdeboscq	Porta-enxerto Ananizante (Frontier)
11	<b>Carelle 2</b>	Epagri/ Videira	Sel. Capdeboscq	Porta-enxerto Ananizante (Frontier)

**TABELA 2.** Iniciadores microssatélites de pessegueiro [*Prunus persica* (L) Batsch] selecionados para a análise das 11 seleções de porta-enxertos de *Prunus spp*, UFSC/CCA/LFDGV, 2004.

<b>Iniciador</b>	<b>Seqüência (3'-5')</b>	<b>Referência</b>	<b>Fragmento (bp)</b>	<b>Temperatura de anelamento (°C)</b>
AF324925	Atgtagccggtagctttcg Acgacaactccaagcccc	Genebank	90-120	60
AF324924	Gccaagtgcccacaatc Ataggctgcacacagga	Genebank		60
AF324923	Gaccagaattgtaagcacc ctaagccacttgaagctta	Genebank	140-160	60
BPPCT2	Tgacagcttgatcttgacc Caatgcctacggagataaaagac	Dirlewanger et al. (2002)	229	60
BPPCT4	Ctgagtgatccattgcagg Agggcatctagacctcattgtt	Dirlewanger et al. (2002)	200	60
BPPCT6	Gcttgtggcatggaagc Cctgtttctcatagaactcacat	Dirlewanger et al. (2002)	117	60
BPPCT8	Atggtgtgtatggacatgatga Cctcaacctaagacaccttact	Dirlewanger et al. (2002)	148	60
BPPCT9	Attcgggtcgaactcct Acgagcactagagtaaccctctc	Dirlewanger et al. (2002)	171	60
UDP97-402	Tcccataacaaaaaacacc Tggagaagggtgggtacttg	Cipriani et al.(1999)	130-170	60
UDP96-018	Ttctaactctgggctatggcg Gaagttcacatttacgacaggg	Cipriani et al.(1999)	210-260	60
UDP96-013	Attcttactacagtgacag Ccccagacatactgtggctt	Cipriani et al.(1999)	200	60
UDP96-001	Agtttgattttctgatgatcc Tgccataaggaccggtatgt	Cipriani et al.(1999)	110-150	60

As reações de amplificação foram realizadas com 1 U de Taq DNA Polimerase, 2,4 mM de  $MgCl_2$ , 0,25 mM de dNTPs (desoxi-nucleotídeos), 0,2 uM de cada primer, Tampão 10X e 30 ng de DNA genômico, num volume final de 15 uL. Os primers usados para o microssatélite são apresentados na Tabela 2. O método de amplificação usado consistiu de um ciclo inicial de desnaturação de 96°C por 3 min. e 30s. Seguido por vinte e nove ciclos de (94°C por 1 min., 60°C por 1 min, e 72°C por 1 min.) finalizando com 72°C por 7 minutos.

Para visualização dos fragmentos amplificados foram retiradas às amostras da PCR e adicionados 4 uL de tampão de carregamento e em seguida colocadas para desnaturar por 5 minutos a 95°C. Após a desnaturação foram colocados 6 uL de cada amostra no gel de poliacrilamida (aquecido a 60W até atingir uma temperatura de 50°C) por 1 hora. Em seguida foi feita uma coloração com Nitrato de Prata.

Para as informações geradas pelos marcadores SSR, os seguintes parâmetros foram calculados: número de alelos por loco (A), heterozigosidade observada ( $H_o$ ), heterozigosidade esperada ( $H_e = 1 - \sum p^2_i$ , onde p é a frequência do alelo  $i^{th}$ ) e porcentagem de locos polimórficos (P). As relações entre variedades foram representadas em forma de dendogramas pelo processo de agrupamento de médias UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average), utilizando o software NTSYS-pc 2.02 (Rohlf, 1997) com uma matriz de similaridade genética calculada a partir do coeficiente de similaridade de Jaccard.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O uso de iniciadores microssatélites em reações de PCR possibilitou a amplificação de fragmentos de DNA, contidos entre regiões de DNA repetitivo, representadas por seqüências simples repetidas (SSRs). Entre os 15 iniciadores testados, 12 produziram bandas nítidas e de boa repetibilidade (Tabela 2) e oito destes mostraram-se polimórficos (66,67%). Os parâmetros de variabilidade analisados são apresentados na Tabela 3. AF324925, BPPCT4, BPPCT6, BPPCT9 e UDP97-402 detectaram a presença de um ou mais indivíduos sem amplificação de banda, o que sugere a presença de alelos nulos nestes locos.

O número de alelos detectados foi de cinco, variando de um (BPPCT4, BPPCT6, BPPCT9 e UDP97-402) a cinco (UDP96-013), com uma média de 2,16 alelos por loco. A heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) média foi de 0,51 e variou de 0,18 (UDP96-001) a 0,77 (UDP96-013). Um alto nível de heterozigosidade foi observado em AF324923 (1,00) e AF324924 (0,91) e um baixo nível em UDP96-001 (0,10) e BPPCT8 (0,18).

A alta proporção de locos polimórficos (66,67%), o número de alelos detectados por loco (2,16) e a alta heterozigosidade esperada (0,51), indicou que marcadores microssatélites (SSR) podem ser utilizados para identificar os níveis de variação em pessegueiro.

Estes resultados estão de acordo com Aranza et al. (2001), que analisando 14 cultivares de pessegueiro e 11 de nectarineira encontraram número médio de alelos de 3,2, variando entre 2 a 8 alelos detectados. Estes autores observaram que 69% dos locos analisados foram polimórficos, a heterozigosidade média esperada foi de 0,41 (0,04 a 0,79) e a heterozigosidade média observada foi de 37 % (4 a 76 %). Wünsch e Hormaza (2003) revelaram 42 alelos, com uma média de 3,5 (2 a 10) alelos por loco utilizando 12 iniciadores microssatélites (SSR) em cultivares locais de cerejeira da Espanha. Já para Sosinski et al. (2000), somente oito primers SSR mostraram-se polimórficos em dez utilizados, sendo que todos os locos microssatélites amplificaram para as 28 cultivares de pêssegueiro analisadas, mostrando entre um e quatro possíveis alelos e uma heterozigosidade média observada de 0,45 (0,21 a 0,56).

Para Hormaza (2002), dos 37 iniciadores microssatélites (SSR) de pessegueiro utilizados em damasco (*Prunus armeniaca* L.), 20 (64,52%) foram polimórficos e 82 alelos foram detectados nestes locos, com 2 a 8 alelos por loco. A heterozigosidade média observada foi de 0,51 (0,08 a 0,94). Dierlewanger et al. (2002) analisaram a diversidade genética em pessegueiro e cerejeira (*Prunus avium* L.), com 41 iniciadores microssatélites desenvolvidos para pessegueiro. Destes 13 revelaram polimorfismo em ambas as espécies, 19 foram polimórficos somente em pessegueiro e um foi polimórfico somente em cerejeira. O número de alelos por loco variou de 1 a 9 (4,2) e de 1 a 6 para cerejeira (2,8), respectivamente. A heterozigosidade média esperada variou de 0,07 a 0,79 (0,41) para pessegueiro e de 0,39 a 0,76 (0,60) para cerejeira. A heterozigosidade observada foi menor

que a esperada para todos os alelos e três microssatélites em pêsegeiro apresentaram alelos nulos.

**TABELA 3.** Parâmetros de variabilidade genética de 11 seleções de porta-enxertos de *Prunus* analisados com 12 iniciadores de microssatélites. UFSC/CCA/LFDGV, 2004.

<b>Iniciador ou primers</b>	<b>Heterozigosidade esperada (He)</b>	<b>Heterozigosidade observada (Ho)</b>	<b>Número de alelos/loco (A)</b>
AF324925	—	—	2,0
AF324924	0,58	0,91	4,0
AF324923	0,50	1,00	2,0
BPPCT2	0,52	0,40	3,0
BPPCT4	—	—	1,0
BPPCT6	—	—	1,0
BPPCT8	0,515	0,18	2,0
BPPCT9	—	—	1,0
UDP97-402	—	—	1,0
UDP96-018	0,50	0,45	2,0
UDP96-013	0,77	0,77	5,0
UDP96-001	0,18	0,10	2,0
Média	0,51	0,54	2,16

O agrupamento gerado a partir dos marcadores microssatélites (SSR) mostrou a formação de três grupos distintos (Figura 1), com um coeficiente de correlação cofenética de 0,83. O primeiro grupo contém as seleções de porta-enxertos de *Prunus* (01-PAL e 03-MAL) que apresentaram uma similaridade genética de 100% entre elas. Ambas seleções estão sendo avaliadas e indicadas como porta-enxertos ananizantes da cultivar de ameixeira ‘Letícia’. O mesmo coeficiente de similaridade foi observado para as seleções 02-VP 411 e 08-PAF 2. Neste grupo também estão as seleções 04-VP 419 e 07-PAF1, que apresentaram uma similaridade genética de 70%. As seleções 02-VP 411 e 04-VP 419 são utilizadas como porta-enxerto de prunáceas e as seleções 07-PAF1 e 08-PAF 2 são indicadas como

porta-enxertos da cultivar de ameixeira 'Frontier'. Todos as seleções são possivelmente originárias do porta-enxerto 'Capdeboscq' e tem o mesmo local de coleta, a empresa Vitroplanta de Videira.

O segundo grupo é formado pelas seleções 06-Baldissera 2 e 09-VP Enraizador e 10-Carelle 1 e 11-Carellie 2 que mostraram uma similaridade genética de 83,3% e 70,6%, respectivamente. A seleção 06-Baldissera 2 é indicada como um possível porta-enxerto ananizante para cultivar de ameixeira 'Letícia' e a seleção 09-VP Enraizador é utilizada como um porta-enxerto de pessegueiro e apresenta ótima capacidade de multiplicação via estacas herbácea na empresa Vitroplanta de Videira. Já as seleções 10-Carelli 1 e 11-Carelli 2 são indicadas como possíveis porta-enxertos ananizantes da ameixeira 'Frontier' e são oriundas de Pinheiro Preto e Videira (Epagri), respectivamente.

O terceiro grupo foi formado somente pelo porta-enxerto 05-GF 677, com a menor porcentagem de similaridade genética (56,2%) em relação às demais seleções avaliadas. O porta-enxerto GF 677 mostrou-se geneticamente distante dos dois outros grupos formados pela análise de cluster, o que já era esperado, pois este material é um híbrido entre o pessegueiro [*Prunus persica* (L.) Batsch] e a amêndoeira (*Prunus amygdalus*). Assim, confirmando a identidade varietal diferente das demais seleções que apresentam em comum a origem de genótipos geneticamente próximos do porta-enxerto 'Capdeboscq' tradicionalmente utilizado como porta-enxerto de prunáceas.

Este material produziu três bandas como produto da amplificação para alguns pares de primers, sendo mais que o esperado de acordo com a construção diplóide das espécies que geraram este híbrido. Para Hormaza (2002) este fenômeno foi observado em produtos da amplificação de cinco pares de primers microssatélites (SSR) em estudo entre genótipos de damasco (*Prunus armeniaca* L.).

Os resultados observados para as 11 seleções de *Prunus* confirmaram a eficiência de marcadores SSR para a identificação varietal. Para Hormaza (2001), os marcadores microssatélites foram eficazes para distinguir diferentes acessos relatados para cultivar de damasco 'Moniqui'. No entanto, 13 acessos foram indistinguíveis com todos os pares de iniciadores utilizados. Estes resultados foram confirmados com as observações fenotípicas realizadas a campo. Dierlewanger et al. (2002) desenvolveram marcadores microssatélites

para pessegueiro, utilizando-os com sucesso na análise da diversidade genética em pessegueiro e cerejeira (*Prunus avium* L.) e também na identificação varietal de pessegueiro para a proteção de cultivares e certificação de mudas.

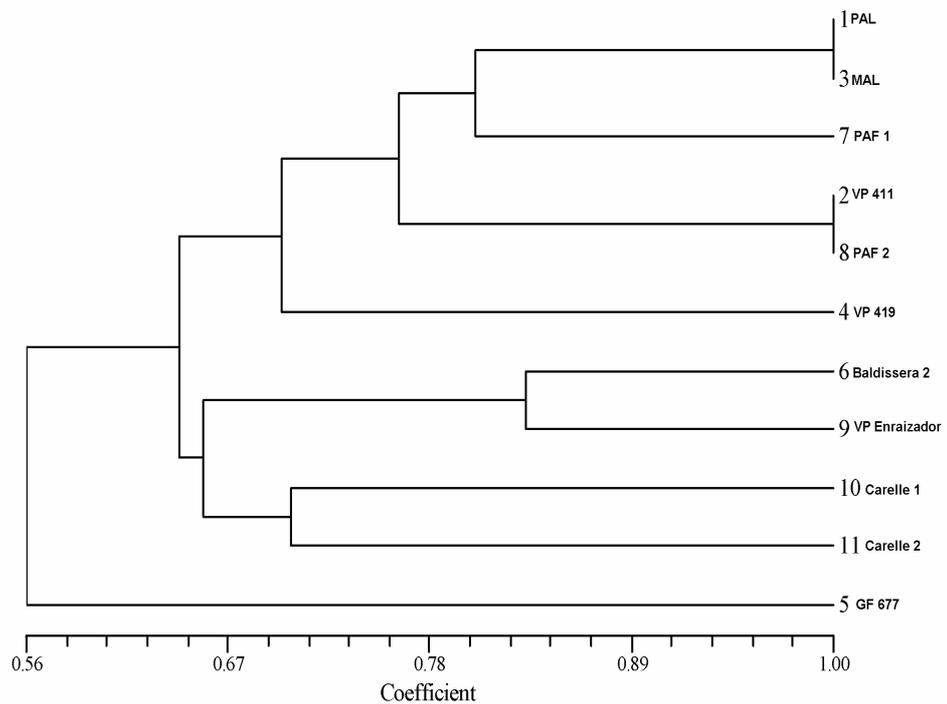
A eficiência na discriminação entre diferentes genótipos do gênero *Prunus* através de marcadores microssatélites (SSR) desenvolvidos para *Prunus persica* (L.) Batsch é salientada por diversos autores (Hormaza, 2001; Dierlewanger et al., 2002; Bianchi et al., 2002; Hormaza, 2002; Wünsch e Hormaza, 2004). Os resultados obtidos sugerem que a distância genética entre as espécies do gênero *Prunus* não é alta. De fato, o conteúdo do DNA nuclear estimado para as espécies diplóides deste gênero mostram um pequeno genoma nuclear relativamente estável. Também são freqüentemente relatados exemplos de hibridação interespecíficas e compatibilidade de combinações com enxertia entre espécies do gênero (Baird et al., 1994).

**TABELA 4.** Similaridade genética observada entre 11 seleções de porta-enxertos de *Prunus* utilizando marcadores de DNA obtidos com iniciadores de seqüências simples repetidas, UFSC/CCA/LFDGV, 2004

Seleções	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	1										
2	0.764	1									
3	1.000	0.764	1								
4	0.700	0.700	0.700	1							
5	0.562	0.700	0.700	0.562	1						
6	0.644	0.644	0.644	0.644	0.562	1					
7	0.806	0.764	0.806	0.700	0.562	0.644	1				
8	0.764	1.000	0.764	0.700	0.562	0.644	0.764	1			
9	0.644	0.644	0.644	0.644	0.562	0.833	0.644	0.644	1		
10	0.644	0.644	0.644	0.644	0.562	0.657	0.644	0.644	0.657	1	
11	0.644	0.644	0.644	0.644	0.562	0.657	0.644	0.644	0.657	0.705	1

Bianchi et al. (2002) salientaram a eficiência do uso de marcadores microssatélites para identificar seis cultivares de ameixeira (*Prunus salicina*). Wunsch e Hormaza (2004), avaliando a diversidade genética de cultivares locais de cerejeiras espanhola utilizando 12 iniciadores microssatélites (SSR), verificaram a identificação de 26 dos 28 genótipos estudados. As análises de similaridade genética realizadas pelo método UPGMA permitiram uma clara separação entre as cultivares mais tradicionais e àquelas introduzidas recentemente na região.

As análises mostraram que os genótipos 01-PAL e 03-MAL e 02-VP 411 e 08-PAF 2, pertencentes ao primeiro grupo, foram geneticamente idênticos. Neste caso, pode se afirmar que para uma mesma seleção foi conferido dois nomes diferentes (sinonímia), mas trata-se do mesmo genótipo. Já as seleções de porta-enxertos de *Prunus* incluídas no segundo grupo, principalmente 10-Carelle 1 e 11-Carelle 2 que a princípio teriam a mesma identidade genética, mas apresentaram somente 70,5% de similaridade molecular. Neste caso, acredita-se tratar de genótipos distintos e recomenda-se a realização de novas análises com um maior número de amostras e de iniciadores, a fim de verificar de maneira mais precisa a identificação varietal destes genótipos.



**FIGURA 1.** Dendrograma de 11 seleções de porta-enxertos de *Prunus*, construído a partir dos produtos de amplificação com primers de SSR, usando o método de agrupamentos UPGMA, UFSC/CCA/LFDGV,2004.

## CONCLUSÕES

Marcadores microssatélites (SSR) foram eficientes para a caracterização genética das seleções de porta-enxertos de *Prunus* analisados neste trabalho. Resultados significativos foram obtidos com estes marcadores, permitindo estimar a variabilidade genética entre as seleções e confirmando a desuniformidade genética dos genótipos utilizados na produção de mudas de prunáceas no Estado de Santa Catarina. Além disso, é possível identificar geneticamente as seleções demonstrando a presença de diferentes nomes ou códigos para o mesmo genótipo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARANZA, J.M.; GARCIA-MAS, J.C.; ARÚS, P. Development and variability analyses of microsatellites markers in peach. **Plant Breeding**, v. 121, p. 87-92, 2001.

BAIRD, W.V.; ESTAGER, A.S.; WELLS J.K. Estimating nuclear DNA content in peach and related diploid species using laser flow cytometry and DNA hybridization. **J. Am. Hort. Sci.**, v. 119, p. 1312-1316, 1994.

BIANCHI, V.J.I marcatori AFLP e SSR, risolutivi nella identificazione genética delle varietà di susino. **Frutticoltura**, Bologna, v. 4, p. 83-87, 2002.

BIANCHI, V.J; FACHINELLO, J.C.; SCHUCH, M.W. RAPDs na caracterização genético-molecular e no estudo da variabilidade genética de cultivares de ameixeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 272-274, 2003.

CASAS, A. M.; IGUARTUA, E.; BALAGUER, G.; MORENO, M.A. Genetic diversity of *Prunus* rootstocks analyzed by RAPD markers. **Euphytica**, v. 110, p. 139-149, 1999.

CIPRIANI, G.; LOT, G.; HUANG, W.G.; MARRAZZO, M.T.; PETERLUNGER, E.; TESTOLIN, R. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*. **Theor. Appl. Genet.**, v. 99, p. 65-72, 1999.

DIERLANGUER, E.; COSSON, P.; TAVAUD, M.; ARANZA, M.J.; POIZAT, C.; ZANETTO A.; ARÚS, P.; LAIGRED, F. Development microsatellites markers in peach

[*Prunus persica* (L) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). **Theor. Appl. Genet.**, v. 105, p. 127-138, 2002.

DOYLE, J.J.; and DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem. Bull**, v. 19, p. 11-15, 1987.

DOSBA, F.; BERNHARD, R. and ZANETTO, A. Importance des ressources génétiques des *Prunus*. **C R Acad Agric Fr**, v. 80, p. 45-57, 1994.

FACHINELLO, J.C. Problemática Das Mudas De Plantas Frutíferas De Caróço. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE FRUTAS DE CAROÇO: PÊSSEGOS, NECTARINAS E AMEIXAS, 1., 2000, Porto Alegre. **Anais...** P.25-40.

FINARDI, N.L. Métodos de propagação e descrição de porta-enxertos, In: MEDEIROS, C.A B.; RASEIRA, M.C.B. **A cultura do pessegueiro**. 1ed. Pelotas: Embrapa-CPACT, 1998, volume único, 1, p.100-129.

HORMAZA, J.I. Identification of apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using microsatellite and RAPD markers. **Acta Hort**. V. 546, p. 209-215, 2001.

HORMAZA, J.I. Molecular characterization and similarity relationship among (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. **Theor. Appl. Genet.**, v. 104, p. 321-328, 2002.

LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v.44, n.3, p.397-401, 1989.

LU, J. et al. Comparative analysis of genetic diversity in peã assessed by RFLP and PCR-based methods. **Theoretical and Applied Genetics**, Belfast, v. 93, p. 1103-1111, 1996.

POWELL W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in plant science**, v.1, n.7, p. 215-221, July 1996.

RAFALSKI, J.A.; VOGEL, J.M.; MORGANTE, M.; POWELL W.; ANDRE, C.; TINGEY, S.V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, B. and LAI, E. (eds) Nonmammalian genomic analysis. A practical guide. Academic press. San Diego. p. 75-134, 1996.

ROLFH, F.J. NTSYS-PC. Numerical taxonomic and multivariate analysis system. Exeter Software, New York, 1997.

SASANVINI, S. Biotecnologie fruticole: le nuove frontiere. Del le ricerche per il miglioramento genetico e la propagazione delle piante da frutto. **Frutticoltura**, Bologna, v. 5, p. 75-81, 1998.

SILVA, A.L.; ROGALSKI, M.; GUERRA, M. P. Effects of different cytokinins *in vitro* multiplication of *Prunus* 'Capdeboscq' rootstocks. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 149-156, 2003.

SCORZA, R.; MELENBACHER, S.A.; LIGHTNER G.W. Inbreeding and coancestry of freestone peach cultivars of eastern United States and implications for peach germoplasm improvement. **J. Am. Hort. Sci.**, v. 110, p. 547-552, 1985.

SCORZA, R.; OKIE, W.R. Peaches (*Prunus*). In: Genetic Resources Of Temperature Fruit And Nut Crops. Vol. I. Edited by J.N. Moore and J.R. Ballington, Jr. I.S.H.S. Wageningen, The Netherlands, 1990.

SOSINSKI, B., GUANNAPARAVU; M. HAGER, L.D.; BECK, L.E.; KING, G.J.; RYDER, C.D.; RAJAPAKSE, S.; BAIRD, W.V.; BALLARD, R.E.; ABBOTT, A.G.

Characterization of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]. **Theoretical and Applied Genetics**, Belfast, v. 101, p. 421-428, 2000.

TESTOLIN, R.; MARAZZO, T.; CIPRIANI, G.; QUARTA, R.; VERDE, I.; DETTORI, M.T.; PANCALDI, M.; SANSAVINI, S. Microsatellite DNA in peach [*Prunus persica* (L) Batsch] and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. **Genome**, v. 43, p. 512-520, 2000.

WÜNSCH, A. and HORMAZA, J.I. Molecular evaluation of genetic diversity and S-allele composition of local Spanish sweet cherry (*Prunus avium* L) cultivars. **Genetic Resources and Crop Evolution**, n. 51, p. 635-641, 2004.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho objetivou aprimorar o conhecimento científico e tecnológico referente às técnicas de propagação e seleção clonal de porta-enxertos de *Prunus*. Neste sentido, foram desenvolvidas metodologias para propagação *in vitro* das seleções ‘Carelle’, VP 411 e VP 417 e também para a identificação genética de 11 seleções de porta-enxertos de *Prunus* utilizados na produção de mudas no Estado de Santa Catarina. Estas novas técnicas possibilitarão um melhor conhecimento destas seleções de porta-enxertos e, certamente, permitirão um melhor controle varietal e sanitário na produção de mudas de Prunáceas, contribuindo para o estabelecimento de pomares uniformes geneticamente e livres de patógenos.

A metodologia de manutenção de plantas matrizes em casa de vegetação, com controle permanente em relação à nutrição e patógenos, foi determinante na fase de introdução e estabelecimento *in vitro*. Ápices caulinares e gemas laterais do porta-enxerto ‘Carelle’ foram utilizados como explantes e mostraram-se eficientes permitindo a continuidade do processo de cultura *in vitro*.

O potencial para multiplicação desta seleção de porta-enxerto ‘Carelle’ foi comparado a outras seleções do porta-enxerto ‘Capdeboscq’, VP 411 e VP 417, demonstrando diferenças quando submetidos a diferentes concentrações de BAP. A concentração de BAP mais eficiente foi de 1,0 mg.L<sup>-1</sup> e, de modo geral, a elevação nas concentrações de BAP reduziu a altura das brotações e provocou a hiperhidricidade dos explantes.

A presença de AIB foi essencial na fase de enraizamento *in vitro* da seleção de porta-enxerto ‘Carelli’. O número de raízes por explante e a percentagem de enraizamento aumentaram com a elevação na concentração de AIB, sendo que as concentrações mais elevadas deste fitohormônio induziram a formação de calos na base dos explantes.

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

Este estudo confirmou que a variabilidade genética é expressada *in vitro* e deve ser considerada em suas diferentes fases. Assim, as 11 seleções de porta-enxertos de *Prunus*, entre eles três seleções do porta-enxerto ‘Capdeboscq’, VP 411, VP 419 e ‘Carelle,’ foram analisadas quanto as suas similaridades genéticas. O resultado apresentado pela análise de agrupamento realizada pelo método UPGMA, obtido pela amplificação de 12 pares de primers SSR de pêssegueiro, revelou que alguns genótipos são geneticamente idênticos e outros que deveriam ter tal comportamento não o tiveram, mostrando que a propagação de plantas frutíferas de forma não controlada tem conduzido a perda de identidade genética de inúmeros genótipos.

## **ANEXO 01**

Comunicação científica publicada na Revista Brasileira de Fruticultura  
(Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal – SP, v. 26, n.2, p.377-379, agosto2004)

## **ANEXO 02**

(Meio de Cultura QL – QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P.; BOXUS, P. **Comptes  
Rendus des Recherches Agronomiques**, Gembloux, p.93-117, 1977.

## MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DO PORTA-ENXERTO DE *Prunus* spp. 'CARELLI'<sup>1</sup>

**RESUMO** - No Brasil a falta de porta-enxertos para as Prunáceas, principalmente de origem clonal, tem incentivado a seleção de novas variedades e o uso de técnicas de cultura *in vitro* para a propagação. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de multiplicação *in vitro* do porta-enxerto 'Carelli' sob efeito de diferentes concentrações da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP). Segmentos nodais com 0,5 cm de comprimento foram inoculados em meio de cultura de Lepoivre, suplementado com 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup> BAP. Estes segmentos nodais são oriundos de plântulas pré-estabelecidas *in vitro*, após duas subculturas em meio de cultura de Lepoivre, suplementado com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. As avaliações para número de brotos por explante, altura média das brotações foram realizadas após 21 dias de cultura *in vitro*. Os resultados mostraram que os tratamentos com BAP não apresentaram diferenças significativas entre eles. A taxa média de multiplicação foi de 3,3 a 3,4 brotos por explante. O tratamento sem adição de BAP não apresentou a formação de brotações axilares, mas resultou em brotos com maior altura média (16,2 mm). O uso de BAP afetou significativamente a altura das brotações e o acréscimo nas suas concentrações reduziu o comprimento das mesmas. Concentrações de BAP superiores a 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP reduziram o comprimento das brotações e promoveram hiperhidricidade. O uso de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP promoveu a formação de 3,3 brotos por explante com 11,0 mm de altura média, em condições adequadas para o enraizamento.

**Termos de indexação:** Pessegueiro; micropropagação; mudas

### *In vitro* MULTIPLICATION OF *Prunus* spp. ROOTSTOCKS 'CARELLI'

**ABSTRACT** - In Brazil the lack of well adapted rootstocks in the Peach industry, mainly of clonal origin, forces the selection of new varieties and the use of tissue culture techniques for the mass clonal propagation. In the present work it was evaluate the *in vitro* multiplication potential of "Carelli" rootstock in response to different levels of BA. Nodal

---

<sup>1</sup> Aceito para publicação na RBF em: 22 de Julho de 2004.

segments (0.5 cm length) were inoculated in test tubes containing 20 ml of Lepoivre's culture medium supplemented with 0.0; 0.5; 1.0; 2.0 and 4.0 mg.L<sup>-1</sup> BA. This nodal segments were originated from *in vitro* pre-establish plants after two subcultures in Lepoivre's culture medium supplemented with 0.5 mg.L<sup>-1</sup> BA. Evaluations done after 21 days in culture showed that the different levels of BA resulted in values statistically similar for the multiplication rate and length of regenerated shoots. The values for multiplication rate ranged from 3.3 to 3.4 shoots/explant. The treatment control did not result in multiple shoots but gave rise to shoots with the highest length (16.2 mm). BA significantly affected the length of shoots and the increase in its levels reduced the shoot length. BA levels higher than 1.0 mg.L<sup>-1</sup> reduced the shoot length and promoted vitrification. BA in the level of 0.5 mg.L<sup>-1</sup> resulted in the induction of 3.3 shoots/explant with means values of 11.0 mm in length in adequate conditions for rooting.

**Index terms:** Peach; micropropagation; stocks

No Brasil, as mudas comerciais de Prunáceas, especialmente do pessegueiro, são obtidas através da enxertia sobre porta-enxertos originários de sementes de qualquer cultivar de maturação tardia, que apresente boa adaptação às condições edafoclimáticas da região. Essas sementes são oriundas da indústria de conserva, onde geralmente ocorrem misturas varietais, causando variabilidade genética e conseqüentemente a desuniformidade nos pomares (Fachinello, 2000).

O porta-enxerto mais utilizado na produção de mudas é o 'Capdeboscq' (*Prunus persica* (L.) Batsch), cultivar de ciclo tardio, cultivada para fins industriais, cuja sementes apresentam boas taxas de germinação. Essa cultivar é originária da Estação Experimental de Pelotas, obtida por polinização livre de um cruzamento entre 'Lake City' e uma seleção local chamada 'Intermediário' (Finardi, 1998).

A necessidade de novas variedades de porta-enxertos encontra-se associada a métodos mais eficientes de propagação e produção de mudas (Fachinello, 2000). Assim, o porta-enxerto 'Carelli', originário de uma seleção da cultivar Capdeboscq, em Videira (SC), apresenta grande potencial para estudos de multiplicação *in vitro* e clonagem em larga escala, devido às suas características de induzir baixo vigor (ananizante) em ameixeira, o

que pode permitir a implantação de pomares adensados, facilitando o manejo e aumentando a produtividade por área.

Para o gênero *Prunus* tem se verificado grande progresso nas técnicas de cultura *in vitro*, com o uso de novos genótipos associado ao avanço técnico-científico nos métodos de propagação *in vitro* (Pérez-Tornero et al., 2000; Silveira et al., 2001; Rogalski, 2002; Silva et al., 2003).

Entretanto, devido às diferenças genótípicas no comportamento *in vitro*, faz-se necessário determinar as condições ideais de multiplicação para cada genótipo. Neste contexto, os reguladores de crescimento são fundamentais para o sucesso da micropropagação e, dentre estes, as citocininas são indispensáveis para a quebra da dominância apical, indução e proliferação de gemas axilares (Leontiev-Orlov et al., 2000; Pérez-Tornero et al., 2000; Rogalski, 2002).

O BAP (6-benzilaminopurina) tem sido a citocinina mais eficaz na multiplicação *in vitro* em diversas espécies do gênero *Prunus* (Leontiev-Orlov et al., 2000; Rogalski, 2002; Rogalski et al., 2003). Para a multiplicação do pessegueiro, o BAP atua na formação e o desenvolvimento de brotações *in vitro* com condições adequadas para a fase de enraizamento (Silveira et al., 2001; Rogalski, 2002; Silva et al., 2003; Channuntapipat et al., 2003).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* 'Carelli' sob o efeito de diferentes concentrações de BAP.

O porta-enxerto 'Carelli' é uma seleção do 'Capdeboscq' selecionado pela Epagri. Plantas-matrizes desta variedade, originárias da Estação Experimental de Videira, são mantidas em sistema de fertiirrigação em casa de vegetação para avaliação e experimentos no Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias / Universidade Federal de Santa Catarina.

Das plantas matrizes foram coletados brotos em crescimento ativo, que foram seccionados em segmentos com três a quatro gemas axilares e posteriormente submetidos ao seguinte processo de desinfestação: lavagem em água e detergente (10 gotas. L<sup>-1</sup> de Tween 20), e posteriormente, sob agitação, por 1 minuto em etanol 70%, 15 minutos em hipoclorito de sódio (1,25%). Após a assepsia, em câmara de fluxo laminar, os explantes foram lavados com água destilada autoclavada (3 x).

As gemas laterais foram introduzidas em tubos de ensaio (25x150 mm) contendo 20 mL de meio de cultura composto de sais e vitaminas de Lepoivre (Quoirin et al., 1977), suplementado com sacarose (20 g.L<sup>-1</sup>), ágar (7 g.L<sup>-1</sup>) e 6-benzilaminopurina (0,5 mg.L<sup>-1</sup>).

Segmentos nodais (0,5 cm) oriundo da fase de estabelecimento *in vitro* foram inoculados em meio de cultura Lepoivre (Quoirin et al., 1977) suplementado com BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup>). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,2-5,3 e todos os componentes do meio foram adicionados antes da autoclavagem (121°C, 20 minutos). O material vegetal foi mantido em câmara de crescimento com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 16 horas de luz (40-45 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>).

Após 21 dias avaliou-se o número de brotos por explante e a altura média das brotações. A variável altura de brotos foi determinada com auxílio de paquímetro, avaliando-se todas as brotações por explante para cada tratamento e repetição. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, com cinco tratamentos e cinco repetições, sendo cada repetição constituída de um frasco com cinco explantes. Os dados obtidos, não transformados, foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e ao teste de separação de médias SNK (5%), de acordo com Sokal & Rohlf (1995).

Os resultados para número de brotos por explante são apresentados na Tabela 1. A análise dos dados permite identificar dois grupos distintos. O primeiro, composto pelo tratamento testemunha, sem presença de BAP, onde não ocorreu a formação de brotações múltiplas. O segundo grupo, composto pelos tratamentos com BAP, com o desenvolvimento de brotações múltiplas. Não foi possível detectar diferenças significativas entre as concentrações testadas.

Os resultados demonstram que para o porta-enxerto 'Carelli' é necessário o uso da citocinina BAP para a proliferação de gemas axilares. As concentrações de BAP usadas (0,5 a 4,0 mg.L<sup>-1</sup>) demonstraram um comportamento semelhante em termos de multiplicação *in vitro*, com taxa de 3,3 a 3,4 brotos por explante. Estes valores são similares aos observados por Silveira et al. (2001), para cinco porta-enxertos de *Prunus* em concentrações de 0,5 e 0,7 mg.L<sup>-1</sup> BAP. No entanto, para três porta-enxertos de *Prunus*, Silva et al. (2003) obtiveram taxas mais elevadas de multiplicação *in vitro*, com valores variando de 10,5 a 16,0 brotações, indicando que o número de brotos é dependente do genótipo. Channuntapipat et al. (2003) trabalhando com um porta-enxerto híbrido de

*Prunus* obteve elevado número médio de brotos por explante (36,0) com a concentração de 5  $\mu\text{M}$  (1,125  $\text{mg.L}^{-1}$ ) de BAP. Trabalhando com o pessegueiro ‘Capdeboscq’ Rogalski (2002) obteve o maior número de brotos (25,9) em resposta à concentração de BAP a 1,5  $\text{mg.L}^{-1}$ . Rogalski et al. (2003) trabalhando com ameixeira Santa Rosa, também não encontraram diferenças significativas para a variável número de brotos por explante, testando diferentes concentrações de BAP. Entretanto, o maior número de brotos por explante (3,6) encontrado foi obtido em resposta à concentração de 2,0  $\text{mg.L}^{-1}$ .

Observou-se que a maior altura média de brotos (16,2 mm) foi obtida no tratamento testemunha (ausência de BAP) que diferiu estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 1). Embora sem diferença entre os tratamentos as menores concentrações (0,5 e 1,0  $\text{mg.L}^{-1}$ ) resultaram em valores médios superiores para a altura dos brotos, com 11,0 e 10,8 mm, respectivamente. Estes resultados são similares aos observados para o pessegueiro (Rogalski, 2002; Silva et al., 2003) e ameixeira (Leontiev-Orlov et al., 2000; Rogalski et al., 2003).

Neste trabalho, observou-se um decréscimo na altura dos brotos com o aumento das concentrações de BAP. Para Leontiev-Orlov et al. (2000) e Rogalski et al. (2003), em ameixeira, a altura média dos brotos *in vitro* foi afetada pela concentração de BAP, reduzindo-se com o aumento da concentração desta citocinina. Para estes autores, concentrações superiores a 0,5  $\text{mg.L}^{-1}$  de BAP inibiram o alongamento das brotações. Channuntapipat et al. (2003), trabalhando com um porta-enxerto híbrido de pessegueiro observaram os maiores valores para tamanho de brotos com a concentração de 10  $\mu\text{M}$  de BAP (2,25  $\text{mg.L}^{-1}$ ).

A citocinina BAP tem sido frequentemente empregada na multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de *Prunus* (Silveira et al., 2001; Silva et al., 2003; Channuntapipat et al., 2003). Entretanto, alta concentração desse regulador de crescimento pode induzir à redução de alongamento de brotos e hiperhidricidade, em prunáceas (Leontiev-Orlov et al., 2000; Rogalski 2002; Rogalski et al., 2003).

Neste presente trabalho, verificou-se que as concentrações de 2,0 e 4,0  $\text{mg.L}^{-1}$  de BAP promoveram hiperhidricidade dos explantes. Esse é um desequilíbrio fisiológico que pode estar relacionado a diferentes causas, entre elas, ao efeito de altas concentrações de citocininas (Debergh et al., 1992; Pérez-Tornero et al., 2000; Rogalski, 2002).

Em conclusão, a metodologia empregada no presente trabalho para a multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* 'Carelli' foi eficaz, com resultados promissores para propagação em larga escala. O uso de BAP na concentração de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> possibilitou regenerar 3,3 brotos/explante com condições adequadas para enraizamento. As concentrações maiores que 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP inibiram o alongamento das brotações e promoveram a hiperhidricidade.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHANNUNTAIPAT, C.; SEDGLEY, M.; COLLINS, G. Micropropagation of almond cultivars Nonpareil and Ne Plus Ultra and the hybrid rootstock Titan X Nemaguard. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.98, n.4, p.473-484, 2003.

DEBERGH, P.; AITKEN-CHRISTIE, J.; COHEN, D.; GROUT, B.; VON-ARNOLD, S.; ZIMMERMAN, R.; ZIV, M. Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.30, p.135-140, 1992.

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

FINARDI, N.L. Métodos de propagação e descrição de porta-enxertos, In: MEDEIROS, C.A B.; RASEIRA, M.C.B. **A cultura do pessegueiro**. 1ed. Pelotas: Embrapa-CPACT, 1998, volume único, p.100-129.

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

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

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

ROGALSKI, M. **Propagação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus*: cultura de embriões, estabelecimento, multiplicação, enraizamento e aclimatização**, 2002. 92f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

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

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

SILVEIRA, A.C.P.; FACHINELO, J.C.; FORTES, G.R. de L.; CITADIN, I.; RODRIGUES, A C.; QUEZADA, A C.; SILVA, J.B. 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.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. Biometry. New York: W.H. Freeman and Company, 1995. 776p.

**TABELA 1.** Efeito do regulador vegetal BAP no número e altura das brotações desenvolvidas para o porta-enxerto de *Prunus* ‘Carelli’. UFSC/CCA/LMBV, Florianópolis, 2003.

<b>Concentrações de BAP (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Número de brotos por explante*</b>	<b>Altura média dos brotos* (mm)</b>
0,0	1,0 a	16,2 a
0,5	3,3 b	11,0 b
1,0	3,4 b	10,8 b
2,0	3,3 b	7,5 b
4,0	3,4 b	6,6 b
<b>F</b>	13,7	5,8
<b>C.V. (%)</b>	22,1	33,5

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste SNK (0,05).

**RE-FORMULAÇÃO LEPOIVRE ( Lepoivre et al., 1977) - MODIFICADO**

<b>SOLUÇÃO</b>	<b>COMPOSTO</b>	<b>Com. g/L da solução estoque</b>	<b>Volume para 1 litro de meio</b>	<b>Conc. Final de 1 litro de meio (g)</b>
<b>A</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	4,0	100 ml	0,400
	KNO <sub>3</sub>	18,0		1,800
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	12,0		1,200
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,7		0,270
	MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	3,6		0,360
<b>B</b>	Na <sub>2</sub> EDTA.2 H <sub>2</sub> O	3,72	10 ml	0,03735
	FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	2,78		0,02785
<b>C</b>	MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0,20	5 ml	0,001
	ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	1,72		0,0086
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,24		0,0062
	KI	0,016		0,00008
	CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O	0,005		0,000025
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2 H <sub>2</sub> O	0,05		0,00025
	CoCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O	0,005		0,000025
<b>VITAMINAS (MS)</b>	Tiamina	0,02	5 ml	0,0001
	Piridoxina	0,1		0,0005
	Ác. Nicotínico	0,1		0,0005
	Glicina	0,4		0,002
	Inositol	20,0		0,1
<b>Fonte de Carbono</b>	Sacarose			20,0
<b>Agente Geleificante</b>	Agar-agar			7,0
<b>pH</b>				5,2 – 5,3

**Autoclavagem:** 120 °C durante 15/20 minutos