

MARIA APARECIDA MOREIRA

EFEITOS DO BENOMYL E DO ÁCIDO INDOLBUTÍRICO NA
PROPAGAÇÃO "IN VITRO" DO PORTA ENXERTO

Citrus sunki Hort. ex Tan

[REDACTED]

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura de Lavras, como parte das exigências do
curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de
concentração Fitotecnia, para obtenção do título
de «MESTRE».

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS
LAVRAS — MINAS GERAIS
1993

F. V. ...
M. O. ...

MARIA APARECIDA MOURA

EFEITOS DO BENOMYL E DO ÁCIDO INDOLBUTÍRICO NA
PROPAGAÇÃO "IN VITRO" DO PORTA ENXERTO

Clitoria siliqua Hort. ex Tan.



Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura de Lavras, como parte das exigências do
curso de Pós-Graduação em Agronomia, para a
consecução do título de MESTRE.



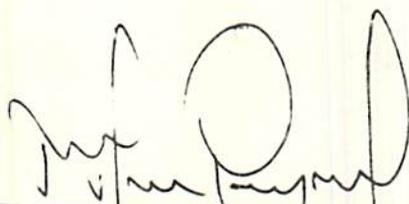
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS
LAVRAS — MINAS GERAIS

1993

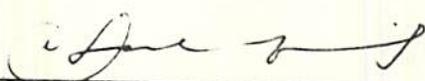
**EFEITOS DO BENOMYL E DO ÁCIDO INDOLBUTÍRICO NA PROPAGAÇÃO
"IN VITRO" DO PORTA-ENXERTO *Citrus sunki* Hort. ex Tan**

MARIA APARECIDA MOREIRA

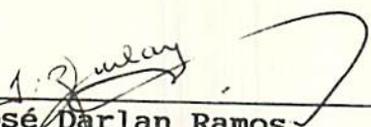
Aprovada em: 30 de setembro de 1993



Prof. Dr. Moacir Pasqual
Orientador



Prof. Dr. Nilton Nagib Jorge Chalfun



Prof. Dr. José Darlan Ramos

À minha avó Ana Emilia do Prado

Aos meus pais Osvaldo e Maria

Aos meus irmãos Messias, Brina, Angela e Tereza

À José Lúcio Bianchini

E especialmente à Flávio, Eliza e Andrea

Dedico

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo apoio e confiança.

A meu esposo José Lúcio Bianchini pelo incentivo e paciência.

Aos meus filhos Fávio, Eliza e Andrea pela compreensão das ausências.

Ao prof. Moacir Pasqual pela orientação, ensinamentos e pela liberdade de trabalho e opiniões.

Ao Nazareno e Denise pelas sugestões.

Aos laboratoristas Evaldo e Vantuil pela constante e eficiente ajuda.

Ao amigo Arie Fitzgerald Blank pelo apoio em diversas ocasiões.

Ao Prof. Nagib e Darlan pela participação e sugestões.

Aos colegas do laboratório de Cultura de Tecidos.

A ESAL pela oportunidade.

Ao CNPq pela ajuda financeira.

E a todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE QUADROS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1. Aspectos Gerais dos Citros	4
2.2. Características do Porta-enxerto Sunki	6
2.3. Cultura de Tecidos	8
2.3.1. Proliferação de ramos e brotos	10
2.3.2. Enraizamento dos Brotos	11
2.4. Benomyl	12
2.4.1. Características	12
2.4.2. Efeitos	13
2.5. Aclimatação	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Local	18
3.2. Obtenção do Material	18
3.2.1. Germinação das sementes	18
3.2.2. Multiplicação do material	19
3.3. Efeito do Benomyl na Multiplicação do Porta-enxerto Sunki	19
3.3.1. Procedimentos	20

	Página
3 3.1.1. Experimento A	22
3 3.1.2. Experimento B	23
3.4. Efeito da Incubação em IBA no Enraizamento "In Vivo" do Porta-enxerto Sunki	24
3.4.1. Procedimentos	24
3.4.1.1. Experimento C	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. Número de Sementes por Fruto	28
4.2. Germinação	28
4.3. Multiplicação do Material	29
4.4. Efeito do Benomyl na Multiplicação do Porta-enxerto Sunki	29
4.4.1. Experimento A	29
4.4.2. Experimento B	35
4.5. Efeito da Incubação em IBA no Enraizamento "In Vivo" do Porta-enxerto 'Sunki'	38
4.5.1. Experimento C	38
5. CONCLUSÕES	43
6. RESUMO	44
7. SUMMARY	46
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
01 Representação da metodologia da incubação em IBA. ESAL, Lavras - MG, 1993	25
02 Número médio estimado de brotações $\geq 1,0$ cm em função de diferentes doses (0 a 150mg/L) de Benomyl para o porta-enxerto 'Sunki'. ESAL, Lavras - MG, 1993	31
03 Número médio estimado de brotações $> 1,0$ cm em função de diferentes doses de BAP para o porta-enxerto Sunki. ESAL, Lavras - MG, 1993	31
04 Número médio estimado do total de brotos em função de diferentes doses de Benomyl dentro de cada dose de BAP para o porta-enxerto 'Sunki'. ESAL, Lavras - MG, 1993	33
05 Número médio estimado do total de brotos em função de diferentes doses de BAP dentro de cada dose de Benomyl para o porta-enxerto 'Sunki'. ESAL, Lavras - MG, 1993	34

Figura	Página
06 Número médio estimado do total de brotos em função de diferentes doses (0 a 400mg/L) de Benomyl para o porta-enxerto Sunki . ESAL, Lavras - MG, 1993	37
07 Número médio estimado de brotações $\geq 1,0$ cm em função de diferentes doses (0 a 400mg/L) de Benomyl para o porta-enxerto 'Sunki'. ESAL, Lavras - MG, 1993	37
08 Resultado médio do peso da matéria seca de raiz em função de diferentes tempos de incubação em IBA para o porta-enxerto 'Sunki'. ESAL, Lavras - MG, 1993	40

LISTA DE QUADROS

Quadro	Página
01 Composição do meio MURASHIGE & SKOOG (1962) - MS modificado. ESAL, Lavras - MG, 1993	21
02 Tratamentos utilizados no experimento A. ESAL, Lavras -MG, 1993	22
03 Tratamentos utilizados no experimento B. ESAL, Lavras -MG, 1993	23
04 Tratamentos utilizados no experimento C. ESAL, Lavras -MG, 1993	26
05 Resumo da análise de variância para número médio de brotos maiores que 1,0cm e do número total de brotos do porta-enxerto Sunki nas diferentes concentrações de BAP e Benomyl. ESAL, Lavras - MG, 1993	30
06 Resultados médios do número de brotos $\geq 1,0$ cm. ESAL, Lavras - MG, 1993	30

Quadro	Página
07 Resultados médios do número total de brotos. ESAL, Lavras - MG, 1993	32
08 Resumo da análise de variância para o número total de brotos número de brotos \geq 1cm do porta-enxerto 'Sunki' nas diferentes concentrações de Benomyl. ESAL, Lavras - MG, 1993	35
09 Resultados médios do número total de brotos e número de brotos \geq 1cm do porta-enxerto 'Sunki'. ESAL, Lavras - MG, 1993	36
10 Resumo da análise de variância para o peso da matéria seca de raiz do porta-enxerto 'Sunki' "in vivo". ESAL, Lavras - MG, 1993	39
11 Resultados médios do peso da matéria seca de raiz "in vivo" do porta-enxerto 'Sunki'. ESAL, Lavras - MG, 1993	40

1. INTRODUÇÃO

A citricultura se destaca entre as principais atividades agrícolas mundiais e o Brasil é o maior exportador de suco concentrado congelado e, no entanto, tem uma produtividade média considerada baixa, sendo necessário desenvolver projetos que possam introduzir e desenvolver novas tecnologias para a citricultura brasileira. Assim, estudos que venham viabilizar uma diversificação dos porta-enxertos utilizados para os citros no Brasil, são importantes e urgentes. O porta-enxerto *Citrus sunki* Hort. ex Tan (Sunki) pode se constituir numa alternativa devido a determinadas características favoráveis que lhe são atribuídas como: boa produção em peso e qualidade do fruto, indução a precocidade de produção e, até o momento, é considerado tolerante ao declínio; características importantes que são conferidas às copas.

As técnicas de cultura de tecidos, para citricultura permitem a obtenção de plantas isentas de viroses, multiplicação rápida de porta-enxertos e cultivares copa, além de servirem como suporte aos trabalhos de melhoramento convencional, que é dificultado pela ocorrência de poliembrionia, esterilidade gamética e longo período juvenil das plantas oriundas de sementes.

A cultura de tecidos de citros teve início na década de 50 sendo que o progresso maior foi com o aparecimento dos meios nutritivos de "MS" (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e "MT" (MURASHIGE & TUCKER, 1969) que fornecem as substâncias essenciais para o crescimento e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento "in vitro". O meio nutritivo definido e de composição conhecida é importante porque só assim é possível a reprodução dos resultados em qualquer época ou em qualquer lugar. A adição de misturas complexas ao meio podem ter composição variável de uma fonte ou lote para outro (CALDAS et alii, 1990) e substâncias como fungicidas e antibióticos utilizadas incorporadas ao meio para controle de contaminações devem ser completamente avaliadas para que se mantenha a composição definida do meio.

O Benomyl é um fungicida sistêmico que é utilizado nos meios de cultura para controle de contaminações. No entanto, alguns autores observaram que esse fungicida tem algumas propriedades reguladoras de crescimento e trabalhos tem sido feitos no sentido de evidenciar esse efeito, sem o propósito de determinar a natureza da(s) substância(s) que apresenta(m) atividade semelhante à citocinina no preparo comercial.

Nesse trabalho objetivou-se estudar esse referido efeito do Benomyl na multiplicação "in vitro" do porta-enxerto 'Citrus Sunki Hort ex Tan.

Um outro aspecto que merece importância na micropropagação é a fase de aclimatação que consiste no transplântio das plantas

micropropagadas para o substrato. É uma fase crítica e representa em alguns casos um fator limitante.

Algumas técnicas têm sido estudadas no sentido de não se perder plantas obtidas "in vitro" na aclimatação e a incubação em IBA (ácido indolbutírico) é uma dessas técnicas.

O outro objetivo desse trabalho foi verificar o efeito do IBA sobre o enraizamento de brotos produzidos "in vitro", por ocasião de sua transferência dos tubos de ensaio para condições de aclimatação em casa de vegetação.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Aspectos Gerais dos Citros

Os citros pertencem aos gêneros *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella*, *Eremocitrus*, *Microcitrus* e *Clymenia*, dos quais os três primeiros apresentam maior interesse comercial, especialmente, o *Citrus* (CHAPOT, 1975).

A citricultura se destaca entre as principais atividades agrícolas mundiais, sendo cultivada em ampla área geográfica (CAMPOS, 1976).

O Brasil é conhecido mundialmente como um dos principais países produtores de citros e o maior exportador de suco concentrado congelado destacando São Paulo, dentre os estados brasileiros, como o principal produtor, com 80% do total.

Entretanto, a produtividade média dos pomares de citros paulistas está em torno de 80kg de fruto/planta, considerada baixa e que poderá ser melhorada com adoção de tecnologias mais aprimoradas no estabelecimento e condução dos pomares (RODRIGUEZ, 1988).

A propagação dos citros é feita através da enxertia porque, segundo CUNHA SOBRINHO et alii (1980), as plantas obtidas a partir de sementes exigem de 6 a 8 anos para produzir os

primeiros frutos esse tempo pode ser reduzido com a utilização da enxertia e além desse aspecto, segundo SALIBE (1978) várias características da copa podem ser influenciadas pelo porta-enxerto como: vigor, produtividade, qualidade do fruto, fertilidade do pólen, precocidade de produção, transpiração, composição inorgânica das folhas e frutos, capacidade de absorção, síntese e utilização de nutrientes, tolerância a salinidade, resistência à seca, à geada, à pragas e doenças.

No Brasil, segundo POMPEU JUNIOR (1980), o principal porta-enxerto utilizado, por quase duas décadas (1920-1940), foi a laranja azeda que substituiu a laranja caipira por esta apresentar baixa resistência à seca e à gomose de PHYTOPHTHORA. Com a introdução da tristeza em 1937, as plantas enxertadas em laranja azeda por serem intolerantes ao vírus, pereceram. Na procura de porta-enxertos tolerantes, a laranja azeda foi sendo substituída pelo limão cravo que apresenta excepcionais qualidades satisfazendo tanto ao produtor de mudas quanto ao citricultor. Em menor proporção foi sendo utilizado o limão rugoso e a tangerina 'Cleópatra'.

Vários outros porta-enxertos são utilizados mundialmente como: as laranjas doces, tangerinas Cleopatra e Sunki, citranges Troyer e Carrizo, Calamondin, citrumelo Swingle (4475), limões Katta-Karna e Volkameriano, lima da Pérsia, Yuzu e Alemow.

Atualmente, verifica-se o abandono de três dos mais importantes porta-enxertos: a laranja azeda devido a tristeza e do limão Rugoso e Trifoliata devido ao declínio cujas causas

ainda não são conhecidas. Com destaque apenas ao limão Cravo torna-se necessária e urgente a diversificação dos porta-enxertos pois um colapso desse porta-enxerto poderá causar prejuízos econômicos e sociais significativos à citricultura.

Sob essa perspectiva torna-se necessário desenvolver projetos de produção de novos porta-enxertos, bem como introduzir e desenvolver novas tecnologias que possibilitem a redução do tempo para sua rápida propagação.

O porta-enxerto Sunki, pelas características que apresenta, é indicado para participar dessa diversificação.

2.2. Características do Porta-enxerto 'Sunki'

Citrus sunki Hort. ex Tan foi classificada em 1927 por Tanaka e tem os nomes comuns de Sunki mandarim e Sunki. É um porta-enxerto muito utilizado na China (GIACOMETTI, 1980).

No Brasil, TEOFILO SOBRINHO (1991) cita algumas características desse porta-enxerto como a maturação dos frutos ocorrendo de maio a julho, com uma média de 3 sementes/fruto.

Outras características, como porta-enxerto, já são conhecidas.

Quanto à produção o porta-enxerto Sunki induziu maior produção em peso de fruto a Mexirica-do-Rio no período de 1971 a 1977 (FIGUEIREDO et alii, 1979) e maior produção total para laranja doce nas primeiras quatorze safras na Fazenda

Experimental de Lageado pertencente a UNESP em Botucatu, São Paulo (SALIBE et alii, 1988).

A qualidade dos frutos das laranjas doces Hamlin, Baianinha, Westin, Ruby e Itaboraí apresentou-se com características intermediárias quando enxertadas sobre tangerina 'Sunki' sendo superada apenas pelo *Trifoliata* (SALIBE & MISCHAN, 1978).

Observando a precocidade de produção, além do limão Cravo, a tangerina Sunki e o tangelo Orlando também influenciaram precocidade de produção das plantas segundo observações feitas por FIGUEIREDO et alii (1981) em combinações de laranja Barão com dez porta-enxertos.

A tangerina Sunki induziu maiores volumes de copa, juntamente com limão Cravo e tangerina Cleópatra, em combinação com laranja Valência (TEÓFILO SOBRINHO et alii, 1973) como também para laranja Barão onde essas tangerinas foram superadas em vigor somente por aquelas onde o porta-enxerto era o tangelo Orlando (FIGUEIREDO et alii, 1981).

Quanto a adaptação ao solo, POMPEU JUNIOR et alii (1978), verificaram que tangerinas Sunki e Cleópatra apresentam bom comportamento somente em solos argilosos.

Com relação a resistência ao vírus da tristeza a tangerina Sunki apresenta bom comportamento como porta-enxerto de laranjas doces (GRANT et alii, 1961) e juntamente com os porta-enxertos Batangas, Oneco e tangelo Orlando, até o momento ainda são consideradas tolerantes ao declínio (POMPEU JUNIOR, 1988).

2.3. Cultura de Tecidos

A biotecnologia de plantas, utilizando-se da cultura de tecidos e/ou células vegetais possibilita a regeneração de plantas de interesse econômico com o objetivo de aumentar a produção e a produtividade agrícola.

A cultura de tecidos congrega um conjunto de técnicas que podem se constituir em importante instrumento de apoio a projetos de pesquisas, viabilizando a obtenção de resultados positivos nas mais diferentes áreas do conhecimento científico.

CROCOMO (1991), cita várias questões fundamentais que podem ter soluções com o auxílio da biotecnologia, destacando a propagação de plantas, isentas de vírus, em grande número e em pequeno espaço físico. Além disso, é um instrumento valioso na preservação de germoplasma e no melhor entendimento dos princípios básicos relacionados com a fisiologia, bioquímica e desenvolvimento das plantas (VAZ, 1986).

Para as espécies cítricas, a cultura de tecidos é uma técnica com grandes potencialidades para o estudo dos fenômenos morfológicos, citológicos e fisiológicos; principalmente para fins de melhoramento genético, devido a algumas particularidades apresentadas por essas espécies tais como: poliembrionia, esterilidade gamética, incompatibilidade e longo período juvenil das plantas.

O grande progresso da cultura "in vitro" de citros foi observado a partir do desenvolvimento dos meios de cultura de

"MS" e "MT" (MURASHIGE & SKOOG, 1962 e MURASHIGE & TUCKER, 1969) mas outros trabalhos vieram se desenvolvendo desde a década de 50 (SCHROEDER & SPECTOR, 1957; KORDAN, 1959 e RANGASWAMY, 1961).

OTONI (1988) cita vários trabalhos com aplicação da cultura de tecidos em citros: isolamento e cultura de protoplastos, hibridação somática, cultivo de anteras visando a obtenção de haplóides, cultura de embriões, embriogênese adventícia em tecidos nucelares, cultura de óvulos, indução de mutação por irradiação de tecidos, seleção "in vitro" contra fatores adversos, cultura de segmentos de frutos, propagação de plantas livres de vírus através da microenxertia, propagação clonal através de gemas axilares, extremidades de ramos, meristemas de raízes e segmentos internodais.

Além da propagação clonal, a cultura de gemas axilares "in vitro" tem sido aplicada na elucidação de vários aspectos do desenvolvimento dos explantes, o efeito exercido pelo tipo de explante e pela planta matriz, a compreensão da natureza dos efeitos morfológicos dos vários reguladores de crescimento, ritmo anual de crescimento das gemas em cultura e o estudo da competência metabólica e fisiológica das gemas "in vitro".

A cultura de tecidos de citros tem sido estabelecida em meio "MS" ou meio "MT". As modificações podem ocorrer dependendo do objetivo.

Os sais do meio "MS" tem proporcionado desenvolvimento satisfatório (GRINBLAT, 1972 e ALTMAN & GOREN, 1974), podendo

reduzir essa concentração conforme a finalidade (CHATUVERDI & MITRA, 1974 e KITTO & YOUNG, 1981).

As vitaminas do meio "MS" também podem ser modificadas nas suas concentrações e também podem ser acrescentadas outras vitaminas dependendo da espécie em estudo. É o caso de cultura de tecidos somáticos de citros (CHATUVERDI & MITRA, 1974), onde utilizam-se ácido fólico, riboflavina, biotina e ácido ascórbico, e concentrações mais elevadas daquelas vitaminas que compõe o meio "MS".

2.3.1. Proliferação de ramos e brotos

Para multiplicação *in vitro* os reguladores de crescimento são os constituintes orgânicos de maior relevância. O balanço auxina - citocinina parece regra geral entre as espécies vegetais no controle da rizogênese e caulogênese (MURASHIGE, 1974).

Na proliferação de ramos e brotos a espécie utilizada determina o tipo de regulador de crescimento e a concentração a ser usada. Para os citros os reguladores de crescimento utilizados são BAP (benzil aminopurina) e ANA (ácido naftaleno acético) nas seguintes concentrações: *Citrus aurantium*: 1,0mg/L de ANA e 1,0mg/L de cinetina (BOUZID, 1975); *Citrus sinensis* cv Pera: 0,3mg/L de BAP (TEIXEIRA & LANI, 1986); *Citrus grandis*: 0,25mg/L de BAP e 0,1mg/L de ANA (CHATUVERDI & MITRA, 1974); Citrange Carrizo: 5,0mg/L de BAP (KITTO & YOUNG, 1981); Valência: 0,2mg/L de BAP e 0,2mg/L de ANA; Trifoliata: 1,0mg/L de BAP e

1,0mg/L de ANA (PASQUAL, 1985) e para Citrange Troyer, *C. sinensis*, *C. aurantium*, BOUZID (1986) utilizou 0,5mg/L de BAP e 0,1mg/L de ANA.

No caso específico do porta-enxerto 'Sunki' os reguladores de crescimentos utilizados, 2,0mg/L de BAP e 0,1mg/L de ANA, suplementando o meio MT, promoveram melhor propagação a partir de extremidades de ramos de plântulas germinadas "in vitro" (GRATTAPAGLIA & CALDAS, 1987).

2.3.2. Enraizamento dos brotos

Para o enraizamento "in vitro", de brotos de diferentes espécies de citros, os reguladores de crescimento mais utilizados são ANA e IBA nas seguintes concentrações: *Citrus grandis*: 0,1mg/L de ANA para brotos menos vigorosas e 0,5mg/L de ANA ou 0,25mg/L de ANA mais 0,25mg/L de IBA para brotos mais vigorosas (CHATUVERDI & MITRA, 1974); Citrange Carrizo: 1,0mg/L de ANA (KITO & YOUNG, 1981); laranja Valência: 0,1 a 1,0mg/L de ANA mais 2,0mg/L de IBA; Trifoliata: 1,0 a 2,0mg/L de IBA ou 5,0mg/L de ANA mais 0,1mg/L de BAP ou 1,0mg/L de ANA mais 2,0mg/L de IBA (PASQUAL, 1985); *C. sinensis*, *C. aurantium* e Citrange Troyer: 0,5mg/L de ANA (BOUZID, 1986).

Para a tangerina 'Sunki' o melhor enraizamento se deu em meio "MT", contendo a metade dos sais, mais 0,5mg/L de IBA (GRATTAPAGLIA & CALDAS, 1987).

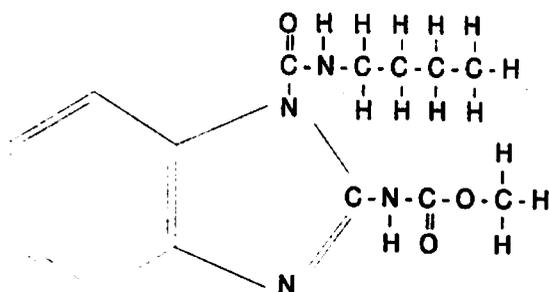
O uso de auxinas no meio de enraizamento, em altas concentrações, pode levar a formação de calos na base do explante dificultando a rizogênese (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990). Para controlar o excesso de produção de calos na base do caule e melhorar o alongamento das raízes, após a iniciação radicular, pode-se transferir as estacas de um meio com auxina (ANA ou IBA) para um meio sem reguladores de crescimento por 4 dias a 4 semanas (JAMES & THURBON, 1979; SNIR & EREZ, 1980 e JAMES & THURBON, 1981). Um outro meio de reduzir a produção de calos é através da utilização de meio líquido com IBA (OCHATT & CASO, 1983).

2.4. Benomyl

2.4.1. Características

O Benomyl é um fungicida sistêmico do grupo dos benzimidazóis e tem as seguintes características:

- nome químico: metil 1(butil - carbamoil)- 2 - benzimidazole - carbamato.
- fórmula empírica: $C_{14}H_{18}N_4O_3$
- fórmula estrutural:



- propriedades físicas: tem peso molecular 290,3; decompõe-se antes de se fundir; a 25°C é praticamente insolúvel em água (2ppm), etanol (0,4%) e heptano (0.04%). Apresenta maior solubilidade em xileno (1%), acetona (1,8%), dimetilformamida (5,3%) e clorofórmio (9,4%).
- toxicidade: DL₅₀ 10.000mg/kg
- fabricante: E.I. Du Pont de Nemours & Co. - Delaware - USA.
- poder residual: 1 a 3 semanas.
- produção comercial e formulação: formulação simples: Benlate - pó molhável com 50% de Benomyl.

Embora não tenha ação acaricida esse fungicida é ativo como ovicida de ácaros. Apresenta ainda atividade contra nematóides e previne injúrias causadas por ozona nas plantas. Impede a reprodução de alguns fungos. Algumas espécies e raças de fungos podem desenvolver tolerância ao produto (CARDOSO et alii, 1979).

2.4.2. Efeitos

O fungicida Benomyl é absorvido e translocado por células e órgãos vegetais (Solel, 1973 citado por YANG, 1976) e por isso protege, não só o meio de cultura, mas também o material vegetal da contaminação fúngica (YANG, 1976).

As contaminações podem ser controladas com fungicidas durante a desinfestação ou incorporadas ao meio. O Benomyl é indicado como fungicida pois apresenta amplo espectro de ação e é pouco tóxico às culturas nas concentrações para controlar fungos (GRATTAPLAGLIA & MACHADO, 1990).

Com Benomyl adicionado ao meio, na concentração de 50mg/L, Hauptmann et alii (1985) citados por GRATTAPAGLIA & MACHADO (1990), controlaram a contaminação de *PENICILLIUM* em cultura de protoplastos de várias espécies. Haldemann et alii (1987), também citados pelos mesmos autores, eliminaram a contaminação fúngica em ápices de *CAMELLIA* provenientes do campo, adicionando ao meio 1 a 2g/l da formulação comercial Benlate.

Além de controlar as contaminações fúngicas, Becker (1971); Saenger (1970); Shreiber (1975) e Schruft (1970) citados por YANG (1976), observaram que esse fungicida possui algumas propriedades reguladoras de crescimento.

Na verdade, não se sabe se esse efeito hormonal do fungicida é devido a mudanças no ingrediente ativo durante a autoclavagem dos meios de cultura e/ou em outros componentes desconhecidos do preparo comercial (SKENE, 1972), ou pode ser devido ao próprio fungicida que tem uma semelhança estrutural com as citocininas (Schruft, 1970 citado por THOMAS, 1973).

Alguns trabalhos têm sido feitos no sentido de evidenciar esse efeito de regulador de crescimento, sem o propósito de determinar a natureza da(s) substância(s) que apresenta(m) atividade semelhante à citocinina no preparo comercial.

Em análises de calos de soja e cotiledones de rabanete foi observado que o Benomyl tem esse efeito semelhante à citocinina. Para calos de soja ocorre uma resposta máxima entre 25 e 50mg/L de Benomyl, a qual é menor do que aquela registrada com 0,003mg/L de cinetina; com 50mg/L de Benomyl obteve-se o mesmo desenvolvimento que 0,001mg/L de cinetina. Para cotiledones de

rabanete a resposta máxima ocorreu com 150mg/L de Benomyl que foi equivalente ao crescimento induzido por 5mg/L de cinetina (SKENE, 1972).

Em aspargos (*Asparagus officinalis*) o Benomyl mostrou um efeito significativo no desenvolvimento de brotos em meio de cultura. O maior número de brotos foi obtido com 100ppm de Benomyl e esse efeito foi devido a proliferação de células do cortex, floema e xilema dos explantes tratados, sugerindo que esse fungicida pode ser usado com vantagens em viveiros de aspargos, não apenas para controlar doenças fúngicas mas também para promover o desenvolvimento de brotos e melhorar a produtividade (YANG, 1976).

Embora a eficiência do Benomyl seja fraca, como citocinina, as altas dosagens aplicadas às plantas no campo compensariam parcialmente esta atividade fraca. E o fato de um fungicida funcionar como regulador de crescimento de plantas deve ser completamente avaliada por seus usuários (SKENE, 1972) e determinar cuidadosamente seus efeitos colaterais no campo (Schurft, 1970 citado por SKENE, 1972).

2.5. Aclimação

A aclimação consiste em retirar a planta da condição "in vitro" e transferi-la para casa de vegetação. Tem por objetivo superar as dificuldades que as plântulas de cultura de tecidos enfrentam quando ocorre essa mudança de ambiente.

Esse processo é crítico para se conseguir sucesso na cultura de tecidos de plantas porque a planta passa de um ambiente de baixa transpiração para ambiente que exige um incremento na transpiração podendo causar um estresse hídrico, passa de um estado heterotrófico para um estado autotrófico, passa de um meio com disponibilidade de sais para outro onde precisa absorver sais e sai de um estado asséptico para ficar sujeita a ataque de microorganismos saprófitas e, eventualmente patogênicos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

Devido a esses fatores a aclimação pode se tornar uma fase limitante na cultura de tecidos. A manutenção da alta umidade e temperaturas amenas são regras gerais na fase de aclimação.

Algumas técnicas alternativas têm sido estudadas no sentido de não se perder plantas obtidas "in vitro" na aclimação como embebição de gemas em meio enraizante e transferência das plantas para outro composto quando aparecem as raízes (HUSSEY, 1980), eliminação ou redução da fonte de açúcar no meio de enraizamento e também aumento da concentração de CO_2 e intensidade luminosa (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990), retirada da tampa do frasco ou tubo 5 - 6 dias antes da transferência das plantas para o substrato (GOUSSARD & WIDD, 1989). Segundo os mesmos autores, para a aclimação de *Vitis* sp. pode-se retirar a gema apical e folhas basais e manter o frasco destampado, com água por 24 horas e posteriormente substituir por solução nutritiva que é trocada a cada 48 horas.

O enraizamento "in vitro" é relativamente fácil com espécies herbáceas ou mesmo lenhosas que apresentam grande capacidade de enraizamento na estaquia. A eliminação do enraizamento "in vitro" é extremamente desejável sob o ponto de vista econômico e de qualidade do sistema radicular (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990), mesmo porque as raízes formadas no ágar não são funcionais quando transplantadas e por causa disso novas raízes têm que se desenvolverem e se tornarem aptas para absorver água do solo (CAILLOUX, 1984).

Considerando esse aspecto, pode-se fazer a indução ao enraizamento "in vitro" e deixar que o alongamento ocorra no substrato de transplântio o que leva ao desenvolvimento de um sistema radicular melhor (ZIMMERMAN & FORDHAM, 1985), concordando com Monette (1986) citado por GRATTAPAGLIA & MACHADO (1990), que conseguiram melhores resultados ao enraizar partes aéreas diretamente em substrato após tratamento com IBA em solução aquosa.

O uso do meio líquido para enraizamento, também leva a formação de um sistema radicular mais completo. KITTO & YOUNG (1981) observaram um decréscimo de 70 para 10% na taxa de enraizamento de *Citrus* com o aumento na concentração de ágar de 0,5 para 2%.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Escola Superior de Agricultura de Lavras - ESAL, Lavras - MG.

3.2. Obtenção do Material

O material vegetal utilizado foi obtido através da germinação "in vitro" de sementes obtidas de 15 frutos maduros colhidos de uma única planta do pomar da ESAL. Essas sementes foram extraídas manualmente, contadas, lavadas em água destilada para retirada da mucilagem, colocadas para secar em ambiente natural sobre papel de filtro e armazenadas em vidro tampado na geladeira. Posteriormente foram colocadas para germinar.

3.2.1. Germinação das sementes

Em condições assépticas 94 sementes foram envolvidas em gaze e mergulhadas em água sanitária 40% por 10 minutos e posteriormente lavadas em água destilada, para promover a

desinfestação. Logo após foram colocadas em tubos de ensaio (1 semente/tubo) contendo 15ml dos sais do meio MS solidificado com 6,5 g/L de ágar, pH ajustado para 6,0 e autoclavado a 121°C por 20 minutos.

Os tubos foram mantidos no escuro até o início da germinação (\pm 21 dias) e depois levados para sala de crescimento onde permaneceram até a repicagem (plântulas com \pm 8cm).

3.2.2. Multiplicação do material

O material obtido na germinação foi repicado inicialmente para o meio MS suplementado com as seguintes concentrações de reguladores de crescimento: 2,0mg/L de BAP e 0,1mg/L de ANA e posteriormente para este mesmo meio suplementado com 4,0mg/L de GA₃ (ácido giberélico).

Foram feitas sucessivas repicagens, após 60 dias no meio de cultura, até a obtenção do material suficiente para realizar os experimentos. Os brotos menores que 1cm eram eliminados por ocasião de cada repicagem.

3.3. Efeito do Benomyl na Multiplicação do Porta-enxerto 'Sunki'

Para atingir esse objetivo foram realizados dois experimentos (A e B). As doses utilizadas no experimento A foram determinadas seguindo aquelas normalmente utilizadas para

controle de contaminações fúngicas. No experimento B as doses foram aumentadas em função dos dados obtidos no experimento A.

3.3.1 Procedimentos

Todos os procedimentos para montagem dos experimentos em laboratório foram feitos em condições assépticas, utilizando-se o meio MS (Quadro 01) suplementado com reguladores de crescimento e Benomyl conforme os tratamentos.

Os reguladores de crescimento foram dissolvidos em NaOH 1,0N e adicionados ao meio de cultura no final do preparo.

O Benomyl foi dissolvido em água, acrescentada aos poucos, formando uma pasta até a diluição completa.

O pH do meio de cultura foi ajustado para 6,0, antes da adição do ágar, utilizando NaOH 1,0N e HCl 1N; e solidificado com 6,5g/L de ágar.

Os experimentos foram conduzidos em tubos de ensaio de 150 x 25mm acondicionados em suportes com capacidade para 72 tubos. Após a adição do meio de cultura os tubos foram fechados com tampa plástica, identificados e autoclavados a 121°C durante 20 minutos.

Os experimentos foram realizados em sala asséptica, utilizando câmara de fluxo laminar horizontal. Após a inoculação de uma brotação por tubo, contendo 15ml do meio, o material foi mantido em sala de crescimento sob temperatura variando entre 22

e 26°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa em torno de $60 \mu\text{mol quantum/m}^2\text{s}^2$ utilizando lâmpada branca fria.

QUADRO 01. Composição do meio MURASHIGE & SKOOG (1962) - MS modificado. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Solução Estoque	Compostos	Concentração na solução estoque (mg/L)	Volume da solução estoque adicionado ao meio (ml)	Concentração final (mg/L)
A	NH_4NO_3	82.500	20	1.650,000
B	KNO_3	95.000	20	1.900,000
C	H_3BO_3	1.240	5	6,200
	KH_2PO_4	34.000		170,000
	KI	166		0,830
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	50		0,250
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5		0,025
D	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	88.000	5	440,000
E	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	74.000	5	370,000
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4.460		22,300
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.720		8,600
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5		0,025
	Na_2EDTA	7.450		5
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.570	-27,850		
Tiamina		0,500		
Piridoxina		0,500		
Ácido nicotínico		0,500		
Mio-inositol		100,000		
Sacarose		30.000,000		
Glicina		2,000		
Ágar		6.500,000		
pH		6,0		

3.3.1.1. Experimento A

O material obtido na multiplicação foi submetido a uma uniformização, ou seja, foi mantido em meio MS sem reguladores de crescimento, por \pm 20 dias para posteriormente testar o Benomyl no seguinte experimento: em câmara de fluxo laminar os explantes apicais foram excisados com 1,5 a 2,0cm de comprimento e colocados em tubos de ensaio contendo o meio MS acrescido dos tratamentos expostos no Quadro 02.

QUADRO 02. Tratamentos utilizados no experimento A. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Tratamento	Doses (mg/L)			
	BAP	Benomyl	ANA	GA ₃
1	0	0	0,1	4,0
2	0	50	0,1	4,0
3	0	100	0,1	4,0
4	0	150	0,1	4,0
5	1	0	0,1	4,0
6	1	50	0,1	4,0
7	1	100	0,1	4,0
8	1	150	0,1	4,0
9	2	0	0,1	4,0
10	2	50	0,1	4,0
11	2	100	0,1	4,0
12	2	150	0,1	4,0
13	3	0	0,1	4,0
14	3	50	0,1	4,0
15	3	100	0,1	4,0
16	3	150	0,1	4,0

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial. O experimento foi constituído de 256 tubos: 16 tratamentos \times 4 repetições \times 4 explantes/repetição. Os dados, para cada repetição, foram obtidos através da média dos quatro explantes.

A avaliação foi feita aos 60 dias após os tratamentos, contando-se o número total de brotos e o número de brotos maiores ou iguais a 1,0cm.

3.3.1.2. Experimento B

Em câmara de fluxo laminar os explantes apicais, também homogeneizados, foram excisados com 1,5 a 2,0cm de comprimento e colocados em tubos de ensaio contendo o meio MS acrescido dos tratamentos expostos no Quadro 03.

QUADRO 03. Tratamentos utilizados no experimento B. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Tratamento	Doses (mg/L)		
	Benomyl	ANA	GA ₃
1	0	0,1	4,0
2	100	0,1	4,0
3	200	0,1	4,0
4	300	0,1	4,0
5	400	0,1	4,0

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado. O experimento foi constituído de 80 tubos: 5 tratamentos × 4 repetições × 4 explantes/repetição. Os dados, para cada repetição, foram obtidos através da média dos 4 explantes.

A avaliação foi feita aos 60 dias, após a incubação, contando-se o número total de brotações e o número de brotações maiores ou iguais a 1,0cm.

3.4. Efeito da Incubação em IBA no Enraizamento "In Vivo" do Porta-enxerto 'Sunki'

3.4.1. Procedimentos

A incubação foi feita em tubos de ensaio 150 x 25mm, contendo água e o regulador de crescimento. Os explantes, brotos com 2,5-3,0cm, foram colocados nos tubos, depois de autoclavados, com a ajuda de uma ponte de papel de filtro para que se mantivesse apenas a parte basal mergulhada na solução, conforme Figura 01, e mantidos em sala de crescimento sob temperatura variando entre 22 e 26°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa em torno de $60\mu\text{mol quantum/m}^2\text{s}^2$ utilizando lâmpada branca fria.

Terminado o tempo de incubação os explantes foram levados para o substrato Plantmax em bandejas de isopor onde permaneceram em casa de vegetação com temperatura e umidade controladas.

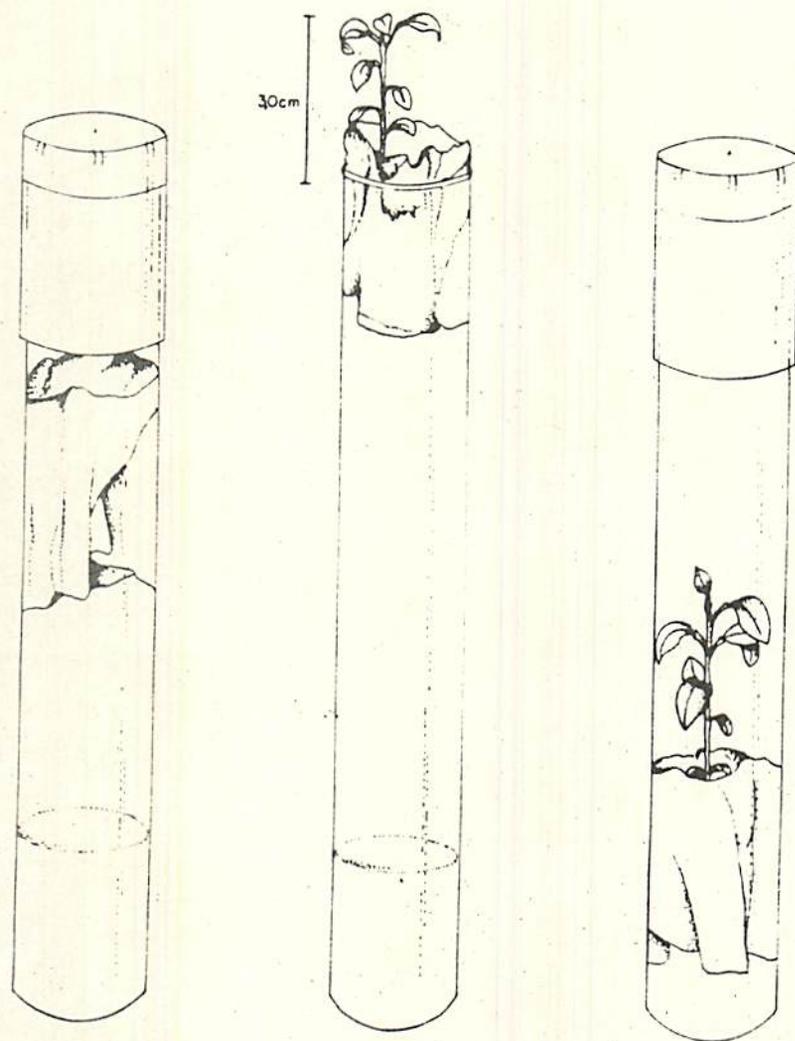


FIGURA 01. Representação da metodologia da incubação em IBA.
ESAL, Lavras - MG, 1993.

3.4.1.1. Experimento C

Explantos uniformes foram submetidos aos tratamentos de incubação (Quadro 04). Nos tratamentos com 0mg/L de IBA a incubação foi realizada em tubos contendo apenas água. Durante a incubação os tubos foram mantidos na sala de crescimento e depois transferidos para o substrato Plantmax e mantidos em casa de vegetação por 45 dias.

QUADRO 04. Tratamentos utilizados no experimento C. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Tratamento	IBA (mg/L)	Tempo (h)
1	0	12
2	0	24
3	0	48
4	0	96
5	20	12
6	20	24
7	20	48
8	20	96
9	40	12
10	40	24
11	40	48
12	40	96
13	60	12
14	60	24
15	60	48
16	60	96

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente ao acaso em esquema fatorial com 4 repetições e 4 plantas/repetição.

A avaliação foi feita após 45 dias contando-se o número de plantas sobreviventes, número de plantas enraizadas e peso da matéria seca de raiz.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Número de sementes por fruto

Na contagem das sementes, dos 15 frutos, obteve-se uma média de 12,47 sementes/fruto. Essa média não concorda com a obtida por TEÓFILO SOBRINHO (1991) em pomares do estado de São Paulo. Mas segundo informações do referido autor essa variação no número de sementes tem acontecido com o porta-enxerto 'Sunki' dependendo do local de coleta das sementes.

Comparando com outros porta-enxertos, a tangerina 'Sunki' é um porta-enxerto que produz média baixa de sementes visto que o Limão Cravo, Limão Rugoso da Flórida, Trifoliata tangerina Cleópatra produzem 15, 15, 38 e 14 sementes/fruto, respectivamente.

4.2 Germinação

A germinação "in vitro" das sementes teve um ótimo desempenho pois das 94 sementes colocadas para germinar 58 sementes germinaram aos 21 dias, 31 sementes germinaram aos 30

dias, 3 sementes germinaram aos 45 dias, 1 semente não germinou e 2 sementes contaminaram por fungo.

4.3. Multiplicação do Material

A multiplicação obtida com o uso do meio sugerido por GRATTAPAGLIA & CALDAS (1987) foi satisfatória em número, porém os brotos mantiveram-se com tamanho reduzido. A adição de 4,0mg/L de GA₃ a este mesmo meio proporcionou maior alongamento destes brotos.

Um aspecto observado foi o tamanho dos brotos porque brotos menores que 1,0cm não apresentaram desenvolvimento satisfatório quando utilizados para obtenção de novas brotações.

4.4. Efeito do Benomyl na Multiplicação do Porta-enxerto 'Sunki'

4.4.1. Experimento A

Para a variável número de brotos maiores ou iguais a 1,0cm os dados observados mostraram-se com efeito significativo para BAP e Benomyl (Quadro 05). A interação entre estes dois fatores não foi significativa.

Através da análise de regressão dos dados obtidos e apresentados no Quadro 06 obteve-se o gráfico (Figura 02), onde o ponto máximo se deu com 101,64mg/L de Benomyl correspondendo a 6,67 brotações. Observa-se que houve uma tendência de aumento no

número de brotos $\geq 1,0\text{cm}$ a medida que se aumentou a concentração de Benomyl, decrescendo com concentrações mais elevadas do referido fungicida.

QUADRO 05. Resumo da análise de variância para número médio de brotos maiores que $1,0\text{cm}$ e do número total de brotos do porta-enxerto 'Sunki' nas diferentes concentrações de BAP e Benomyl. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Causas da Variação	GL	Quadrado Médio	
		N ^o Médio brotos $\geq 1,0\text{cm}$	N ^o Total brotos
BAP	3	58,319**	243,799**
Benomyl	3	37,812**	129,497**
BAP x Benomyl	9	5,346	13,615*
Erro	48	4,346	6,281
CV (%)		39,96	24,388

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

* significativo ao nível de 5% de probabilidade.

QUADRO 06. Resultados médios do número de brotos $\geq 1,0\text{cm}$. ESAL, Lavras - MG, 1993.

BAP (mg/L)	Benomyl (mg/L)			
	0	50	100	150
0	1,50	3,50	3,29	3,31
1	6,25	5,95	8,85	7,39
2	2,54	7,66	7,77	7,02
3	3,18	4,37	7,43	5,25

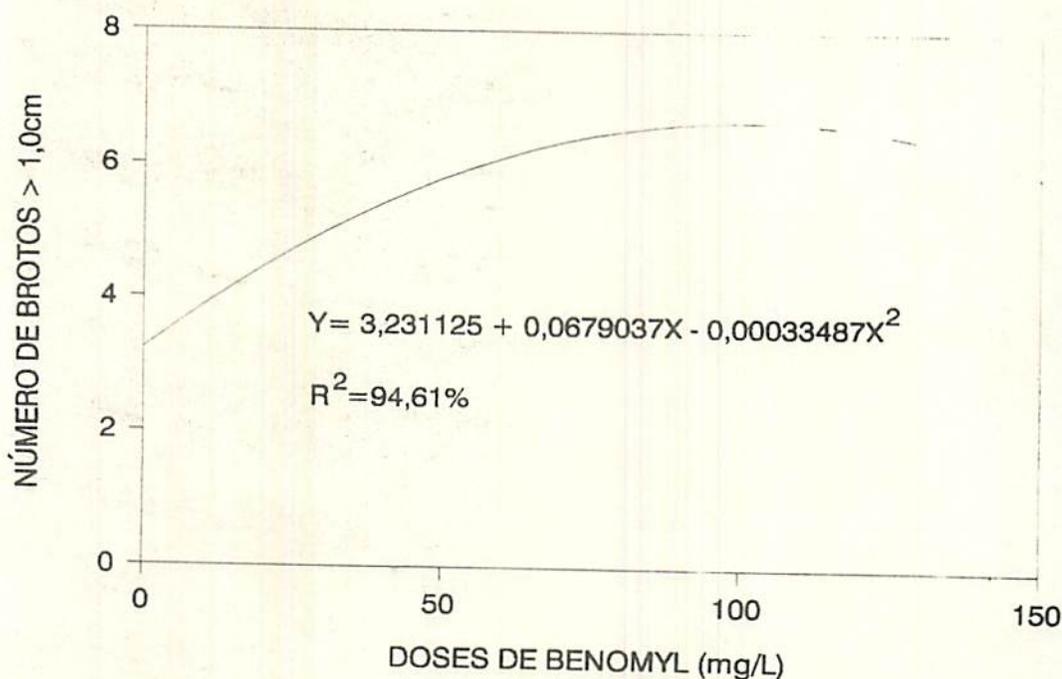


FIGURA 02. Número médio estimado de brotações $\geq 1,0\text{cm}$ em função de diferentes doses (0 a 150mg/L) de Benomyl para o porta-enxerto 'Sunki'. ESAL, Lavras - MG, 1993.

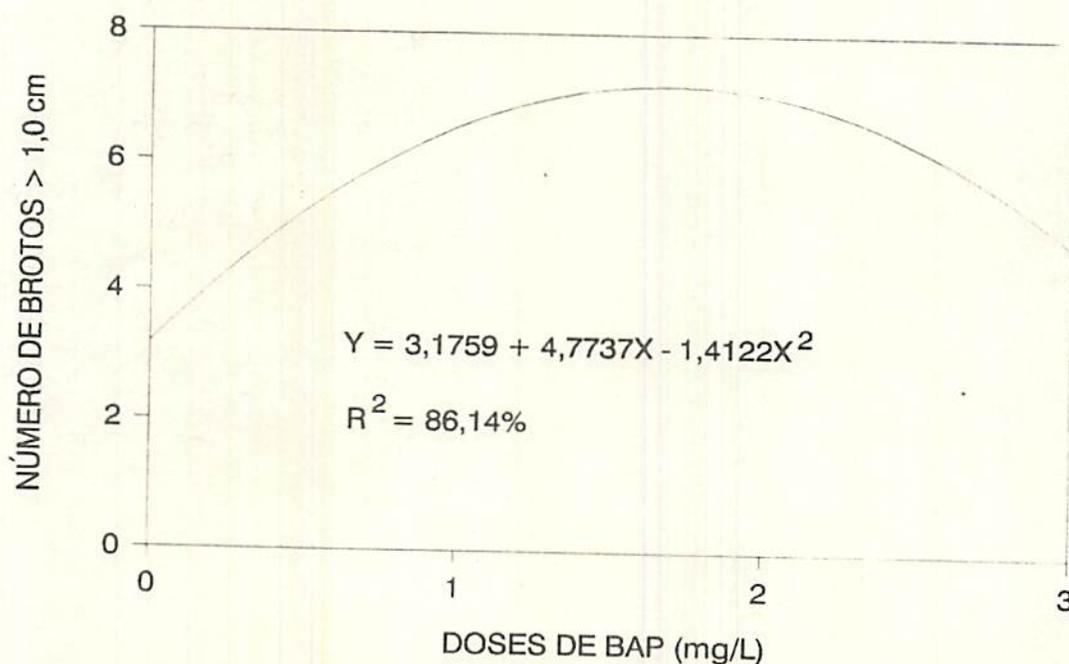


FIGURA 03. Número médio estimado de brotações $\geq 1,0\text{cm}$ em função de diferentes doses de BAP para o porta-enxerto 'Sunki'. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Para as doses de BAP, o gráfico obtido (Figura 03) apresentou o ponto máximo em 1,69mg/L de BAP correspondendo a 7,21 brotações. Uma análise permite evidenciar a tendência de aumento no número de brotos \geq 1cm até a dose de 1,69mg/L de BAP, registrando um decrescimo em concentrações mais elevadas deste regulador de crescimento.

Para a variável número total de brotos os dados observados mostraram-se com efeito significativo para BAP, Benomyl e também para a interação entre BAP e Benomyl (Quadro 05). Através da análise de regressão dos dados obtidos (Quadro 07) obteve-se a Figura 04 onde para as doses de Benomyl, quando se utilizou 1, 2, 3mg/L de BAP, as curvas mostraram a mesma tendência estando aproximadamente em 100mg/L de Benomyl (96,40 a 109,25mg/L) o ponto máximo de brotações, em torno de 16 brotações.

QUADRO 07. Resultados médios do número total de brotos. ESAL, Lavras - MG, 1993.

BAP (mg/L)	Benomyl (mg/L)			
	0	50	100	150
0	1,68	4,91	5,06	6,68
1	10,93	11,79	16,18	12,62
2	7,20	14,39	16,56	12,91
3	6,68	8,83	16,18	11,75

$$Y1 = 2,3160 + 0,0302950X$$

$$R^2 = 87,22\%$$

$$Y2 = 10,9375 - 0,0950417X + 0,00300850X^2 - 0,00001533X^3$$

$$R^2 = 100,00\%$$

$$Y3 = 7,1677 + 0,2010300X - 0,00108300X^2$$

$$R^2 = 99,93\%$$

$$Y4 = 5,837 + 0,1438225X - 0,00065825X^2$$

$$R^2 = 71,49\%$$

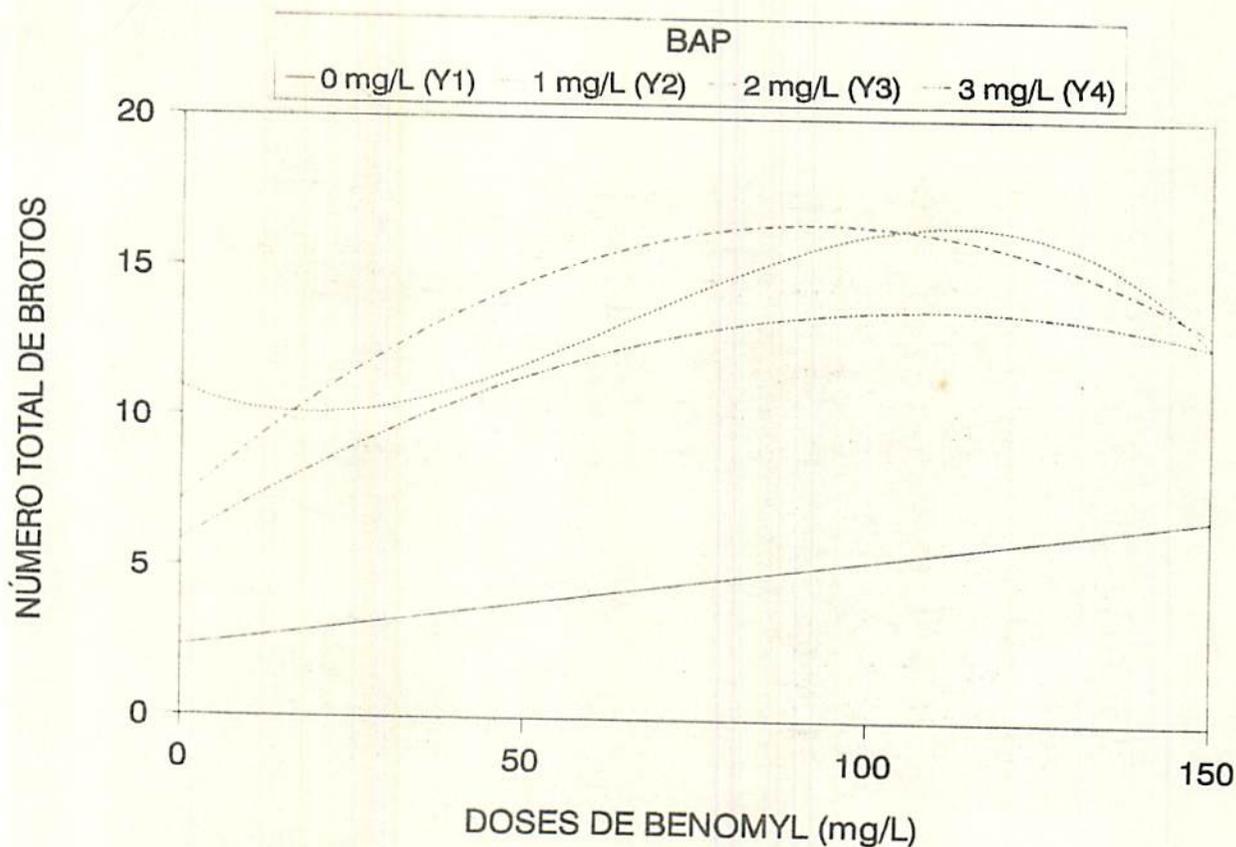


FIGURA 04. Número médio estimado do total de brotos em função de diferentes doses de Benomyl dentro de cada dose de BAP para o porta-enxerto 'Sunki'. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Quando se utilizou 0mg/L de BAP com doses crescentes de Benomyl observou-se o aumento no número de brotações, com tendência linear, sugerindo um novo experimento (experimento B) para verificar a possibilidade de aumentar a dose de Benomyl, além de 150mg/L, com o objetivo de aumentar o número de brotações.

Para as doses de BAP, o gráfico obtido (Figura 05) mostrou as curvas tendo ponto máximo quando se utilizou 2,08mg/L de BAP e 100mg/L de Benomyl correspondendo a 18 brotações.

$Y1 = 2,4970 + 8,4545000X - 2,44250000X^2$	$R^2 = 69,75\%$
$Y2 = 4,7205 + 10,7617497X - 3,10874987X^2$	$R^2 = 98,48\%$
$Y3 = 5,5625 + 11,9962504X - 2,87375021X^2$	$R^2 = 94,74\%$
$Y4 = 6,8967 + 6,8729996X - 1,77499986X^2$	$R^2 = 96,56\%$

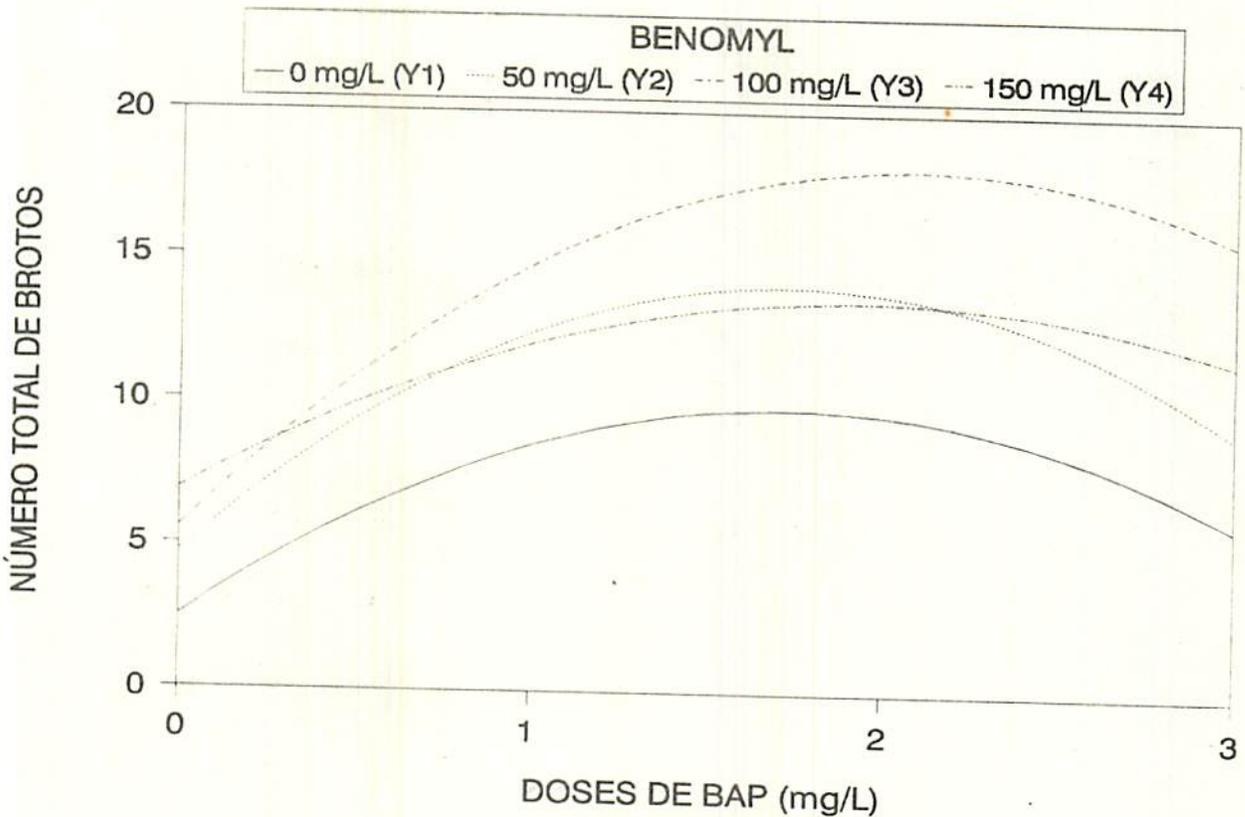


FIGURA 05. Número médio estimado do total de brotos em função de diferentes doses de BAP dentro de cada dose de Benomyl para o porta-enxerto 'Sunki'. ESAL, Lavras - MG, 1993.

4.4.2. Experimento B

O Quadro 08 apresenta o resumo da análise de variância para as variáveis número total de brotos e número de brotos ≥ 1 cm do porta-enxerto 'Sunki' para os diferentes doses de Benomyl. Houve significância estatística para as duas variáveis estudadas.

QUADRO 08. Resumo da análise de variância para o número total de brotos número de brotos ≥ 1 cm do porta-enxerto 'Sunki' nas diferentes concentrações de Benomyl. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios	
		N ^o Total de Brotos	N ^o de Brotos ≥ 1 cm
Benomyl	4	23,739**	14,298**
Erro	15	2,093	1,563
CV (%)		7,52	4,983

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Os dados apresentados no Quadro 09 forneceram as Figuras 06 e 07 onde o ponto máximo de brotações para variável número total de brotos ocorreu com 242mg/L de Benomyl correspondendo a 9,6 brotos e para variável número de brotos $\geq 1,0$ cm o ponto máximo ocorreu com 239mg/L de Benomyl para uma brotação de 6,6.

QUADRO 09. Resultados médios do número total de brotos e número de brotos \geq 1cm do porta-enxerto 'Sunki'. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Benomyl	Número Total Brotos	Número Brotos \geq 1cm
0	3,56	1,96
100	8,19	5,39
200	10,25	7,19
300	7,75	5,31
400	7,87	5,06

Pelos resultados dos dois experimentos realizados ficou evidente o efeito hormonal do Benomyl no porta-enxerto *Citrus sunki* Hort ex Tan concordando com SKENE (1972) e YANG (1976) que também observaram esse efeito colateral do fungicida.

Outros estudos devem ser feitos no sentido de esclarecer o motivo desse efeito. Algumas hipóteses possíveis já surgiram como: mudança química do produto Benomyl durante a autoclavagem e/ou em outros componentes desconhecidos do preparo comercial (SKENE, 1972) e também semelhança estrutural do fungicida com as citocininas (Schruft, citado por THOMAS, 1973).

Não foi objetivo desse trabalho determinar as causas desse efeito, mas é importante evidenciar a importância da cultura de tecidos no sentido de determinar ou promover esse efeito e também como instrumento para esclarecer as suas causas. Além disso, a técnica da cultura "in vitro" permite utilizar produtos agrotóxicos sem a preocupação de poluir meio ambiente podendo com isso estudá-los com mais detalhes.

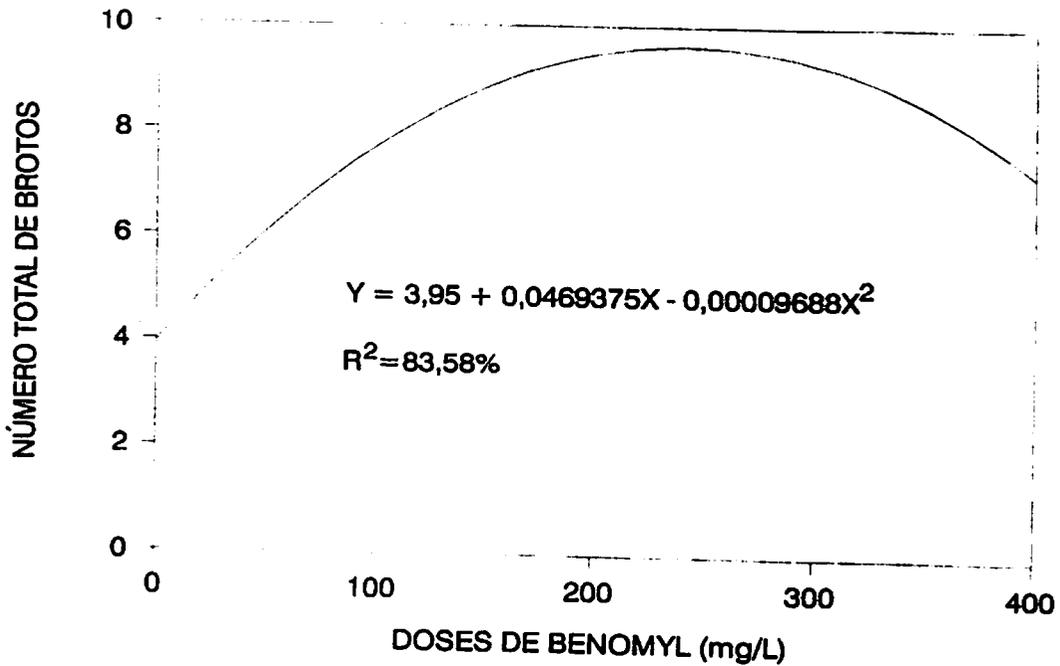


FIGURA 06. Número médio estimado do total de brotos em função de diferentes doses (0 a 400mg/L) de Benomyl para o porta-enxerto 'Sunki'. ESAL, Lavras - MG, 1993.

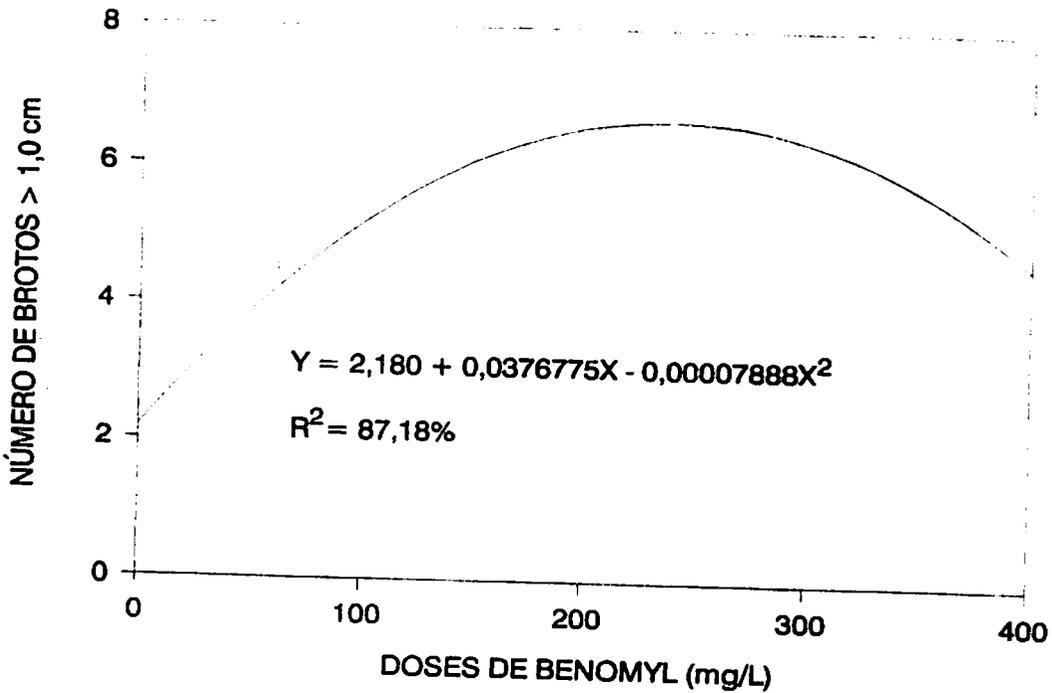


FIGURA 07. Número médio estimado de brotações $\geq 1,0$ cm em função de diferentes doses (0 a 400mg/L) de Benomyl para o porta-enxerto 'Sunki'. ESAL, Lavras - MG, 1993.

No caso específico do Benomyl, Schurft citado por SKENE (1972) considera fraca a eficiência desse fungicida como citocinina que poderia ser compensada com altas dosagens aplicadas no campo. Para o porta-enxerto 'Sunki' com a dose de 242mg/L de Benomyl foi conseguido 9,6 brotos que correspondeu ao uso de 1,5mg/L de BAP aproximadamente. Além do efeito no número de brotações foi observado no experimento A que o tratamento 4, onde se utilizou 150mg/L de Benomyl, as brotações se apresentaram mais vigorosas com cor verde mais intensa ao contrário dos tratamentos onde se utilizou 2,0 e 3,0mg/L de BAP as brotações ocorreram estioladas com cor amarelada e com formação de calos na base, chegando a produzir calos com peso de 386mg. E esse vigor foi confirmado no experimento B onde não foi utilizado BAP em nenhum dos tratamentos e com isso todas as brotações se mostraram vigorosas.

Quanto as contaminações foi observado um índice de 11,33% de plantas contaminadas por bactérias no experimento A e 2,5% no experimento B, ou seja, nesse experimento apenas duas plantas se contaminaram sendo uma por bactéria e uma por fungo.

4.5. Efeito da Incubação em IBA no Enraizamento "In Vivo" do Porta-enxerto 'Sunki'

4.5.1. Experimento C

Analisando os dados obtidos na aclimatação verificou-se que o porta-enxerto 'Sunki' tem ótimo comportamento na aclimatação

pois as variáveis analisadas como número de plantas enraizadas e número de plantas sobreviventes tiveram um índice de 100 e 94,92% respectivamente.

Quanto ao peso da matéria seca de raiz os dados obtidos mostraram significância apenas para o tempo de incubação e não significância para as doses de IBA e interação entre os dois fatores (Quadro 10).

QUADRO 10. Resumo da análise de variância para o peso da matéria seca de raiz do porta-enxerto 'Sunki' "in vivo". ESAL, Lavras - MG, 1993.

Causas da Variação	GL	Quadrado Médio
IBA	3	0,0000318
Tempo	3	0,0002123*
IBA x Tempo	9	0,0000590
Erro	48	0,0000395
CV (%)		33,459

* significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Os dados obtidos e apresentados no Quadro 11 forneceram a Figura 08 onde o máximo de peso de matéria seca de raiz ocorreu com tempo de aproximadamente 60 horas independente do uso de IBA.

As três variáveis analisadas permitiram concluir que o enraizamento "in vivo" do porta-enxerto 'Sunki' é relativamente fácil. Isso porque o índice de 100% de enraizamento das plantas

sobreviventes foi obtido com umidade e temperatura controladas em casa de vegetação.

QUADRO 11. Resultados médios do peso da matéria seca de raiz "in vivo" do porta-enxerto 'Sunki'. ESAL, Lavras - MG, 1993.

Tempo (h)	IBA (mg/L)			
	0	20	40	60
12	0,01382	0,01752	0,01879	0,01357
24	0,01619	0,02084	0,01220	0,01737
48	0,02026	0,02211	0,03137	0,02218
96	0,01724	0,01586	0,01875	0,02222

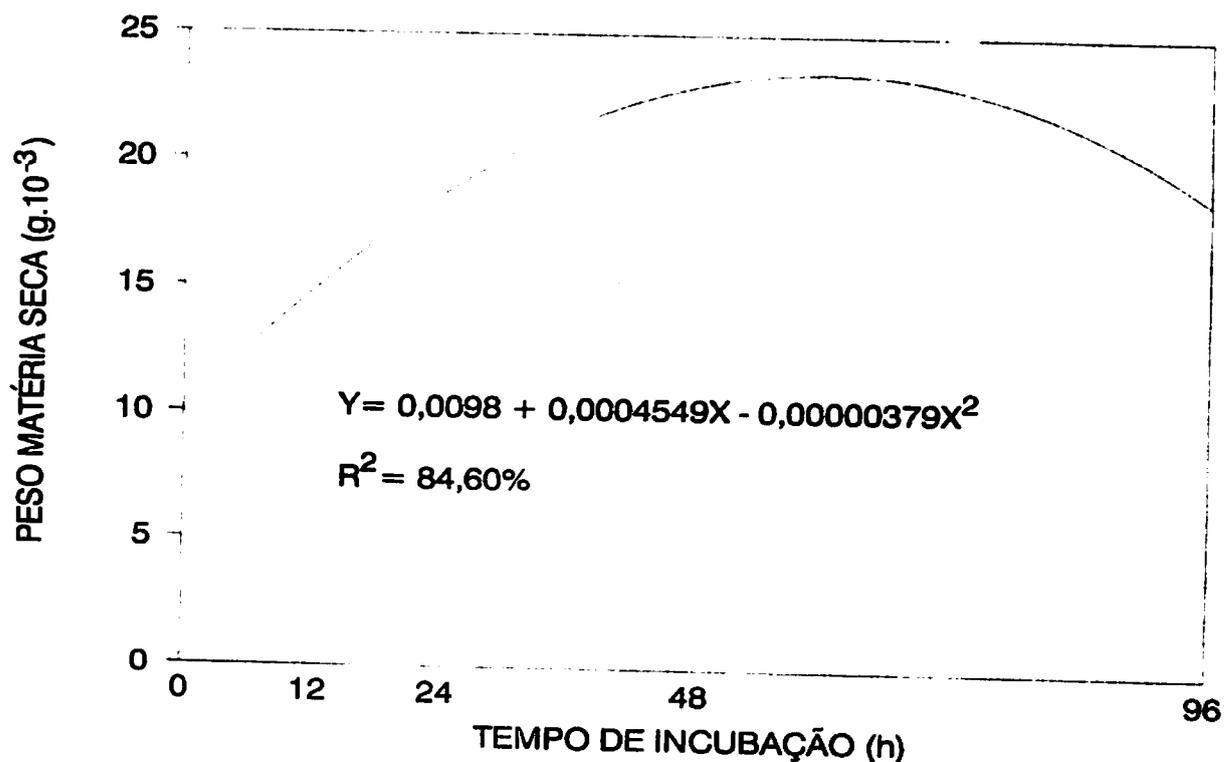


FIGURA 08. Resultado médio do peso da matéria seca de raiz em função de diferentes tempos de incubação em IBA para o porta-enxerto 'Sunki'. ESAL, Lavras - MG, 1993.

A perda de plantas ocorreu nos primeiros 21 dias e foi observado um acúmulo de musgo no substrato que provavelmente foi a causa do apodrecimento do colo da planta, por isso é desejável adequar um substrato ideal que suporte muita umidade porque nos primeiros dias de aclimação a planta necessita de muita umidade devido a absorção de água ser apenas foliar.

A variável peso da matéria seca da raiz indicou a necessidade de incubação em água por 60 h para obtenção de maior peso seco de raiz. Esse resultado se torna interessante quando analisado sob os pontos de vista econômico e biológico.

Econômico porque foi eliminada uma fase na micropropagação: o enraizamento "in vitro", que é extremamente desejável porque é eliminada uma repicagem. E o uso da ponte de papel de filtro, que torna o processo mais oneroso, pode ser substituído por frascos contendo água com várias plantas/frasco, o que não foi utilizado nesse trabalho porque cada repetição foi constituída de 4 plantas.

Sob o ponto de vista biológico, algumas citações podem explicar esse fato:

- a formação de calos é uma barreira física para o alongamento das raízes após iniciação radicular e um meio de controlar o excesso de calos é transferir as plantas para um meio sem reguladores de crescimento (JAMES & THURDON, 1979; SNIR & EREZ, 1980; JAMES & THURDON, 1981). Isso foi observado, para o porta-enxerto 'Sunki' nesse trabalho na fase de uniformização, onde as plantas enraizaram com facilidade. E um outro meio de reduzir a

formação de calos é utilizar meio líquido com IBA (OCHATT & CASO, 1983);

- a redução da sacarose nos meios de cultura estimulam a planta a realizar fotossíntese (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990) e a incubação em água funcionaria como uma pré-aclimação.

Uma sugestão desse experimento de aclimação seria comparar o comportamento do porta-enxerto 'Sunki', quanto ao enraizamento no substrato, quando se utiliza plantas enraizadas e não enraizadas "in vitro" com plantas incubadas em água; porque não só o peso de matéria seca é importante mas também o tipo de raízes formadas.

A fase de aclimação é uma parte da cultura de tecidos que merece bastante atenção para que essa técnica tenha seu real valor principalmente quando é utilizada na exploração comercial.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com *Citrus sunki* Hort ex Tan, no presente trabalho, permitem as seguintes conclusões:

A - Efeito do Benomyl na multiplicação do porta-enxerto *Citrus sunki* Hort. ex Tan:

Com uso de BAP:

- melhor tratamento para número total do brotos foi 1mg/L de BAP e 114mg/L de Benomyl obtendo aproximadamente 16 brotos;

- melhor tratamento para brotos $\geq 1,0$ cm foi 101,64mg/L de Benomyl obtendo 6,67 brotos e 1,69mg/L de BAP obtendo 7,21 brotos.

Sem uso de BAP

- melhor tratamento para número total de brotos ocorreu com 242mg/L de Benomyl obtendo 9,6 brotos;

- melhor tratamento para brotos $\geq 1,0$ cm ocorreu com 239mg/L de Benomyl obtendo 6,6 brotos.

B - Aclimação

- incubação em água por 60 horas favoreceu o peso de matéria seca de raiz;

- o índice de plantas enraizadas foi de 100% para 94,92% de plantas sobreviventes.

6. RESUMO

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Escola Superior de Agricultura de Lavras e teve como objetivo principal verificar o efeito do fungicida Benomyl na multiplicação do porta-enxerto *Citrus sunki* Hort ex Tan O segundo objetivo foi verificar o comportamento desse porta-enxerto na aclimação.

Para atingir o primeiro objetivo foram realizados dois experimentos onde o delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado e os parâmetros avaliados foram número total de brotos e número de brotos maiores ou iguais a 1,0cm.

No primeiro experimento foram utilizados doses de 0,0; 1,0; 2,0 e 3,0mg/L de BAP combinadas em esquema fatorial com 0, 50, 100 e 150mg/L de Benomyl. Com os dados obtidos nesse experimento verificou-se que o Benomyl tem o efeito semelhante a citocinina onde o ponto máximo de brotações maiores ou iguais a 1,0cm se deu com 101,64mg/L de Benomyl e para a variável número total de brotos o ponto máximo de brotação se deu com aproximadamente 100mg/L de Benomyl quando se utilizou 1, 2, 3mg/L de BAP. E com 0mg/L de BAP o ponto máximo de brotações ocorreu com 150mg/L de Benomyl numa tendência linear, o que sugeriu o segundo

experimento para verificar a possibilidade de aumentar a dose de Benomyl com o objetivo de aumentar o número de brotações.

No segundo experimento foram utilizados doses 0, 100, 200, 300 e 400mg/L de Benomyl e a significância foi confirmada obtendo-se o ponto máximo de brotações em torno de 240mg/L de Benomyl para as duas variáveis analisadas.

Para aclimatação foi realizado um experimento onde se testou a incubação em doses de IBA (0, 20, 40 e 60mg/L) em 12, 24, 48 e 96 horas, em delineamento inteiramente casualizado onde se avaliou o número de plantas sobreviventes, número de plantas enraizadas e peso de matéria seca de raiz. E os dados obtidos mostraram um índice de enraizamento de 100%, índice de plantas sobreviventes de 94,92% e para peso de matéria seca de raiz os dados obtidos permitiram concluir que há necessidade de incubação das plantas em água, por 60 horas, para obtenção de maior peso de matéria seca de raiz.

7. SUMMARY

The present research was carried out in the Laboratory of Tissue Culture of the "Escola Superior de Agricultura de Lavras" and had as the main objective to check the effect of the fungicide Benomyl on the multiplication of rootstock *Citrus sunki* Hort. ex Tan. The second objective was to verify the behaviour of that rootstock during acclimatization.

In order to achieve the first objective, two experiments were undertaken, where the statistical design utilized was completely randomized and the parameters evaluated were: total number of shootings and number of shootings greater than or equal to 1cm.

In the first experiment, doses of 0,0; 1,0; 2,0 and 3,0mg/L of BAP combined in a factorial scheme with 0, 50, 100 and 150mg/L of Benomyl were utilized. Through the obtained data in that experiment, it was found that Benomyl has the effect similar to cytokinin where the maximum degree of sproutings greater or equal to 1,0cm occurred at about 100mg/L of Benomyl, when 1, 2 and 3mg/L of BAP was utilized. And with 0mg/L of BAP, the maximum point for sprouting occurred by using 150mg/L of Benomyl in a linear trend, which suggested the second experiment to evaluate the possibility

to raise the dose of Benomyl with the purpose of increasing the sprouting number.

In the second experiment, doses of 0, 100, 200, 300 400mg/L of Benomyl were applied and significance was supported by achieving the maximum point for sprouting at about 240mg/L of Benomyl for the variables assessed.

For acclimatization, a experiment was undertaken where the incubation was tested, in doses of IBA (0, 20, 40 and 60mg/L) at 12, 24, 48 and 96 hours, in a completely randomized design, where the number of surviving plants, number of rooted plants and weight of root dry matter were evaluated. And the data obtained showed a rooting index of 100%, index of surviving plants of 94,92% and for weight of root dry matter, the data obtained allowed to conclude that it is necessary to incubate plants for 60 hours in water to obtain a higher weight of root dry matter.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ALTMAN, A. & GOREN, R. Growth and dormancy cycles in *Citrus* bud cultures and their hormonal control. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 30(3):240-5, 1974.
02. BOUZID, S. Quelques traits du comportement de boutures de *Citrus* en culture "in vitro". *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Academie des Sciences, Paris*, 280(14):1689-92, 1975.
03. _____. "In vitro" micropropagation of mature *Citrus*. In: SOMMERS, D.A.; GENGENBACH, B.G.; BIESBOER, D.D.; HACKET, W.P. & GREEN, C.E., eds. *International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*, 6, 1986. *Proceedings...* Minneapolis, IAPTC, 1986. p.147.
04. CAILLOUX, M. Plant tissue culture: rapid propagation, induced mutation, and the potencial role of protoplast techniques. In: VOSE, P.B. & BLIXT, S.G. *Crop breeding*. New York, 1984. p.311-46.

05. CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P. & FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S., eds. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília, ABCTP/EMBRAPA, 1990. p.37-70.
06. CAMPOS, J.S. *Cultura dos citros*. Campinas, CATI, 1976. (Boletim Técnico, 88).
07. CARDOSO, C.O.N.; CARDOSO, E.J.B.N.; TOLEDO, A.C.D. de; KIMATI, H. & SOAVE, J. Benomyl. In: _____. *Guia de fungicidas*. 2. ed. São Paulo, Grupo Paulista de Fitopatologia, 1979. p.17-81.
08. CHAPOT, H. The citrus plant. In: HÄFLIGER, E., ed. *Citrus*. Basileia, CIBA-GEIGY, 1975. p.6-13.
09. CHATUVERDI, H.C. & MITRA, G.C. Clonal propagation of *Citrus* from somatic callus cultures. *Hortscience*, Virginia, 9(2):118-20, 1974.
10. CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R. & MELO, M. eds. *Biotechnologia para produção vegetal*. Piracicaba, CEBTEC/FEALQ, 1991. 539p.
11. CUNHA SOBRINHO, A.P. da; SOARES FILHO, W. dos S. & PASSOS, O.S. *Porta-enxerto para citros*. Cruz das Almas, EMBRAPA/CNPMPF, 1980. 16p. (Circular Técnica, 3).

12. FIGUEIREDO, J.O. de; POMPEU JUNIOR, J.; RODRIGUEZ, O.; CAETANO, A.A.; ROCHA, T.R. & IGUE, T. Comportamento de dez porta-enxertos para laranja-barão *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 6, 1981. Anais... Recife, Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1981. v.2, p.501-16.
13. _____; _____; _____; _____; SANTOS, R.R.; CIONE, J. & ABRAMIDES, E. Competição de dez porta-enxertos para mexeriqueira-do-rio *Citrus deliciosa* Tenore. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5, Pelotas, 1979. Anais... Pelotas, Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1979. v.2, p.442-63.
14. GIACOMETTI, D.C. Taxonomia e nomenclatura de citros. In: FUNDAÇÃO CARGILL. Citricultura brasileira. Campinas, 1980. cap.7, p.183-94.
15. GOUSSARD, P.G. & WIID, J. A revised approach to the acclimatation of grapevine plantlets cultured "in vitro". *Deciduous Fruit Grower*, Sagterrugteboer, p.29-31, 1989.
16. GRANT, T.J.; MOREIRA, S. & SALIBE, A.A. Citrus variety to tristeza virus in Brazil when used in various rootstocks and scion combinations. *Plant Disease Reporter*, Washington, 45(6):416-21, 1961.

17. GRATTAPLAGIA, D. & CALDAS, L.S. Micropropagação do porta-enxerto tangerina 'Sunki'. In: Simpósio Nacional de Cultura de Tecidos Vegetais, 2, Brasília, 1987. Resumos... Brasília, Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas, 1987. n.p. (Resumo, 20).
18. _____ & MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TOARES, A.C. & CALDAS, L.S., eds. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília, ABCTP/EMBRAPA, 1990. p.99-169.
19. GRIMBLAT, U. Differentiation of *Citrus* stem "in vitro". *Journal of American Society for Horticultural Science*, Virginia, 97(5):559-603, 1972.
20. HUSSEY, G. In vitro propagation. In: INGRAM, D.S. *Tissue culture methods for plant pathologists*. Oxford, 1980. p.53-60.
21. JAMES, D.J. & THURDON, I.J. Rapid "in vitro" rooting of apple rootstock M-9. *Journal of Horticultural Science*, London, 54(4):309-11, 1979.

22. JAMES, D.J. & THURDON, I.J. Shoot and root initiation "in vitro" in apple rootstock M-9 and the promotive effects of phloroglucinol. *Journal of Horticultural Science, London*, 56(1):15-20, 1981.
23. KITTO, S.L. & YOUNG, M.J. "In vitro" propagation of 'Carrizo citrange'. *Hortscience, Virginia*, 16(3):305-6, 1981.
24. KORDAN, H.A. Proliferation of excised juice vesicles of lemon "in vitro". *Science, Washington*, 129:779-80, 1959.
25. MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. *Annual review of plant physiology, Palo Alto*, 25:135-66, 1974.
26. _____ & SKOOG, F. A revised medium for growth and tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum, Copenhagen*, 15(3):473-97, 1962.
27. _____ & TUCKER, D.P.H. Growth factor requirements of *Citrus* tissue culture. In: CHAPMAN, H.D., ed. *International Citrus Symposium*, 1. Riverside, University of California, 1969. p.1155-61.

28. OCHATT, S.J. & CASO, O.M. In vitro meristem of M-4 apple (*Malus pumila* Mill). I. optimal nutrient medium. *Plant Cell Organ Culture, Netherlands*, 2:39-48, 1983.
29. OTONI, W.C. Estudos de propagação "in vitro" de *Citrus sinensis* (L.) Osb. cv. Pera, a partir da cultura de segmentos nodais juvenis. Viçosa, UFV, 1988. 108p. (Tese MS).
30. PASQUAL, M. Regeneração de plantas "in vitro" e radiosensitividade de tecidos nucelares de citros. Piracicaba, ESALQ, 1985. 107p. (Tese de Doutorado).
31. POMPEU JUNIOR, J. Copas e porta-enxertos. In: SIMPÓSIO DE CITRICULTURA, 3, Jaboticabal, 1988. Anais... Jaboticabal, FCAV-FUNEP, 1988. p.155-61.
32. _____. Porta-enxerto para citros. In: FUNDAÇÃO CARGILL. *Citricultura brasileira*. Campinas, 1980. cap.11, p.279-96.
33. _____; FIGUEIREDO, J.O. de; TEÓFILO SOBRINHO, J.; JORGE, J. de P.N. & SALIBE, A.A. Porta-enxertos para laranja-hamlin. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 4, Salvador, 1977. Anais... Cruz das Almas, SBF, 1978. p.105-10.

34. RANGASWAMY, N.S. Experimental studies on female reproductive structures of *Citrus microcarpa* Bunge. *Phytomorphology*, New Delhi, 11(2):109-27, 1961.
35. RODRIGUEZ, O. Produtividade de citros no Brasil. In: SIMPÓSIO DE CITRICULTURA, 3, Jaboticabal, 1988. *Anais...* Jaboticabal, FCAV-FUNEP, 1988. p.15-21.
36. SALIBE, A.A. Importância do porta-enxerto na citricultura. In: ENCONTRO NACIONAL DE CITRICULTURA, 5, Rio de Janeiro, PESAGRO-Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1978. 14p.
37. _____ & MISCHAN, M.M. Efeito do porta-enxerto e da localidade nas características de cinco variedades de laranja doce *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 4, Salvador, 1977. *Anais...* Cruz das Almas, SBF, 1978. p.93-104.
38. _____; _____ & TUBELIS, A. Resultados de dez experimentos de porta-enxertos para laranja doce em Botucatu, SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9, Campinas, 1988. *Anais...* Campinas, Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1988. v.1. p.435-40.
39. SCHOROEDER, C.A. & SPECTOR, C. Effect of gibberellic acid and indolacetic acid on growth of excised fruit tissue. *Science*, Washington, 126:701-2, 1957.

40. SKENE, K.G.M. Cytokinin-like properties of the systemic fungicide benomyl. *Journal of Horticultural Science*, London, 47:179-82, 1972.
41. SNIR, J. & EREZ, A. In vitro propagation of maling merton apple rootstocks. *Hortscience*, Alexandria, 15(5):597-8, 1980.
42. TEIXEIRA, S.L. & LANI, E.R.G. "In vitro" regeneration of *Citrus sinensis* cv. Pera. In: SOMMERS, D.A.; GENGENBAHC, B.G.; BIESBOER, D.D.; HACKET, W.P. & GREEN, C.E., eds. *International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*, 6, Minneapolis, Minnesota, 1986. p.146a.
43. TEÓFILO SOBRINHO, J. Propagação dos citros. In: FUNDAÇÃO CARGILL. *Citricultura brasileira*. Campinas, 1991. p.284-5.
44. _____; SIMÃO, S.; BARBIN, D. & POMPEU JUNIOR, J. Produtividade por metro cúbico e vigor da laranjeira-valência sobre diferentes porta-enxertos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. *Anais...* Viçosa, Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1973. v.1. p.331-41.
45. THOMAS, T.H. Growth regulatory effect of three benzimidazole fungicides on the germination of celery (*Apium graveolens*) seeds. *Annals of Applied Biology*, London, 74:233-8, 1973.

46. VAZ, R.L. Cultura de tecidos: potencial e aplicação. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1, Brasília, 1985. Anais... Brasília, EMBRAPA, 1986. p.9-10.
47. YANG, H.J. Effect of benomyl on *Asparagus officinalis* L. shoot and root development in culture media. *Hortscience*, Virginia, 11(5):473-4, 1976.
48. ZIMMERMAN, R.H. & FORDHAM, I. Simplified method for rooting apple cultivars in vitro. *Journal of American Society for Horticultural Science*, Virginia, 110:34-8, 1985.