

ACLIMATIZAÇÃO DE PORTA-ENXERTOS DE *Prunus* sp. MICROPROPAGADOS¹

MARCELO ROGALSKI², LIZIANE KADINE ANTUNES DE MORAES³, CLAUDIA FELISBINO⁴, LEANDRO CRESTANI⁵, MIGUEL PEDRO GUERRA⁶, APARECIDO LIMA DA SILVA⁷

RESUMO – A fase de aclimatização é considerada limitante para a maior parte das plantas micropropagadas pelas altas taxas de perdas que podem acarretar. A cultura *in vitro* tem determinado, para algumas espécies, a alteração de características morfológicas, anatômicas e fisiológicas que dificultam a sua aclimatização. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sobrevivência de plantas dos porta-enxertos de *Prunus* Capdeboscq e GF677, e das seleções VP411 e VP417 durante o processo de aclimatização. Brotos com 2-3 cm foram inoculados em meio de cultura Lepoivre, suplementado com 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹ de AIB. Após 15 dias as plantas foram transferidas para bandejas alveoladas contendo substrato comercial Plantmax®, cobertas com uma lâmina de vidro transparente e mantidas em sala de aclimatização, com temperatura de 27±1°C, fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa de 60µmol.m⁻².s⁻¹ e posteriormente em câmara de nebulização intermitente. A percentagem de sobrevivência das plantas foi afetada significativamente pela concentração de AIB, pelo genótipo e pela interação concentração de AIB x genótipo. As maiores taxas de sobrevivência foram de 92% para o porta-enxerto Capdeboscq na concentração de 1,0 mg.L⁻¹ de AIB; 80% para a seleção VP417 com 0,5 mg.L⁻¹; 84% para a seleção VP411 e 64% para o porta-enxerto GF677, ambos com 0,1 mg.L⁻¹ de AIB. A formação de calos na base dos explantes afetou negativamente a sobrevivência das plantas.

Termos para indexação: Prunáceas, propagação *in vitro*, AIB, sobrevivência

ACCLIMATIZATION OF MICROPROPAGATED *Prunus* sp. ROOTSTOCKS

ABSTRACT – Acclimatization is a phase of micropropagation associated with frequent losses in plant survival. The *in vitro* culture conditions may determine in some species, the formation of plants with altered morphology, anatomy and physiology that affect their acclimatization. The objective of the present work was to evaluate the rate of plant survival during acclimatization of the *Prunus* rootstocks Capdeboscq and GF677, and the selections VP411 and VP417. Shoots of 2-3 cm long were inoculated in rooting Lepoivre medium supplemented with IBA (0.1, 0.5, 1.0 and 2.0 mg.L⁻¹). After 15 days, the plants were transferred to styrofoam trays with cells containing commercial mixed soil Plantmax®. The trays were placed in plastic boxes closed with a transparent glass plate and maintained in acclimatization room in 27±1°C temperature, light period of 16 hours and 60µmol.m⁻².s⁻¹ of light irradiation, and then transferred to intermittent nebulization chamber. The plant survival rate was significantly affected for the IBA treatments, genotype and genotype x IBA concentration interaction. The best survival rates obtained were Capdeboscq (92%) with 1.0 mg.L⁻¹ IBA, VP417 (80%) with 0.5 mg.L⁻¹ IBA, VP411 (84%) and GF677 (64%), respectively with 0.1 mg.L⁻¹ IBA. The callus formation on the basal region of explants negatively affected the plant survival.

Index terms: Peach tree, *in vitro* propagation, IBA, plant survival

INTRODUÇÃO

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

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

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

No entanto, o processo de aclimatização no gênero *Prunus* tem apresentado bons resultados com índice de sobrevivência variável de 84-93% (Borkowska, 1985; Campana et al., 1994; Radice et al., 1999). Além disso, Marín et al. (1988) demonstraram que plantas micropropagadas de *Prunus cerasus* L. apresentavam xilema radicular contínuo e funcional.

O emprego de auxinas na fase de indução do enraizamento *in vitro* tem revelado eficiência, promovendo acréscimo na taxa de sobrevivência

das plantas na aclimatização (Al-Maarri et al., 1994; Campana et al., 1994; Yepes e Aldwinckle, 1994; Murai et al., 1997). O tratamento prévio de AIB no enraizamento do porta-enxerto de *Prunus* Mr S 2/5 aumentou consideravelmente a porcentagem de plantas sobreviventes na aclimatização (Radice et al. 1999). Entretanto, para os porta-enxertos GF677 e GF1869, o uso de concentrações mais elevadas de AIB, favoreceram a formação de calos e prejudicaram a taxa de sobrevivência na aclimatização (Ruzic et al., 1984 e Campana et al., 1994).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a taxa de sobrevivência na fase de aclimatização dos porta-enxertos de *Prunus* (Capdeboscq, GF677, VP411 e VP417) micropropagados sob diferentes concentrações de AIB.

MATERIAL E MÉTODOS

Os porta-enxertos Capdeboscq (*Prunus persica* (L.) Batsch), GF677 (*Prunus amygdalus* Batsch x *Prunus persica* (L.) Batsch) e as seleções da variedade Capdeboscq VP411 e VP417 (Porta-enxertos da Vitroplanta Biotecnologia Ltda – Videira-SC.) foram estabelecidas e multiplicadas *in vitro* em meio de cultura de Lepoivre (Quoirin et al., 1977) através de ápices caulinares e gemas laterais de plantas matrizes mantidas em casa de vegetação no Departamento de Fitotecnia/CCA/UFSC.

As microestacas com 2-3 cm foram inoculadas em meio de enraizamento, composto de sais e vitaminas de Lepoivre (Quoirin et al., 1977) e suplementado com sacarose (20,0 g.L⁻¹) ágar (7,0 g.L⁻¹) e diferentes concentrações de ácido indolbútrico (AIB). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,2-5,3 antes da autoclavagem à 121°C durante 15 minutos.

O material vegetal foi mantido em câmara de crescimento com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40-45 µmol.m⁻².s⁻¹, fornecidas por lâmpadas fluorescentes brancas frias.

Após 15 dias em fase de enraizamento *in vitro*, as microestacas

¹ (Trabalho 157/2002). Recebido: 26/09/2002. Aceito para publicação: 30/04/2003.

² Biólogo, Mestre, Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Fitotecnia, C.P. 476, 88040-900, Florianópolis, SC, (48) 331-5330.

³ Acadêmica em Agronomia da Universidade Federal de Santa Catarina, C.P. 476, 88040-900, Florianópolis, SC, (48) 331-5330, bolsista RHAE/CNPq.

⁴ Acadêmica em Biologia da Universidade do Oeste de Santa Catarina, C.P. 187, 89560-000, Videira, SC, (49) 551-1422, bolsista RHAE/CNPq.

⁵ Eng^o. Agr^o. Empresa Vitroplanta - Biotecnologia Ltda, C.P. 150, 89.560-000, Videira, SC, (49) 566-2690, bolsista RHAE/CNPq.

⁶ Professor Titular da Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Fitotecnia, C.P. 476, 88040-900, Florianópolis, SC, (48) 331-5330.

⁷ Prof. Adjunto da Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Fitotecnia, C.P. 476, 88040-900, Florianópolis, SC, (48) 331-5330, alsilva@cca.ufsc.br.

foram retiradas dos frascos, lavadas em água corrente para remover o meio de cultura aderido às raízes e plantadas em bandejas alveoladas contendo substrato. As bandejas foram colocadas em caixas plásticas fechadas com uma lâmina de vidro transparente e mantidas durante 15 dias em sala de aclimatização com temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, e posteriormente transferidas para túnel de nebulização intermitente por mais 15 dias quando avaliou-se a percentagem de sobrevivência.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 4x4: Fator A foi composto por quatro genótipos (Capdeboscq, GF677, VP411 e VP417), combinados com quatro concentrações de AIB (0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 mg.L^{-1}). Cada unidade experimental foi constituída por cinco microestacas e repetidas cinco vezes. Os dados referentes à percentagem de sobrevivência foram coletados aos 30 dias em cultura *ex vitro*. Estes dados foram submetidos à análise de Variância (ANOVA) e ao teste de separação de médias SNK (5%). Dados médios referentes aos efeitos dos níveis de AIB para cada genótipo foram submetidos à análise de regressão, conforme recomendação de Sokal e Rohlf (1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A percentagem de sobrevivência das plantas foi afetada significativamente pelo genótipo, concentração de AIB e interação entre genótipo x AIB. Os porta-enxertos utilizados revelaram diferentes respostas para a percentagem de sobrevivência em relação aos níveis de AIB testados (Tabela 1). O porta-enxerto Capdeboscq apresentou a maior taxa de sobrevivência (92%) na concentração de 1,0 mg.L^{-1} de AIB, seguido pelas seleções VP411 e VP417 (84 e 80%) nas concentrações de 0,1 e 0,5 mg.L^{-1} , respectivamente. O GF677 apresentou taxas similares de plantas sobreviventes (60 a 64%) para as concentrações de 0,1 a 1,0 mg.L^{-1} de AIB.

A maior e significativa taxa média de sobrevivência entre os genótipos, foi observada para o porta-enxerto Capdeboscq (62%). Valores intermediários de 57,0 e 55,0% de sobrevivência foram constatados nos genótipos GF677 e VP417, respectivamente. Estes resultados são similares àqueles obtidos por Morini et al. (1991), que observaram taxa de sobrevivência de 60% entre diferentes clones de *Prunus cerasifera* (Ehrh.), e superiores aos valores constatados de 16,7 a 31,2% na aclimatização de *Prunus cerasus* L. por Marin e Gella (1987).

TABELA 1 - Percentagem de sobrevivência na aclimatização de quatro porta-enxertos de *Prunus* (Capdeboscq, GF677, VP417 e VP411), referente ao uso de quatro níveis de AIB (0,1, 0,5, 1,0 e 2,0 mg.L^{-1}) no enraizamento, após 30 dias de cultura *ex vitro*. UFSC, Florianópolis-SC, 2002.

Genótipo	AIB (mg.L^{-1})				Média*
	0,1	0,5	1,0	2,0	
'Capdeboscq'	44,0 d	64,0 bcd	92,0 a	48,0 d	62,0 A
'GF677'	64,0 bcd	60,0 cd	60,0 cd	44,0 d	57,0 B
'VP417'	68,0 bcd	80,0 abc	48,0 d	24,0 e	55,0 B
'VP411'	84,0 ab	60,0 cd	16,0 e	16,0 e	44,0 C
Média*	65,0 a	66,0 a	54,0 b	33,0 c	54,5
CV (%)					22,1
F (Genótipo)					32,4**
F (AIB)					7,9**
F(Genótipo x AIB)					15,6**

* Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna (fator genótipo), na linha minúscula (fator nível de AIB) e na interação entre fatores, não diferem significativamente pelo teste SNK (5%).

** $P \leq 0,01$ pelo teste SNK.

A Figura 1 apresenta, para o intervalo de 0,1 a 2,0 mg.L^{-1} de AIB, as distribuições dos pontos médios, suas respectivas equações e os coeficientes de determinação (R^2). Segundo as projeções teóricas das equações, apresentadas para cada porta-enxerto, pode-se inferir que para o Capdeboscq, a percentagem máxima de sobrevivência estimada (87,7%) seria atingida com 1,09 mg.L^{-1} de AIB. Para o GF677 e as seleções VP411 e VP417, as taxas de sobrevivência máximas estimadas seriam de 65,2; 72,5 e 76,8%, respectivamente, alcançadas na concentração de 0,1 mg.L^{-1} de AIB. Verifica-se que para estes 3 genótipos o aumento da concentração de AIB promoveu uma redução na taxa de sobrevivência na aclimatização. Resultados similares

aos observados por Campana et al. (1994) na aclimatização do porta-enxerto de *Prunus* Damas GF1869.

$$y_{VP417} = -27,33x + 79,60; R^2 = 0,84$$

$$y_{VP411} = -35,64x + 76,08; R^2 = 0,75$$

$$y_{GF677} = -10,29x + 66,27; R^2 = 0,91$$

$$y_{Capdeboscq} = -47,44x^2 + 103,73x + 31,02; R^2 = 0,94$$

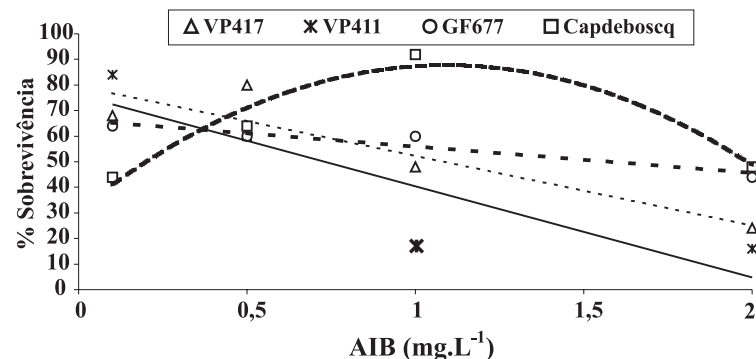


FIGURA 1 - Efeito de AIB na percentagem de sobrevivência durante a aclimatização dos porta-enxertos de *Prunus* Capdeboscq e GF677 e das seleções VP417 e VP411, 30 dias de cultura *ex vitro*. UFSC, Florianópolis-SC, 2002.

Os valores médios da taxa de sobrevivência para todos os porta-enxertos aclimatizados em relação ao efeito de AIB (0,1 a 2,0 mg.L^{-1}) são determinados pela equação e o coeficiente de determinação (R^2), mostrados na Figura 2. Através da análise da equação apresentada, pode-se inferir que, o aumento nos níveis de AIB promove um decréscimo na percentagem de plantas sobreviventes durante a fase de aclimatização. Observa-se também uma tendência de queda acentuada na taxa de sobrevivência a partir de 1,0 mg.L^{-1} de AIB.

A redução média da taxa de sobrevivência para os porta-enxertos, com o aumento da concentração de AIB, pode estar relacionada ao excesso de auxina e/ou à alta formação de calos observada na base das microestacas (Figura 3b). Observou-se que os porta-enxertos testados apresentaram comportamentos diferentes com relação à formação de calos. O GF677 não apresentou formação de calos, porém notou-se uma queda acentuada das folhas nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg.L^{-1} de AIB. O Capdeboscq apresentou formação de calos somente na concentração de 2,0 mg.L^{-1} , enquanto que as seleções VP417 e VP411 tiveram formação de calos a partir da concentração de 1,0 mg.L^{-1} de AIB.

Ruzic et al. (1984) na micropropagação do porta-enxerto GF677 também verificaram que a concentração de 2,0 mg.L^{-1} de AIB demonstrou ser excessiva, promovendo a formação de calos na fase de enraizamento. Também Campana et al. (1994) observaram que para o porta-enxerto de *Prunus* Damas GF1869 enraizado *in vitro*, a sobrevivência das plantas foi afetada significativamente com a utilização de 5,0 mg.L^{-1} de AIB. Para estes autores, a abundante formação de calos reduziu significativamente as conexões vasculares das raízes formadas na base das microestacas. Além disso, estas raízes foram ineficientes para suportar os requerimentos de evapotranspiração nas condições *ex vitro*. Para várias espécies, a utilização de altas concentrações de auxinas resulta na formação de calos e raízes anormais, afetando a sobrevivência dos explantes durante a aclimatização (Welander, 1983; Al-Maarri et al., 1994; Yepes e Aldwinckle, 1994).

Neste trabalho, observou-se que as microestacas que não enraizaram *in vitro*, em resposta às menores concentrações de 0,1 e 0,5 mg.L^{-1} AIB (dados não publicados) conseguiram a formação de raízes posteriormente no substrato, durante a fase de aclimatização. Observações semelhantes foram relatadas por Pietropaolo e Reisch (1984) na aclimatização de *Prunus domestica* L. Estes autores observaram que explantes da ameixeira Stanley não enraizados *in vitro* desenvolveram sistema radicular no substrato, apresentando alta taxa de sobrevivência das plantas nas condições *ex vitro*.

No presente trabalho observou-se visualmente, na fase de aclimatização, que o início do crescimento da gema apical e a formação de novas folhas ocorreram a partir do quarto dia, com destaque para as plantas que foram enraizadas nas concentrações até 1,0 mg.L^{-1} de AIB. As plantas submetidas à concentração de 2,0 mg.L^{-1} retardaram o crescimento da parte aérea.

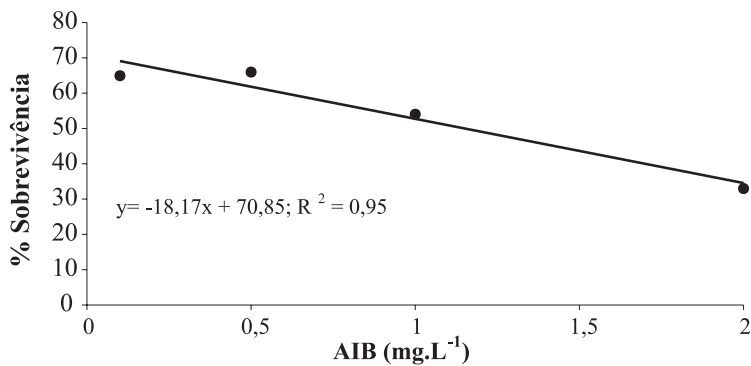


FIGURA 2 - Valores médios totais do efeito de AIB na percentagem de sobrevivência na aclimatização dos porta-enxertos de *Prunus* Capdeboscq e GF677, e das seleções VP417 e VP411, após 30 dias em cultura *ex vitro*. UFSC, Florianópolis-SC, 2002.

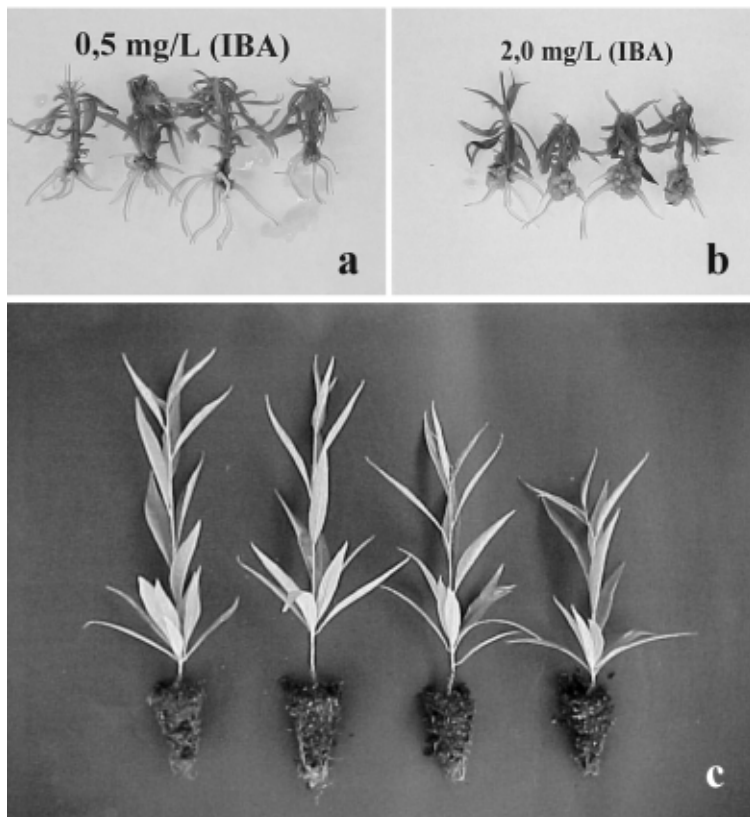


FIGURA 3 - Aspectos do enraizamento *in vitro* e posterior aclimatização de plantas de porta-enxertos de *Prunus*. **a**) Brotações sem a formação de calos (Capdeboscq); **b**) brotações com alta formação de calos (VP417) e, **c**) plantas de Capdeboscq após 30 dias em processo de aclimatização. UFSC,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

A parada de crescimento da parte aérea durante a fase de aclimatização pode comprometer a sobrevivência das plantas (Marín e Gella, 1987). Para estes autores, esta parada do crescimento pode estar relacionada diretamente ao efeito do AIB no crescimento do ápice e/ou à ocorrência de uma competição de crescimento entre o ápice caulinar e as raízes. Observou-se, no presente trabalho, que o uso de AIB na indução ao enraizamento para os porta-enxertos na concentração de 1,0 mg.L⁻¹ para o Capdeboscq, 0,5 mg.L⁻¹ para o VP417 e 0,1 mg.L⁻¹ para o GF677 e VP411 promoveram a aclimatização das plantas *ex-vitro* sem afetar negativamente o crescimento da parte aérea.

CONCLUSÕES

A aclimatização dos porta-enxertos de *Prunus* sp. foi eficaz, resultando em taxas elevadas de sobrevivência *ex vitro*. O uso de AIB na indução ao enraizamento *in vitro* afetou a sobrevivência das plantas na fase de aclimatização. A concentração de AIB que favoreceu a sobrevivência *ex vitro* para cada porta-enxerto foi: Capdeboscq: 1,0 mg.L⁻¹, VP417: 0,5 mg.L⁻¹

¹, GF677 e VP411: 0,1 mg.L⁻¹ de AIB.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-MAARRI, K.; ARNAUD, Y.; MIGINIAC, E. Micropropagation of *Pyrus communis* cultivar Passe Crassane seedlings and cultivar Williams: Factors affecting root formation *in vitro* and *ex vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.58, p. 207-214, 1994.
- BORKOWSKA, B. Micropropagation of sour cherry, cultivar Schattenmorelle, **Acta Horticulturae**, Leuven, v.169, p.329-333, 1985.
- CAMPANA, B.M.; CASTAGNARI, F.; COVATTA, F.; HENNINGS, M.; POLERO, H.J. Enraizamiento *in-vitro* del portainjerto Damas GF 1869 (*Prunus insititia* x *Prunus spinosa*), **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.16, n.3, p. 85-94, 1994.
- DESJARDINS, Y. Photosynthesis *in vitro* – on the factors regulating CO₂ assimilation in micropropagation systems, **Acta Horticulturae**, Leuven, v.393, p.45-61, 1995.
- MARÍN, J.A.; GELLA, R. Acclimatization of the micropropagated cherry rootstock ‘Masto de Montañana’ (*Prunus cerasus* L.), **Acta Horticulturae**, Leuven, v.212, p. 603-606, 1987.
- MARÍN, J.A.; GELLA, R.; HERRERO, M. Stomatal structure and functioning as a response to environmental changes in acclimatized micropropagated *Prunus cerasus* L., **Annals of Botany**, London, v.62, p. 663-670, 1988.
- MORINI, S.; LORETI, F.; SCIUTTI, R. Response of some Mr.S. plum clones to *in vitro* propagation, **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 283, p. 207-212, 1991.
- MURAI, Y.; HARADA, H.; YAMASHITA, H. *In vitro* propagation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cv. ‘Bakuoh Junkyou’, **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Tokyo, v.66, p. 475-480, 1997.
- PIETROPAOLO, P.A.; REISCH, B.I. Micropropagation of ‘Stanley’ plum, **HortScience**, Alexandria, v.19, n.4, p. 535-536, 1984.
- POSPÍŠILOVÁ, J.; HAISEL, D.; SYNKOVA, H.; CATSKY, J.; WILHELMOVÁ, N.; PLZÁKOVÁ, S.; PROCHÁRKOVÁ, D.; SRÁMEK, F. Photosynthetic pigments and gas exchange during *ex vitro* acclimation of tobacco plants as affected by CO₂ supply and abscisic acid, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.61, p.125-133, 2000.
- POSPÍŠILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLECEK, P.; HAISEL, D.; PLZÁKOVÁ, S. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions, **Biologia Plantarum**, Prague, v.42, n.4, p. 481-497, 1999.
- PREECE, J.E.; SUTTER, E.G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field, In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Ed.) **Micropropagation: technology and application**. Kluwer: Dordrecht, 1991. p. 71-93.
- QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P.; BOXUS, P. Un premier bilan de 10 années de recherches sur les cultures de méristèmes et la multiplication *in vitro* de fruitiers ligneux. **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.
- RUZIC, D.; ROSATI, P.; MARINO, G. Effetto dei fitoregolatori nella micropropagazione dell’ibrido pesco x mandorlo GF677, **Rivista Ortoflorofrutticola Italiana**, Firenze, v.68, p.413-422
- SCIUTTI, R.; MORINI, S. Effect of relative humidity in *in vitro* culture on some growth characteristics of a plum rootstock during shoot proliferation and rooting and on plantlet survival, **Advances in Horticultural Science**, Firenze, v.7, p. 153-156, 1993.
- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**. New York: W.H. Freeman and Company, 1995.
- WELANDER, M. *In vitro* rooting of the apple rootstock M26 in adult and juvenile growth phases and acclimatization of the plantlets, **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.58, p. 231-238, 1983.
- YEPES, L.M.; ALDWINCKLE, H.S. Micropropagation of thirteen *Malus* cultivars and rootstock, and effect of antibiotics on proliferation, **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.15, p.55-67, 1994.