

EFEITO DO TRIADIMENOL E DA BENZILAMINOPURINA NA MULTIPLICAÇÃO DE BROTOS *IN VITRO* DO PORTA-ENXERTO 'SUNKI' (*Citrus sunki* Hort. ex. Tan.)¹

José Darlan Ramos²

Moacir Pasqual²

Nilton N.J. Chalfun²

Luis Eduardo Corrêa Antunes²

1. INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira ocupa a primeira posição mundial em produção e exportação de laranja para suco concentrado congelado (SLCC).

Entretanto, 80% das variedades-copas exploradas comercialmente estão enxertadas em limoeiro-cravo (*Citrus limonia* Osbeck cv Cravo). Isso causa preocupação entre os pesquisadores, no sentido de alertar sobre a necessidade de diversificação dos porta-enxertos. Dentre as inúmeras alternativas existentes, de acordo com as pesquisas, está o melhoramento genético através de hibridações, propiciando variabilidade genética. Contudo, esses trabalhos demandam recursos e longo tempo para obtenção dos resultados.

Uma alternativa a curto prazo seria a utilização imediata de outros porta-enxertos que a pesquisa já mostrou serem promissores. Dentre esses a tangerineira 'Sunki' (*Citrus sunki* Hort.ex. Tan.) parece reunir vários

Aceito para publicação em 06.06.1995.

¹ Parte do trabalho do primeiro autor para obtenção do título de Doutor.

² Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras. UFLA. CP. 37- 37200-000, Lavras, MG (O quarto autor é bolsista do CNPq).

atributos favoráveis, principalmente por ser, até o momento, tolerante ao declínio, apesar de ter apresentado número baixo de sementes (média de três por fruto) e baixa adaptabilidade aos diferentes tipos de solos argilosos de algumas regiões. Frutos imaturos deste porta-enxerto têm apresentado número de sementes mais elevado.

Os trabalhos utilizando as técnicas de cultura de tecidos tiveram início na década de 50 (10, 18, 16). Entretanto, grande impulso foi dado a partir do desenvolvimento dos meios de cultura, denominados "MS" (13) e "MT" (14).

De acordo com GRIMBLAT (7), as citocininas são eficientes em promover a formação de ramos, tanto por via indireta como direta. Skoog e Miller (1957), citados por TEIXEIRA (19), demonstraram que a diminuição na concentração da cinetina, de 1,0 para 0,2 mg/L, e o aumento do AIA (ácido indolacético), de 0,2 para 3,0 mg/L, induz à formação de raízes, em detrimento da iniciação de ramos.

O meio "MS" suplementado com BAP, a 10 mg/L, e ANA, a 1,0 mg/L, resultou da formação de ramos a partir de segmentos de raízes de citrange 'Troyer', sem formação de calos (4).

Estudando várias citocininas na proliferação de ramos a partir da cultura de ápices caulinares de ramos de plântulas de *Citrus aurantium*, *Citrus reshni* e citrange 'Carrizo', KITTO e YOUNG (9) verificaram que somente o citrange 'Carrizo' apresentou resposta positiva e a única citocinina que promoveu tal efeito foi a BAP, a 5,0 mg/L, obtendo-se três a quatro ramos por explante.

Inúmeros são os trabalhos já desenvolvidos com esses reguladores de crescimento, isoladamente ou envolvendo ambos, além de outros hormônios acrescentados aos meios para regeneração de plantas *in vitro*.

Além dos fatores ligados à composição do meio de cultura, as respostas morfogenéticas são alteradas de acordo com as condições às quais são submetidas as culturas.

Dentre esses inúmeros fatores, MURASHIGE e TUCKER (14) verificaram que a intensidade luminosa elevada reduziu a proliferação de calos de albêdo, enquanto BRUNET e IBRAHIM (2) observaram o mesmo efeito em vesículas de suco e flavêdo.

Um outro aspecto a ser considerado na morfogênese é a contaminação do meio de cultura, principalmente para explantes provenientes diretamente do campo.

GILADI *et alii* (5) concluíram que plantas desenvolvidas em condições de campo são muito mais contaminadas por bactérias e fungos, sendo a grande maioria deles não-patogênica em condições naturais. Para minimizar os problemas de contaminações do próprio meio e do material vegetal, de modo geral, fungicidas e bactericidas são incorporados ao meio

de cultura. Entretanto, tem-se verificado que esses produtos apresentam efeitos positivos sobre brotações de plantas cultivadas tanto *in vitro* como *in vivo*. Pode-se mencionar, por exemplo, o Benomyl, que, segundo Solel (1973), citado por YANG (22), é absorvido e translocado por células.

YANG (22) afirma que além de proteger o meio de cultura o fungicida preserva também o material vegetal. O Benomyl possui propriedades fúngicas, pois apresenta amplo espectro de ação, sendo pouco tóxico às culturas nas concentrações para essa finalidade (6). Assim, Hauptmam *et alii* (1985), citados por GRATTAPAGLIA & MACHADO (6), trabalhando com várias espécies, utilizando a fusão de protoplasmas e adicionando ao meio concentração de 50 mg/L de Benomyl, controlaram a contaminação de *Penicillium*.

YANG (22) concluiu que, após análise de trabalhos de SAENGER (1970), BECKER (1971) e SCHREIDER (1975), o fungicida Benomyl possuía algumas propriedades reguladoras de crescimento, comumente não observadas e nem a ele atribuídas. De acordo com as afirmações de SKENE (17), o efeito hormonal pode ser consequência da intensidade de manipulação durante o preparo do meio ou de outros fatores desconhecidos. Scruff (1970), citado por THOMAS (21), afirma que esse efeito de regulador de crescimento pode ser devido à semelhança estrutural daquele fungicida com as próprias citocininas.

Alguns pesquisadores têm trabalhado intensamente no sentido de esclarecer essas características atribuídas ao Benomyl. O trabalho de SKENE (17), analisando calos de soja, obteve resposta máxima com dosagens de 25 a 50 mg/L de Benomyl. Efeito semelhante é observado com uma dosagem aproximada de 0,003 mg/L de cinetina, demonstrando que a cinetina é 5.000 vezes mais ativa que o Benomyl para o desenvolvimento de calos. O mesmo autor obteve a resposta máxima com 150 mg/L do fungicida em cotilédones de rabanete, que foi equivalente a 5 mg/L de cinetina, sendo, nesse caso, a cinetina 30 vezes mais ativa que o fungicida.

MOREIRA (12), trabalhando com explantes de tangerineira 'Sunki', concluiu que o melhor tratamento para a produção de brotos maiores que 10 mm foi com a dosagem de 239 mg/L de benomyl, obtendo-se 6,6 brotos por explante, em média. Enquanto para o número total de brotos a melhor dosagem foi de 242 mg/L, com a obtenção de 9,6 brotos por explante.

Observa-se, assim, que há a necessidade não somente de se aprofundar nos estudos referentes ao Benomyl, como também de outros fungicidas que possam atuar como regulador de crescimento *in vitro*. Há evidências de que o triadimenol exerce influência sobre o vigor de plantas no campo, favorecendo o desenvolvimento do sistema radicular e o enfolhamento da planta (8, 11). Segundo ANDREI (1), triadimenol é um

fungicida sistêmico, do grupo dos triazóis, com fórmula β - (4-clorofenoxi)- alfa - (1,1 -dimetiletil) I,H 1,2,4 triazole-1-etanol. O triadimenol é comercializado como concentrado emulsionável (CE), pó molhável (PM) e granulado (GR), classe toxicológica IV. Tem efeito preventivo, curativo e erradicativo, apresentando ainda largo espectro de ação e longo efeito residual. É recomendado principalmente para o controle da ferrugem do café (3).

O presente trabalho teve como objetivo a micropropagação de explantes já estabelecidos *in vitro* com uso do fungicida triadimenol e do fitorregulador benzilaminopurina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras-UFLA, Lavras (MG).

O meio básico utilizado foi o MS (13), suplementado com o fungicida triadimenol nas dosagens de 0, 75, 150, 300 e 600 mg/L e BAP (benzilaminopurina) nas dosagens de 0, 1, 2 e 4 mg/L. O meio foi solidificado com 8 gramas por litro de ágar, sendo seu pH aferido para 6,0 e, em seguida, distribuiu-se 10 ml em tubos de ensaio com dimensões de 25 x 150 mm. Os tubos foram fechados com tampa plástica e esterilizados em autoclave horizontal a uma temperatura de 120°C, 1,3 kg cm⁻², durante 20 minutos. Em seguida foram levados para câmara de fluxo laminar, onde foram inoculados com explantes de aproximadamente 2 cm, contendo duas gemas.

O material vegetal utilizado foi a tangerineira 'Sunki' (*Citrus sunki* Hort ex Tan.). Os explantes empregados foram provenientes de material já estabelecido *in vitro*, obtidos a partir de um só genótipo. A parte superior das brotações foi removida para evitar a dominância apical. Após a inoculação, os tubos foram fechados, protegidos com vitafilme para evitar possíveis contaminações e levados posteriormente para sala de crescimento, a uma temperatura constante de 27°C \pm 1 e 3.000 lux de iluminação, com um fotoperíodo de 16 horas.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com os tratamentos (níveis de triadimenol e BAP) em esquema fatorial 5 x 4, com quatro repetições e quatro tubos por parcela, num total de 80 parcelas (15). A avaliação foi feita 30 dias após a inoculação, contando-se o número de brotações menores que 10 mm, o número de brotações maiores que 10 mm e o número total de brotações. Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão e, para as três características, foram transformados em $(x + 0,5)^{1/2}$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Quadro 1 mostra os resultados das análises de variância com suas respectivas regressões.

O efeito do fungicida sobre as variáveis número de brotos menores que 10 mm, número de brotos maiores que 10 mm e número total de brotos foi significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F, ocorrendo para o benzilaminopurina.

QUADRO 1 - Resumo das análises de variância para as variáveis número de brotos < 10 mm, número de brotos > 10 mm e número total de brotos em diferentes concentrações do fungicida Triadimenol e BAP

| Q. M. | | | | |
|--------------------|------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| Fontes de variação | G.L. | Número de brotos < 10mm | Número de brotos > 10mm | Número total de brotos |
| Fungicida | (4) | 0,6394* | 0,3678* | 1,2074* |
| Regressão linear | 1 | 2,3382* | 1,2272* | 4,7081* |
| " quadrática | 1 | 0,0061 | 0,0271 | 0,0639 |
| " cúbica | 1 | 0,3707* | 0,1963* | 0,0415 |
| " grau 4 | 1 | 0,0586 | 0,0208 | 0,0161 |
| BAP | (3) | 0,6934* | 0,1951* | 0,9512* |
| Regressão linear | 1 | 0,8406 | 0,0204 | 0,5392 |
| " quadrática | 1 | 1,0282* | 0,5357* | 2,1309* |
| " cúbica | 1 | 0,2292* | 0,0294 | 0,1833 |
| Fungicida x BAP | 12 | 0,0952 | 0,0642 | 0,1571 |
| Resíduo | 60 | 0,0746 | 0,0563 | 0,0994 |
| CV (%) | | 18,40 | 21,50 | 18,40 |
| Médias | | 1,4925 | 1,1048 | 1,7116 |

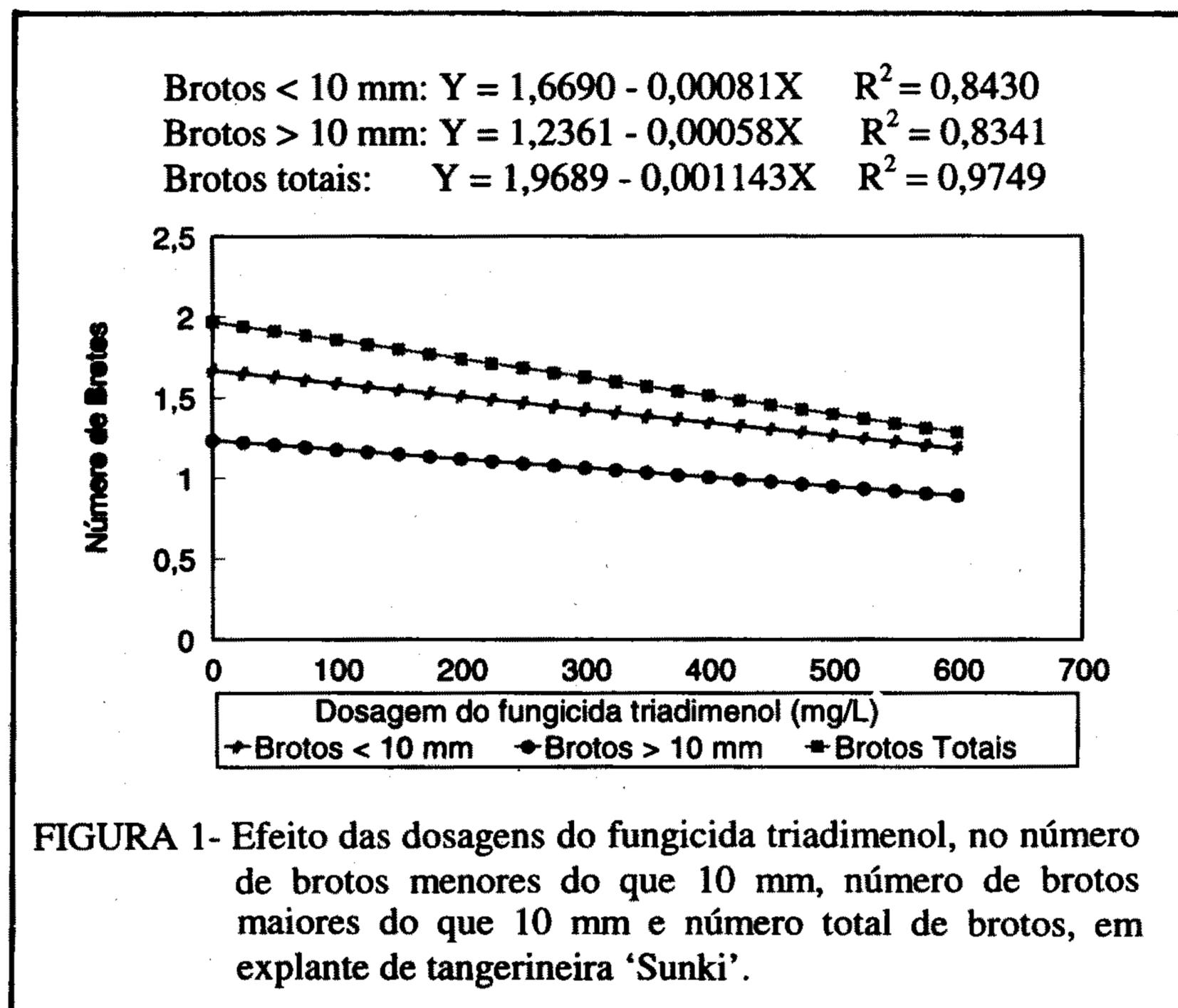
* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F.

A análise estatística da relação entre as três variáveis estudadas em relação ao fungicida indica a regressão linear como a que melhor se ajusta aos dados obtidos. Por outro lado, em relação às dosagens de BAP, a equação que melhor explica a relação entre as variáveis é a quadrática.

Outro aspecto a ser considerado é o coeficiente de variação, que foi alto para todas as variáveis estudadas. Entretanto, experimentos conduzidos *in vitro* têm apresentado coeficientes de variação normalmente elevados, em função dos inúmeros fatores que interferem no comportamento dos explantes.

Verifica-se ainda pelo Quadro 1 que as médias foram semelhantes, contudo, para o número de brotos o valor foi maior, como já era previsto, pois esse reflete a soma total das outras duas variáveis.

Na Figura 1 estão representadas as equações do número de brotos e as curvas correspondentes que explicam as diferenças entre os números de brotos em função das dosagens do fungicida triadimenol. Observa-se que os efeitos foram semelhantes, uma vez que as três variáveis analisadas apresentam uma mesma tendência de decréscimo do número de brotos à medida que se aumentam as doses do fungicida.



Em todos os casos, equações lineares ajustadas a 5% de probabilidade são as que melhor explicam as variações existentes, com R^2 iguais a 84,30, 83,41 e 97,49, respectivamente para número de brotos < 10 mm, > 10 mm e totais. Analisando-se os dados, constata-se que à medida que se aumenta a dosagem do fungicida, menor número de brotações é obtido para as três variáveis estudadas. Os efeitos isolados do fungicida desfavorecem o aumento de brotações nos explantes de tangerineira 'Sunki'. Estes resultados contrariam os de MOREIRA (12), nos quais usando o benomyl acrescido ao meio básico favoreceu a proliferação de brotações, com uma curva de resposta quadrática, obtendo-se um valor máximo na dosagem de 242 mg/L. Deve-se salientar que os resultados de MOREIRA (12) foram com o fungicida benomyl, que mantém certa semelhança estrutural com as citocininas (21).

Apesar de o triadimenol ter apresentado efeitos negativos como indutor de brotações, novas pesquisas devem ser feitas no sentido de elucidar seu comportamento *in vitro*. O citado fungicida poderá apresentar comportamentos diferentes não só como protetor do meio de cultura, mas também como estimulador de brotações em participação com outros reguladores de crescimento.

Analisando-se a Figura 2, observa-se que as três variáveis analisadas em diferentes níveis de BAP apresentam comportamento semelhante. As concentrações que induziram o máximo número de brotos foram: 2,6 mg/L para brotos < 10mm, 1,95 mg/L para brotos > 10mm e 2,4 mg/L para brotos totais.

$$\begin{aligned} \text{Brotos} < 10 \text{ mm: } Y &= 1,2385 + 0,33424X - 0,06395X^2 & R^2 &= 0,8909 \\ \text{Brotos} > 10 \text{ mm: } Y &= 1,0313 + 0,1804X - 0,04616X^2 & R^2 &= 0,9498 \\ \text{Brotos totais: } Y &= 1,4304 + 0,4369X - 0,092X^2 & R^2 &= 0,9357 \end{aligned}$$

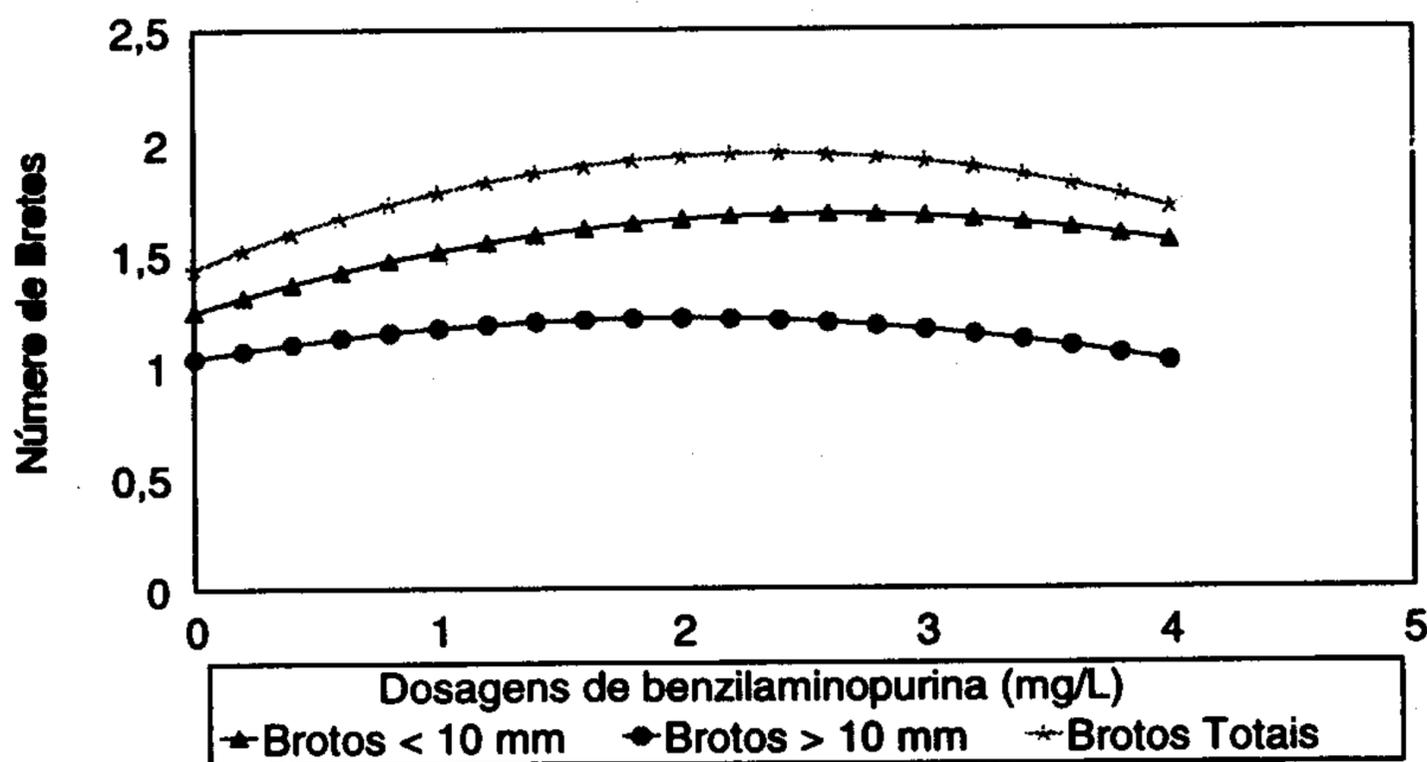


FIGURA 2 - Efeitos das dosagens do BAP no número de brotos menores do que 10 mm, número de brotos maiores do que 10 mm e número total de brotos, em explante de tangerineira 'Sunki'.

Como pode ser observado, os resultados obtidos para as três variáveis estudadas dentro das dosagens de BAP foram melhor representados por uma equação de efeito quadrático, a 5% de probabilidade. Essas equações ajustadas representam coeficiente de determinação de 89,08; 94,98; e 93,57, respectivamente, para número de brotos < 10 mm, > 10 mm e totais. Essas observações sugerem que o BAP, isoladamente, tem efeito sobre o número de brotações. Isso é coerente, por isso o BAP é um regulador de crescimento muito utilizado em trabalhos de

cultura de tecidos. Esses resultados estão de acordo com TEIXEIRA e LANI (20), que obtiveram resultados satisfatórios usando BAP a 0,3 mg/L, com segmentos internodais de *Citrus sinensis* cv. Pêra. Resultados semelhantes também foram obtidos por KITTO e YOUNG (9), em pesquisas com citrange 'Carrizo', obtendo três a quatro brotações por explante.

4. CONCLUSÕES

1. O uso do fungicida triadimenol não foi satisfatório para a proliferação de brotos.
2. As concentrações que induziram o máximo número de brotos foram: 2,6 mg/L para brotos < 10 mm, 1,95 mg/L para brotos > 10 mm e 2,37 mg/L para brotos totais.

5. RESUMO

O presente ensaio foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras (MG). Os explantes utilizados se constituíram de brotos com aproximadamente 2 cm e duas gemas, já estabelecidos *in vitro* da tangerineira 'Sunki' (*Citrus sunki* Hort. ex Tan). O meio básico utilizado foi o "MS" (13) suplementado com o fungicida triadimenol nas dosagens de 0, 75, 150, 300 e 600 mg/L e BAP (benzilaminopurina) nas dosagens de 0, 1, 2 e 4 mg/L. O meio de cultura foi solidificado com 8 gramas por litro de ágar e o pH foi aferido para 6,0. Utilizaram-se 10 ml do meio em tubo de ensaio com dimensões de 25 x 150 mm autoclavados e em seguida os explantes foram inoculados em câmara de fluxo laminar. Após a inoculação, os tubos foram fechados com tampa plástica e levados para sala de crescimento, sendo mantidos à temperatura de 27°C e 3.000 lux, com fotoperíodo de 16 horas. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com esquema fatorial 5 x 4, com quatro repetições e quatro tubos por parcela, num total de 80 parcelas. Após 30 dias da inoculação avaliaram-se o número de brotos menores que 10 mm, número de brotos maiores que 10 mm e número total de brotos.

Nas condições em que o trabalho foi conduzido conclui-se que o uso do fungicida triadimenol não favoreceu a proliferação de brotos e que não houve interação entre triadimenol e BAP para essa variável. A dosagem de BAP que favoreceu a proliferação de brotos menores que 10 mm foi de 2,6 mg/L e para brotos maiores que 10 mm, 1,95 mg/L, enquanto para o número total de brotos foi de 2,37 mg/L.

6. SUMMARY

(EFFECT OF TRIADIMENOL AND BENZILAMINOPURINA ON IN VITRO PROLIFERATION OF SHOOT TIPS OF 'SUNKI' (*Citrus sunki* Hort. ex. Tan.) ROOTSTOCK)

The present assay was done in a tissue culture laboratory in the Department of Agriculture of University Federal of Lavras, Lavras - MG. The explants used were already established *in vitro* sprouts of 'Sunki' mandarin of approximately 2 cm with two buds. The basic medium was "MS" (13), supplemented by triadimenol fungicide in concentrations of (0, 75, 150, 300 and 600 mg L⁻¹ and BAP (Benzilaminopurina) in concentrations of 0, 1, 2 and 4 mg L⁻¹. The culture medium was solidified with 8 g/L of agar and the pH adjusted to 6.0. 10 ml of the medium was used in 25 x 150 mm test tubes. Then the explants were inoculated in a laminar flux chamber. After inoculation the cultures were kept in the growth room for a 16 hours photoperiod, with a light intensity of 3,000 lux, and an average temperature of 27 degrees C. The statistical design used was the entirely randomized factorial scheme 5 x 4, with 4 replications and 5 tubes / parcel. The evaluation was done after four weeks of culturing. The conclusions were that triadimenol fungicide does not help in the proliferation of the shoot tips and that there is no interaction between triadimenol and BAP. The BAP concentrations that favored the proliferation of shoot tips smaller than 10 mm was 2.6 mg L⁻¹ and for shoot tips larger than 10 mm, 1.95 mg L⁻¹, while, for the total number of shoots it was 2.37 mg L⁻¹.

7. LITERATURA CITADA

1. ANDREI, E. *Compêndio de defensivos agrícolas: guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola*. 3 ed. São Paulo, Editora Andrei, 1990. 478 p.
2. BRUNET, G. & IBRAHIM, R.K. Tissue cultures of *Citrus* peel and its potential for flavonoide synthesis. *Zitschrift für Pflauzenphysiologie*, 69: 152-162, 1973.
3. CONTROLE via solo da ferrugem do cafeeiro. *Correio Agrícola*, nº 2:3-5, 1994.
4. EDRIS, M.H. & BURGER, D.W. *In vitro* propagation of "Troyer citrange" from epicotyl segments. *Scientia Horticulturae*, 23: 159-162, 1984.
5. GILADI, I.; ALTMAN, A. & GOREN, R. A method for asseptic culture of bud explants from *Citrus* trees. *Scientia Horticulturae*, 10: 357-362, 1979.
6. GRATAPAGLIA, D. & MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. (eds). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília, ABCTP/EMBRAPA, 1990. p.99-169.
7. GRIMBLAT, U. Differentiation of *Citrus* stem "*in vitro*". *Journal of American Society for Horticultural Science*, 97: 559-603, 1972.

8. JUAN, R.C.C.S.; MATIELLI, A.; SANTINATO, R. & D'ANTONIO, A.M. Efeitos do triadimenol, dissulfoton e associação triadimenol + dissulfoton em cafeeiros com resistência à ferrugem. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 19. Três Pontas, 1993. *Anais...*, Três Pontas, 1993, p.70.
9. KITTO, S.L. & YOUNG, M.J. "In vitro" propagation of "Carrigo Citrange". *HortScience*, 16: 305-306, 1981.
10. KORDAN, H.A. Proliferation of excised juice vesicles of lemon "in vitro". *Science*, 129: 779-780, 1959.
11. MATIELLI, A.; JUAN, R.C.C.S. & MATIELLI, J.B. Modos de aplicação e concentrações de triadimenol, com e sem dissulfoton no plantio do cafeeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 19, Três Pontas, 1993. *Anais...*, Três Pontas, 1993, p.123-124.
12. MOREIRA, M.A. *Efeito do benomyl e do ácido indolbutírico na propagação "in vitro" do porta enxerto Citrus sunki Hort. ex. Tan.* Lavras, ESAL, 1993. 56p. (Tese de Mestrado).
13. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for growth and bioassays tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497, 1962.
14. MURASHIGE, T. & 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. 1155-1161.
15. PIMENTEL GOMES, F. *Curso de Estatística Experimental*. 11 ed. São Paulo, Editora Nobel, 1985. 466p.
16. SCHROEDER, C.A. & SPECTOR, C. Effect of gibberellic acid and indolacetic acid on growth of excised fruit tissue. *Science*, 126: 710-722, 1957.
17. SKENE, K.G.M. Cytokinin-like properties of the systemic fungicide benomyl. *Journal of Horticultural Science*, 47: 179-182, 1972.
18. SWAMY, N.S.R. Experimental studies on female reproductive structures of *Citrus microcarpa* Bunge. *Phytomorphology*, 11: 109-127, 1961.
19. TEIXEIRA, S.L. *Factors affecting rhizogenesis in stem cuttings*. Riverside, University of Riverside, California, 1981. 222p. (Tese Ph.D.).
20. TEIXEIRA, S.L. & LANI, E.R.G. "In vitro" regeneration of *Citrus sinensis* cv. Pêra. In: SOMMERS, D.A. GENGENBAHC, B.G.; BIESBOER, D.D.; HACKETT, W.P. & GREEN, C.E. (eds). INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 6, Minneapolis, Minnesota, 1986. *Proceedings...* Minneapolis, Minnesota, 1986. p. 146a.
21. THOMAS, T.H. Growth regulatory effect of three benzimidazole fungicides on the germination of celery (*Apium graveoleus*) seeds. *Annual Applied Biology*, 74: 233-238, 1973.
22. YANG, H.T. Effect of benomyl on *Asparagus officinalis* L.. shoot and root development in culture media. *HortScience*, 11: 473-474, 1976.