



ARTIGO ORIGINAL

Bruna de Oliveira Soares^{1*}
Vicente Savonitti Miranda¹

Enraizamento *in vitro* e aclimatização *ex vitro* de cultivares de citros

Rooting in vitro and ex vitro acclimatization of citrus cultivars

¹ Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA,
Av. Tancredo Neves, 2501, Bairro Terra Firme,
66077839, Belém, PA, Brasil

*Autor Correspondente:

E-mail: engenheirabruna@hotmail.com.br

PALAVRAS-CHAVE

Ácido indolbutírico
Ácido naftalenoacético
Benzilaminopurina
Citrus sp.

KEYWORDS

Indolbutyric acid
Naphthaleneacetic acid
Benzylaminopurine
Citrus sp.

RESUMO: O sucesso de técnicas biotecnológicas no melhoramento *in vitro* de citros está condicionado à existência prévia de uma metodologia eficiente de regeneração de plantas e muitos fatores estão relacionados à fase de enraizamento e aclimatização, influenciando positiva e/ou negativamente o estabelecimento de protocolos de micropropagação. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo, avaliar o efeito de diferentes concentrações de fitoreguladores no enraizamento *in vitro* dos cultivares cítricos laranja Pêra e limoeiro Cravo, assim como a taxa de sobrevivência dos brotos enraizados na etapa de aclimatização. Para o enraizamento, foram utilizadas brotações cultivadas *in vitro* de cv. Pêra e cv. Cravo, inoculadas em meio de cultura ½ MS, sacarose a 3%, associada a diferentes combinações de BAP (benzilaminopurina), ANA (ácido naftalenoacético) e AIB (ácido indolbutírico) durante quatro semanas. Na aclimatização *ex vitro* as plântulas foram transferidas para casa de vegetação em recipientes plásticos utilizando vermiculita autoclavada como substrato e adição de 10 mL/planta de solução nutritiva quinzenalmente, com avaliações da taxa de sobrevivência das plântulas durante quatro semanas, conforme o meio de enraizamento a que foram submetidas anteriormente. Os resultados para o enraizamento *in vitro*, mostraram os maiores índices de formação de raízes, comprimento de broto e número de gemas, nos meios contendo 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,5 mg L⁻¹ AIB e 0,5 mg L⁻¹ ANA + 2,0 mg L⁻¹ AIB, apresentando raízes longas, ramificadas e finas, proporcionando altas taxas de sobrevivência e melhor desenvolvimento das plântulas durante a aclimatização.

ABSTRACT: The success of biotechnology in improving *in vitro* citrus is conditional on the prior existence of an effective methodology for plant regeneration and many factors are related to the rooting and acclimatization, influencing positively and / or negatively the establishment of micropropagation protocols. Thus, this study aimed to evaluate the effect of different concentrations of growth regulators on *in vitro* rooting of citrus cultivars orange pear and rangpur lime, as well as the survival rate of the shoots rooted in the acclimatization stage. For rooting, they were used sprouts grown *in vitro* cv. Pear and cv. Rangpur lime, inoculated into culture medium ½ MS medium, 3% sucrose, associated with different combinations of BAP (benzylaminopurine), NAA (naphthaleneacetic acid) and IBA (indolebutyric acid) for four weeks. In the acclimatization *ex vitro* plantlets were transferred to a greenhouse in plastic containers using vermiculite autoclaved as substrate and addition of 10 mL / nutrient solution plant every two weeks, with assessments of the survival rate of seedlings for four weeks, as the rooting medium to that were previously submitted. The results for *in vitro* rooting showed the highest rates of root formation, shoot length and number of buds in media containing 1.0 mg L⁻¹ NAA + 1.5 mg L⁻¹ IBA and 0,5 mg L⁻¹ NAA + 2.0 mg L⁻¹ IBA, with long, branched and fine roots, providing high survival rates and better development of seedlings during the acclimatization.

Recebido: 24 ago. 2015
Aceito: 08 set. 2016

1 Introdução

A produção brasileira de laranja apresenta expressiva concentração com respeito às variedades copas e porta-enxertos utilizados, no qual estima-se que o limoeiro ‘Cravo’ (*C. limonia* L. Osbeck) responde por mais de 85% dos porta-enxertos, sendo a laranja ‘Pêra’ (*C. sinensis* L. Osbeck) a variedade-copa predominante (Almeida et al., 2011).

A utilização de técnicas de cultura de tecidos, em especial a micropropagação, é uma importante ferramenta de auxílio ao melhoramento genético dos citros, pois é um procedimento de importância prática e potencial na agricultura, com especial enfoque na produção em larga escala de plantas totalmente ou praticamente isentas de patógenos, no intercâmbio de germoplasma, bem como na pesquisa básica, principalmente de citologia e fisiologia celular, em curto espaço de tempo e em área reduzida (Embrapa, 2014).

A rizogênese *in vitro* é uma das fases mais importantes da micropropagação onde ocorre a formação de raízes adventícias importantes na aquisição de água e de nutrientes, associada à ação de fitorreguladores, principalmente por níveis de auxinas que promovem a divisão celular e mantém a viabilidade das células durante o desenvolvimento das raízes adventícias e quanto maiores e mais desenvolvidas, maior a chance de sobrevivência das plantas *ex vitro* (Saini et al., 2013).

Bassan et al. (2009) relacionaram o uso de auxinas a alguns estudos realizados com citros, enfatizando que os fitorreguladores podem desempenhar importante papel por estarem diretamente relacionados à indução e ao desenvolvimento de raízes, e em alguns casos, esses trabalhos levaram a uma ampla utilização de reguladores de crescimento na produção e na cadeia de comercialização dos frutos.

Assim como Mercier (2012) afirma que o ANA compõe o grupo de auxinas sintéticas e considerável importância agrícola, sendo utilizado em diversas técnicas para enraizamento de plantas, possuindo importante papel em protocolos de cultivo *in vitro*. Por outro lado, Borges et al. (2012), relatam que o ácido indolbutírico (AIB) é a auxina sintética mais empregada atualmente em trabalhos desse gênero e com sucesso no enraizamento *in vitro* de diferentes espécies, pois estimula a iniciação radicial promovendo aumento da porcentagem e a uniformidade do enraizamento, possibilitando a redução do tempo de permanência na fase de produção de mudas, além de não causar fitotoxicidade aos explantes em uma larga faixa de concentração (Pizzatto et al., 2011).

A aclimatização compreende um conjunto de técnicas e procedimentos que têm por objetivo adaptar mudas micropropagadas em laboratório (*in vitro*) às condições de campo (*ex vitro*), ou seja, da condição heterotrófica para autotrófica (Santos et al., 2014). Segundo Silva et al. (2011), o maior problema que restringe o uso da micropropagação é a baixa taxa de sobrevivência das mudas durante a aclimatização *ex vitro*, resultante de uma alta perda de água pela transpiração, ou ainda, as raízes formadas *in vitro* nem sempre são eficientes na absorção de água e de nutrientes no momento da passagem das plântulas que estavam *in vitro* para o substrato.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o enraizamento *in vitro* em diferentes concentrações de fitorreguladores e a taxa de sobrevivência durante a aclimatização *ex vitro* dos cultivares

cítricos de laranja Pêra e limoeiro Cravo durante o processo de micropropagação.

2 Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, localizado na Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Belém – Pará, no período de Dezembro de 2014 a Fevereiro de 2015.

O enraizamento foi realizado após o terceiro subcultivo *in vitro*, a partir de brotos dos cultivares de laranja Pêra (*Citrus sinensis* L. Osbeck) e limoeiro Cravo (*C. limonia* L. Osbeck), inoculados em frascos contendo 40 mL de ½ meio de cultura MS, com metade das concentrações de sais, 3% de sacarose, vitaminas de MS, 0,5% de Ágar, adição de 0,4% Polivinilpirrolidona (PVP) e o pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem do material a 121°C por 20 minutos sob pressão de 1,5 ATM. Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2 x 10, sendo dois cultivares e dez combinações de fitorreguladores (BAP, ANA, AIB), totalizando 20 tratamentos (Tabela 1).

As plântulas foram mantidas em sala de crescimento, sob condições controladas com fotoperíodo de 16 h.luz.dia⁻¹, proporcionados por duas lâmpadas fluorescentes brancas de 20 W e temperatura ambiente de 25 ± 3 °C. As avaliações foram realizadas quanto à indução de raízes, sendo observado o número de raízes/broto, o comprimento das raízes/broto, o número de gemas e o comprimento do broto.

Após quatro semanas, as plântulas dos cultivares laranja Pêra e limoeiro Cravo com sistema radicular formado, foram transferidas dos frascos contendo os meios de enraizamento, e lavadas com água destilada para eliminação dos resíduos da etapa anterior, e transplantadas para copos plásticos descartáveis (100 mL), preenchidos com metade de seu volume com vermiculita comercial autoclavada.

As plantas foram acondicionadas em casa de vegetação na Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA, Belém-PA, onde permaneceram por quatro semanas com prévia cobertura superior de sombrite 30%, a fim de reduzir a incidência solar direta, e cobertura com copos plásticos que foi mantida por 15 dias com irrigação diária das plântulas para manter a umidade do substrato, e a partir do 1º dia, a cobertura plástica foi retirada por uma hora com acréscimos de uma hora a cada

Tabela 1. Meios de enraizamento *in vitro* de laranja Pêra e limoeiro Cravo.
Table 1. Means *in vitro* rooting of orange Pear and Rangpur lime.

Meios de enraizamento	Fitorreguladores (mg L ⁻¹)		AIB
	BAP	ANA	
T1		0,0	0,0
T2		0,5	2,0
T3	0,0	1,0	1,5
T4		1,5	1,0
T5		2,0	0,5
T6		0,5	2,0
T7		1,0	1,5
T8	0,5	1,5	1,0
T9		2,0	0,5
T10		0,0	0,0

dia até o 15º dia, onde a sua remoção foi total. Quinzenalmente a contar da transferência para casa de vegetação, as plantas foram nutridas com 15 mL/planta de solução de ½ MS e vitaminas totais.

As avaliações foram realizadas semanalmente, durante 28 dias, verificando o percentual de sobrevivência das plântulas, assim como aspectos morfológicos da formação foliar, formação de raízes adventícias e o surgimento de gemas/broto adventícios. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade, com o auxílio do programa estatístico ASSISTAT (Silva & Azevedo, 2009).

3 Resultados e Discussão

Os cultivares apresentaram percentual máximo de enraizamento na presença de maiores concentrações de AIB combinadas a baixas concentrações de ANA, como observado nos meios T3 (1,0 mg.L⁻¹ ANA + 1,5 mg.L⁻¹ AIB) com 100% de enraizamento para ambos os cultivares e o meio T2 (0,5 mg.L⁻¹ ANA + 2,0 mg.L⁻¹ AIB), com percentual de enraizamento de 96% para laranjeira Pêra e de 100% para limoeiro Cravo.

Estes resultados foram superiores quando comparados a estudos realizados por Moura et al. (2001), utilizando 1,0 mg.L⁻¹ ANA em brotações provenientes de segmentos internodais de limoeiro Cravo germinadas *in vitro*, obtendo 80% de enraizamento, favorecendo também a emissão de raízes de brotos provenientes de segmentos de epicótilo de laranjeira Pêra (75%) e Valência (80%). Assim como Ghorbel et al. (1998), utilizando 3 mg.L⁻¹ ANA em meio de enraizamento, conseguiram índice de 84% para brotos de *Citrus macrophylla*, porém não obtiveram enraizamento para os brotos de *Citrus paradisi* e *Citrus aurantium*, concluindo que a rizogênese é genótipo-dependente.

Conforme Oliveira et al. (2014), o uso de reguladores de crescimento no enraizamento de plantas cítricas tem sido avaliado

visando à obtenção de melhores resultados deste método na propagação de diferentes espécies e variedades. Em vários estudos, a utilização de auxina foi fundamental na formação de raízes nos segmentos (Bertoni et al., 2006; Souza et al., 2011), mas nem sempre a porcentagem de enraizamento e o número de raízes formadas podem ser maximizados com o aumento na concentração de auxina (Navroski, 2011), como observado nos meios de enraizamento T8 (0,5 mg L⁻¹ BAP + 1,5 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ AIB) e T9 (0,5 mg L⁻¹ BAP + 2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ AIB), assim como o meio T10 (0,5 mg L⁻¹BAP), que promoveram baixas porcentagens de enraizamento, com 42, 38 e 28% para cv. Pêra e para cv. Cravo com 52, 44 e 24%, respectivamente.

Em contrapartida, trabalhos realizados por Silva et al. (2005a, 2005b) obtiveram 58% de brotos enraizados de laranjeira Pêra e 85% de tangerineira Cleópatra a partir de segmentos de epicótilo na ausência de auxina, fato em parte, ocorrido neste trabalho, cujo o meio T1 (sem adição de fitorregulador) obteve 56% de brotos enraizados de laranjeira Pêra e 70% de limoeiro Cravo, possivelmente, por apresentarem acentuado balanço hormonal endógeno, no entanto, a porcentagem foi inferior quando comparada com os meios com adição de auxinas (ANA+AIB), conforme Souza et al. (2011) ao relatarem que o enraizamento adventício envolve a conjugação de auxinas endógenas e exógenas, por isso, quando a espécie possui uma concentração interna adequada de auxina a conjugação com fitorreguladores como ANA ou AIB, por determinados períodos, é suficiente para induzir a formação de raiz *in vitro*.

De acordo com o Teste de Tukey a 5% de probabilidade, em relação ao número de raízes houve diferenças entre cultivares, na qual o limoeiro Cravo obteve 4,51 raízes em relação a laranjeira Pêra com 3,80 raízes e entre os meios de enraizamento, as melhores médias foram obtidas nas plântulas em meio T3 (1,0 mg L⁻¹ ANA+1,5 mg L⁻¹ AIB) com 7,42 raízes não diferindo estatisticamente do meio T2 com 6,50 raízes (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios para número de raízes e comprimento das raízes obtidos a partir de diferentes meios de enraizamento suplementados com BAP, ANA e AIB.

Table 2. Mean values for the number of roots and length of roots obtained from different rooting media supplemented with BAP, NAA and IBA.

Meios enraizamento	Número de raízes			Comprimento da raiz (cm)		
	Pêra	Cravo	MÉDIA ¹	Pêra	Cravo	MÉDIA ¹
T1	3,02	3,16	3,09 ef	3,15 cdB	5,86 dA	4,51 de
T2	5,98	7,02	6,50 ab	8,30 aB	11,38 aA	9,84 a
T3	6,36	8,48	7,42 a	6,80 abB	9,82 abA	8,34 b
T4	4,04	4,92	4,48 cde	4,97 bcB	9,08 bcA	7,03 bc
T5	3,76	3,98	3,87 de	3,33 cdB	6,82 dA	5,08 de
T6	5,10	5,92	5,51 bc	3,73 cdB	7,61 cdA	5,67 cd
T7	4,70	5,36	5,03 bcd	3,44 cdB	6,93 dA	5,19 de
T8	1,82	2,50	2,16 fg	2,25 dB	3,66 efA	2,95 fg
T9	1,94	2,02	1,98 fg	1,83 dA	2,22 fA	2,02 g
T10	1,32	1,78	1,55 g	2,54 dB	5,63 deA	4,08 ef
MÉDIA	3,80 B	4,51 A		4,03 B	6,90 A	
	MG= 4,16 CV%= 24,47			MG= 5,47 CV%= 18,93		

¹Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). T1 (control); T2 (0,5 mg L⁻¹ ANA + 2,0 mg L⁻¹ AIB); T3 (1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,5 mg L⁻¹ AIB); T4 (1,5 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ AIB); T5 (2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ AIB); T6 (0,5 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ ANA + 2,0 mg L⁻¹ AIB); T7 (0,5 mg L⁻¹ BAP + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,5 mg L⁻¹ AIB); T8 (0,5 mg L⁻¹ BAP + 1,5 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ AIB); T9 (0,5 mg L⁻¹ BAP + 2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ AIB); T10 (0,5 mg L⁻¹ BAP).

Quanto ao comprimento das raízes, os maiores valores foram observados para limoeiro Cravo com 6,90 cm diferindo da laranjeira Pêra com 4,03 cm, entre os meios de enraizamento, o meio T2 (0,5 mg L⁻¹ ANA+2,0 mg L⁻¹ AIB) mostrou maior comprimento de raiz com 9,84 cm, e quanto a interação, meio de enraizamento (ME) x cultivar (C), as médias da cv. Cravo para o meio de enraizamento T2 novamente foram superiores com 11,38 cm, não diferindo estatisticamente do meio T3 com 9,82 cm (Tabela 2).

Os meios suplementados apenas com ANA+AIB (T2 e T3) apresentaram excelente formação radicular, com raízes longas, finas e ramificadas para ambos os cultivares e desenvolvimento satisfatório da parte aérea das plântulas, corroborando com a literatura e com as respostas obtidas por PIO et al. (1999), determinaram que o processo de formação de raízes *in vitro* e o comprimento médio de raízes de brotações de *Citrus limonia* Osbeck cv. Cravo, foi influenciado pela utilização de sacarose e de AIB, desta forma, Salisbury & Ross (2006) ressaltaram que o AIB é usado para induzir a formação de raízes com mais frequência que o ANA ou outra auxina, pois o AIB é rapidamente metabolizado especialmente nas fases finais da formação da raiz.

Da mesma forma, Almeida et al. (2002), utilizando brotações de segmentos de epicótilo em meio MT, com ou sem adição de ANA e AIB, obtiveram maiores percentuais de enraizamento para as laranjeiras 'Natal', 'Valência' e 'Hamlin' em combinações de 1,0 mg L⁻¹ BAP com 1,0 mg L⁻¹ AIB, e para limoeiro Cravo, a adição de 0,5 mg L⁻¹ BAP com 1,0 mg L⁻¹ AIB, assegurou regeneração de plantas com altos índices de enraizamento.

Conforme ANOVA, os resultados para o número de gemas revelaram diferenças entre cultivares, com melhores resultados para o limoeiro Cravo com média de 3,32 gemas, em relação a laranjeira Pêra com 2,62 gemas e entre os meios de enraizamento, as maiores médias resultaram do meio T2 (0,5 mg L⁻¹ ANA + 2,0 mg L⁻¹ AIB) com 4,75 gemas, assemelhando-se ao meio

T10 (3,74). Para a interação (ME x C), foi obtido maior número de gemas para o limoeiro Cravo em meio de enraizamento T2 com média de 5,22 gemas, não diferindo estatisticamente de T6 (4,64), T7 (4,04) e T10 (4,26) (Tabela 3).

Em relação ao comprimento das plântulas, altos índices foram alcançados entre os cultivares, com maior comprimento da parte aérea observado no limoeiro Cravo com 7,50 cm em relação a laranjeira Pêra com 6,62 cm. Na interação (ME x C), o meio T3 (1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,5 mg L⁻¹ AIB) se destacou apresentando médias de 14,24 cm para cv. Cravo e a cv. Pêra com 11,63 cm (Tabela 3).

Concordando com observações de Muller & Leyser (2011), em que o aumento do comprimento das raízes aumenta a área de absorção, permitindo maior crescimento da parte aérea, visto as raízes serem as principais fontes de citocininas, assim, houve maior comprimento das plântulas no mesmo meio de enraizamento T3, para limoeiro Cravo com 7,5 cm em relação a laranjeira Pêra com 6,6 cm, em que o maior número de raízes foi observado.

Resultados obtidos por Dias (1998), para o enraizamento de ápices regenerados *in vitro* a partir de segmentos de epicótilo de citrange 'Troyer', com a utilização da combinação de ANA e AIB, mesmo que em concentrações distintas, afirmam que a adição ao meio de cultivo MS da combinação de ANA e AIB, na concentração de 0,5 mg L⁻¹ para ambas auxinas ou de ANA na concentração de 1,0 mg L⁻¹ promoveu enraizamento satisfatório, diferindo dos resultados obtidos por Bassan et al. (2009), que concluíram que esta auxina não mostrou efeito significativo sob nenhuma das variáveis estudadas.

Em estudos realizados, Souza & Pereira (2007), mostraram que concentrações exógenas de auxinas também influenciam no enraizamento *in vitro*, pois em alguns casos, quando há adição de auxina endógena, ocorre o aumento nos níveis endógenos de AIA que decresce antes da formação das raízes o que dificulta ou mesmo impede o enraizamento. As diferentes

Tabela 3. Valores médios dos número de gemas e comprimento da plântula obtidos a partir de diferentes meios de enraizamento suplementados com BAP, ANA e AIB.

Table 3. Mean values for the number of buds and seedling length obtained from different rooting media supplemented with BAP, NAA and IBA.

Meios enraizamento	Número de gemas			Comprimento da plântula (cm)		
	Pêra	Cravo	MÉDIA ¹	Pêra	Cravo	MÉDIA ¹
T1	1,70 dA	2,50 cA	2,10 c	5,68 deA	6,41 deA	6,04 de
T2	4,28 aB	5,22 aA	4,75 a	8,95 bcA	9,14 bcA	9,04 c
T3	4,02 abA	3,14 bcA	3,58 b	11,63 aB	14,24 aA	12,93 a
T4	2,62 bcdA	2,94 bcA	2,78 bc	6,53 dA	7,51 cdeA	7,02 d
T5	1,86 cdA	2,52 cA	2,19 c	7,08 cdA	6,65 deA	6,86 d
T6	2,32 cdB	4,64 aA	3,48 b	10,41 abA	11,20 bA	10,80 b
T7	2,78 bcdB	4,04 abA	3,41 b	6,36 dB	8,59 cdA	7,47 d
T8	2,00 cdA	1,76 cA	1,88 c	3,45 fB	5,58 efA	4,52 ef
T9	1,44 dA	2,22 cA	1,83 c	3,92 efA	3,51 fgA	3,72 fg
T10	3,22 abcB	4,26 abA	3,74 ab	2,23 fA	2,14 gA	2,18 g
MÉDIA	2,62 B	3,32 A		6,62 B	7,50 A	
	MG = 2,97	CV% = 24,04		MG = 7,06	CV% = 15,13	

¹Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). T1 (control); T2 (0,5 mg L⁻¹ ANA + 2,0 mg L⁻¹ AIB); T3 (1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,5 mg L⁻¹ AIB); T4 (1,5 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ AIB); T5 (2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ AIB); T6 (0,5 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ ANA + 2,0 mg L⁻¹ AIB); T7 (0,5 mg L⁻¹ BAP + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,5 mg L⁻¹ AIB); T8 (0,5 mg L⁻¹ BAP + 1,5 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ AIB); T9 (0,5 mg L⁻¹ BAP + 2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ AIB); T10 (0,5 mg L⁻¹ BAP).

respostas de crescimento podem estar, segundo Souto et al. (2010), relacionadas com o estágio fisiológico da espécie que responde diferentemente às concentrações utilizadas dos reguladores de crescimento e da aptidão dos tecidos ou células a receberem este estímulo.

Observações dos aspectos morfológicos das plântulas conforme os meios de enraizamento permitiram confirmar as análises estatísticas realizadas, nas quais, meios suplementados com baixas concentrações de ANA combinadas a altas concentrações de AIB (T2 e T3) apresentaram excelente formação radicular, com raízes longas, finas e ramificadas para ambas as cultivares e desenvolvimento satisfatório da parte aérea das plântulas (Figura 1A-D). De acordo com Freitas et al. (2008), as raízes finas das plantas constituem um dos principais meios para acessar os recursos do solo, sendo seu comprimento e número

indicadores da capacidade de absorção de nutrientes, e quanto maior o enraizamento da planta, maior a capacidade de explorar o solo e aproveitar os nutrientes e a água disponíveis.

A presença apenas de BAP no meio de enraizamento (T10) ou em combinação com altas concentrações de ANA e baixas concentrações de AIB (T8 e T9) para ambos os cultivares, não promoveram um bom desenvolvimento radicular, resultando na formação de raízes curtas, grossas e pouco ramificadas em especial para laranjeira Pêra, interferindo também na formação da parte aérea, com diminuição de brotos e número de folhas (Figura 1E-H). Como citado por Bielach et al. (2012), auxinas e citocininas podem ter efeitos antagonísticos ou complementares, de acordo com a etapa de desenvolvimento da plântula, contudo, o efeito da auxina é significativamente variável entre as espécies, haja vista os inúmeros fatores que estão envolvidos no processo de enraizamento, especialmente o genótipo (Souza & Pereira, 2007; Soares, 2011).

Deste modo, os meios de enraizamento nos quais os cultivares foram submetidos, influenciaram sobre as taxas de sobrevivência durante a aclimatização *ex vitro*, onde os meios T3 e T2 apresentaram maiores taxas de sobrevivência, com 93,6 e 90,5% para as plântulas de laranjeira Pêra, e 95,3 e 91,5% para plântulas de limoeiro Cravo, respectivamente (Figura 1A, B), com índices de sobrevivência crescentes entre a 1ª e 4ª semana.

As plântulas enraizadas no meio T10 (0,5 mg L⁻¹ BAP), apresentaram menores taxas de sobrevivência para ambos os cultivares, com redução gradual significativa da 1ª a 4ª semana, apresentando ao final 22,9% para cv. Pêra e 29,1% para cv. Cravo (Figura 1A, B), com resultados inferiores em comparação as plântulas provenientes do meio T1 (controle).

De fato, as brotações submetidas ao enraizamento *in vitro* em meios T3 (1,0 mg L⁻¹ ANA+1,5 mg L⁻¹ AIB) e T2 (0,5 mg L⁻¹ ANA+2,0 mg L⁻¹ AIB), produziram raízes longas, finas e bem ramificadas, com ótimo desenvolvimento da parte aérea (formação de novos brotos e gemas), adaptando-se muito bem as condições de aclimatização *ex vitro*, com altas taxas de sobrevivência (Figura 2A, B, G). Concordando com Dewir et al. (2005), ao afirmarem que o número de raízes bem como a altura da planta e o número de brotações são fatores decisivos para sua sobrevivência, pois plantas com maior número de raízes e maior comprimento de parte aérea respondem melhor ao processo de aclimatização *ex vitro*.

Por outro lado, o meio T10 (0,5 mg L⁻¹ BAP) produziu plântulas com raízes grossas e curtas com poucas ramificações, o que as torna indesejáveis para o posterior processo de aclimatização devido a ineficiência na absorção de água e nutrientes e deficiente formação da parte aérea, apresentaram clorose foliar, queima das folhas, abscisão foliar seguida da morte da plântula, folhas anormais, limitando seu desenvolvimento (Figura 2C-F, H, I). Sendo assim, visando a formação de raízes com qualidade, muitos autores apontam para a necessidade de inclusão de uma auxina na fase de indução do enraizamento em espécies frutíferas, promovendo acréscimo na taxa de sobrevivência das plantas após a transferência para as condições *ex vitro* (Barbosa et al., 2008).

Durante a aclimatização *ex vitro* de plântulas microenxertadas de laranjeiras Lima e Buckeye Navel, tangerineira Clementina e Fortunella, Povedano et al. (2012), obtiveram 100% de

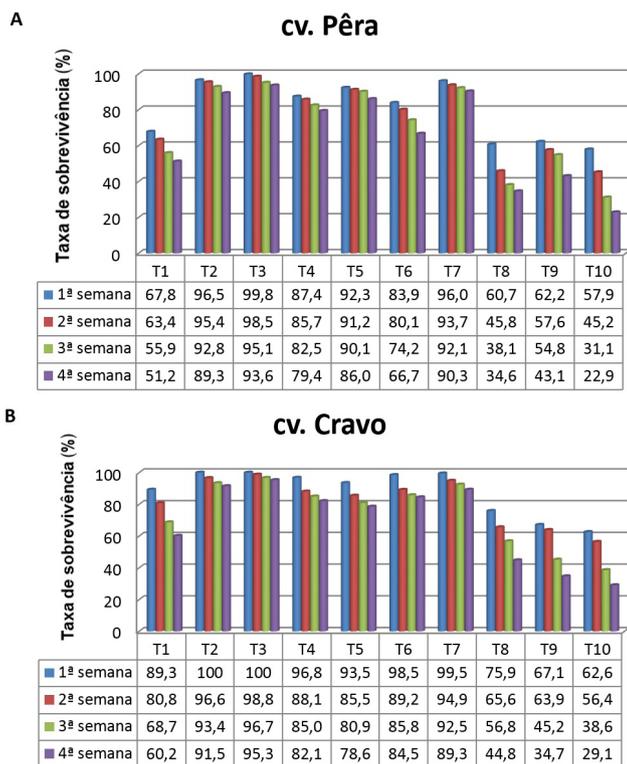


Figura 1. Taxa de sobrevivência na 1ª, 2ª, 3ª e 4ª semana, de laranjeira Pêra e limoeiro Cravo, A e B respectivamente, provenientes do enraizamento *in vitro*, submetidas à aclimatização *ex vitro* em casa de vegetação. T1 (controle); T2 (0,5 mg L⁻¹ ANA + 2,0 mg L⁻¹ AIB); T3 (1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,5 mg L⁻¹ AIB); T4 (1,5 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ AIB); T5 (2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ AIB); T6 (0,5 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ ANA + 2,0 mg L⁻¹ AIB); T7 (0,5 mg L⁻¹ BAP + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,5 mg L⁻¹ AIB); T8 (0,5 mg L⁻¹ BAP + 1,5 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ AIB); T9 (0,5 mg L⁻¹ BAP + 2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ AIB); T10 (0,5 mg L⁻¹ BAP).

Figure 1. Survival rate in the 1st, 2nd, 3rd and 4th week of orange and pear Rangpur, A and B respectively, from the *in vitro* rooting submitted to *ex vitro* acclimatization in greenhouse. T1 (control); T2 (0,5 mg L⁻¹ ANA + 2,0 mg L⁻¹ AIB); T3 (1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,5 mg L⁻¹ AIB); T4 (1,5 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ AIB); T5 (2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ AIB); T6 (0,5 mg L⁻¹ BAP + 0,5 mg L⁻¹ ANA + 2,0 mg L⁻¹ AIB); T7 (0,5 mg L⁻¹ BAP + 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,5 mg L⁻¹ AIB); T8 (0,5 mg L⁻¹ BAP + 1,5 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ AIB); T9 (0,5 mg L⁻¹ BAP + 2,0 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ AIB); T10 (0,5 mg L⁻¹ BAP).

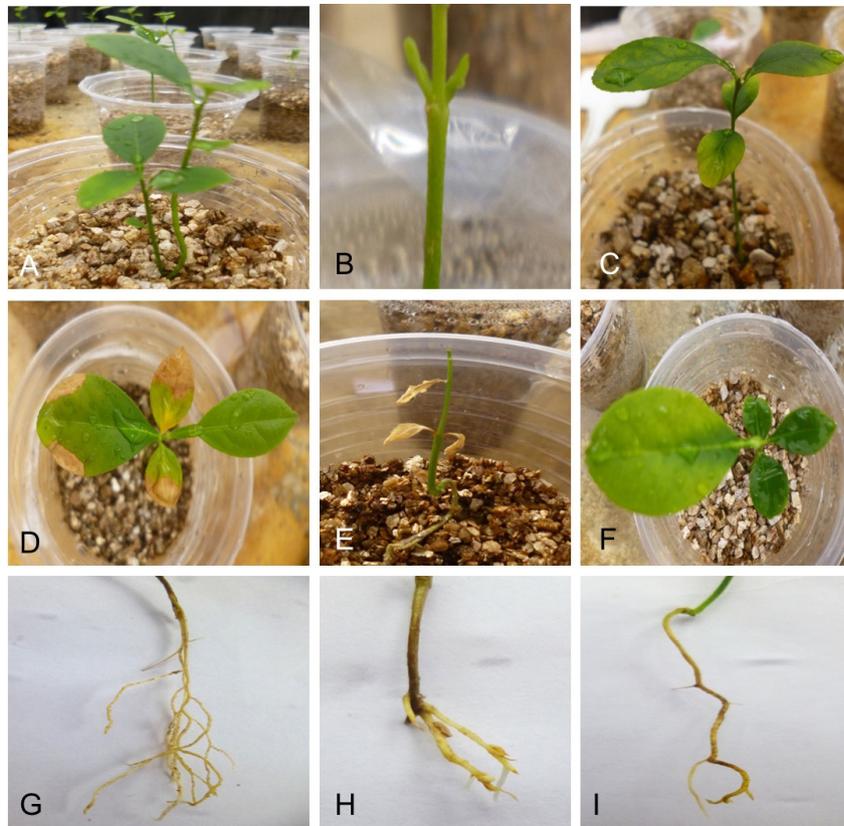


Figura 2. Aclimatização de plântulas dos cultivares cítricos laranja Pêra e limoeiro Cravo submetidas à aclimatização *ex vitro* em casa de vegetação. Universidade Federal Rural da Amazônia. Belém/PA. Em: (A) Planta em condições normais de desenvolvimento, (B) formação de novas brotações, (C) clorose foliar, (D) queima das folhas, (E) abscisão foliar, (F) folhas deformadas, (G) sistema radicular bem ramificado com raízes longas e finas, (H) e (I) sistema radicular curto com poucas ramificações.

Figure 2. Acclimatization of seedlings of orange citrus varieties Pear and Rangpur lime submitted to *ex vitro* acclimatization in the greenhouse. Amazon Federal Rural University. Belém / PA. In (A) in normal plant growth conditions, (B) formation of new shoots, (C) leaf chlorosis, (D) firing the leaves, (E) leaf abscission, (F) deformed sheets, (G) root system and branched with long and fine roots, (H) and (I) Short root system with few branches.

sobrevivência das plântulas em aproximadamente 45 dias. Para Silva et al. (2005a), na regeneração *in vitro* de plantas de tangerina Cleópatra, utilizando concentração $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ANA no meio de enraizamento, obtiveram 100% de plantas enraizadas e com 100% de sobrevivência após aclimatização em casa de vegetação.

O alto percentual de sobrevivência das mudas micropropagadas também foi relatada por outros autores, como Vieira et al. (2007), ao afirmarem que as raízes produzidas na presença de vermiculita apresentam-se mais rústicas, alongadas, com ramificações e presença de pêlos absorventes e, no transplante para a aclimatização, essas características são determinantes para a obtenção de uma alta taxa de sobrevivência de plantas.

Segundo Hazarika (2006), plântulas cultivadas *in vitro* geralmente apresentam características morfofisiológicas diferentes quando comparadas àquelas que cresceram diretamente no campo ou em casa de vegetação, essas alterações morfológicas e fisiológicas influenciam severamente os processos metabólicos e fisiológicos associados, principalmente, com a fotossíntese e a transpiração. Além disso, conforme Faisal & Anis (2009), plantas mantidas *in vitro*, quando expostas às baixas intensidades luminosas, normalmente adquirem características de plantas de sombra, e ao serem transferidas para condições *ex vitro* com maiores irradiâncias luminosas, podem sofrer estresses

causados pela luz, incluindo fotoinibição ou fotoxidação da clorofila, resultando em folhas cloróticas.

Portanto, visando à produção comercial em larga escala, a diminuição do tempo de aclimatização e as altas taxas de sobrevivência obtidas nesse trabalho, podem ser um fator econômico de extrema importância na produção de mudas de citrinos.

4 Conclusões

Meios de enraizamento *in vitro* suplementados com baixas concentrações de ANA combinadas a altas concentrações de AIB e sem adição de BAP, proporcionam resultados positivos favorecendo a formação e desenvolvimento radicular e aéreo da laranja Pêra e limoeiro Cravo, proporcionam maiores taxas de sobrevivência e adaptação das plantas durante o processo de aclimatização *ex vitro*.

Referências

ALMEIDA, C. O; PASSOS, O. S; CUNHA SOBRINHO, A. P; SOARES FILHO, W. S. Citricultura Brasileira: Em busca de novos rumos, desafios e oportunidades na região Nordeste. Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, 2011,160p.

- ALMEIDA, W. A. B.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MENDES, B. M. J.; RODRIGUEZ, A. P. M. *In vitro* organogenesis optimization and plantlet regeneration in *Citrus sinensis* and *C. limonia*. *Scientia Agricola*, v.59, p.35-40, 2002.
- BARBOSA, W.; PIO, R.; VEIGA, R. F. A.; CHAGAS, E. A.; FELDBERG, N. P.; CAMPAGNOLO, M. A.; DALASTRA, I. M. Efeito de concentrações do AIB no enraizamento *in vitro* de cultivares de figueira. *Biosci. J.*, v.24, p.1-6, 2008.
- BASSAN, M. M.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MENDES, B. M. J. Enraizamento de estacas do híbrido somático laranja 'caipira' + limão 'volkameriano' e de seus genitores. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal - SP, v. 31, p. 602-606, 2009.
- BERTONI, B. W.; DAMIÃO FILHO, C. F.; MORO, J. R.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. Micropropagação de *Calendula officinalis* L. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 8, p. 48-54, 2006.
- BIELACH, A.; DUCLERCQ, J.; MARHAVÝ, P.; BENKOVÁ, E. Genetic approach towards the identification of auxin-cytokinin crosstalk components involved in root development. *Philosophical Transactions of the Royal Society British*, v.367, p. 1469-1478, 2012.
- BORGES, S. R. XAVIER, A.; OLIVEIRA, L. S. D.; LOPES, A. P.; OTONI, W. C.; TAKAHASHI, E. K.; MELO, L. A. D. Estabelecimento *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. *Ciência Florestal*, v.22, p. 605-616, 2012.
- DIAS, J. M. M. Organogenesis "in vitro" em segmentos de epicotilo de citrange troyer. Valência: Departamento de Biologia Vegetal, 1998. 317p. (Tesis Doctoral)- Universidad Politécnica de Valencia. 1998.
- EMBRAPA. *Embrapa abre inscrições para curso sobre micropropagação de plantas*. 2014. Disponível em: <<http://www.portaldogronegocio.com.br/noticia/embrapa-abre-inscricoes-para-curso-sobre-micropropagacao-de-plantas-112165>>. Acesso em: 10 Novembro 2014.
- FAISAL, M.; ANIS, M. Changes in photosynthetic activity, pigment composition, electrolyte leakage, lipid peroxidation, and antioxidant enzymes during ex vitro establishment of micropropagated *Rauwolfia tetraphylla* plantlets. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v.99, p.125-132, 2009.
- FREITAS, T. A. S.; BARROSO, D. G.; CARNEIRO, J. G. A. Dinâmica de raízes de espécies arbóreas: visão da literatura. *Ciência Florestal*, v.18, p.133-142, 2008.
- GHORBEL, B. R.; NAVARRO, L.; DURAN-VILA, N. Morphogenesis and regeneration of whole plants of grapefruit (*Citrus paradisi*), sour orange (*C. aurantium*) and alemow (*C. macrophylla*). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, v. 73, p. 323-327, 1998.
- HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, v.108, p.105-120, 2006.
- MERCIER, H. *Auxinas*. In: KERBAUY, G. B. (ed.) *Fisiologia Vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 431p. 2012.
- MOURA, T. L. M.; ALMEIDA, W. A. B.; MENDES, J. M. B.; MOURÃO FILHO, F. A. A. Organogênese *in vitro* de *Citrus* em função de concentração de BAP e seccionamento do explante. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.23, p.240-245, 2001.
- MULLER D.; LEYSER, O. *Auxin, cytokinin and the control of shoot branching*. *Annals of Botany*, v. 107, p. 1203-1212, 2011.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NAVROSKI, M. C. Multiplicação *in vitro* de genótipos de *Eucalyptus dunnii Maiden*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria. 2011. 101p.
- OLIVEIRA, E. R. M.; RODRIGUES, M. J. S.; DANTAS, A. C. V. L.; SOARES FILHO, W. S.; GIRARDI E.A. Efeito do ácido indolbutírico no enraizamento e o crescimento de quinze porta-enxertos de citros propagados por estaquia. *Citrus Research & Technology*, v.35, p.35-43, 2014.
- PIO, R.; PIO, L. A. S.; RAMOS, J. D.; SILVA, A. B.; CUNHA NETO, F. R. Utilização da sacarose e ácido indolbutírico no enraizamento *in vitro* de brotações do porta-enxerto *Citrus limonia Osbeck* cv. Cravo. *R. Un. Alfenas*, v.5, p.205-208, 1999.
- PIZZATTO M.; WAGNER JÚNIOR A.; LUCKMANN D.; PIROLA K.; CASSOL D. A.; MAZARO S. M. *Influência do uso de AIB, época de coleta e tamanho de estaca na propagação vegetativa de hibisco por estaquia*. *Revista Ceres* v.58; p. 487-492, 2011.
- POVEDANO, L.; HENRIQUE, F. H.; TULMANN NETO, A.; LATADO, R. R. *Obtenção de plantas tetraploides de citros visando a produção de frutos triploides sem sementes*. *Citrus Research & Technology*, v.33, p.65-74, 2012.
- SAINI, S.; SHARMA, I.; KAUR, N.; PATI, P. K. Auxin: a master regulator in plant root developed. *Plant Cell Reports*, v. 32, p. 741-757, 2013.
- SALISBURY, F.; ROSS, C. *Fisiologia de las plantas - Desarrollo de las Plantas y Fisiologia Ambiental*. Madrid, Thomson Edited Spain Paraninfo, v. 3, 2006, 460p.
- SANTOS, M. R. A.; LIMA, R. A.; FERREIRA, M. G. R.; ROCHA, J. F.; ESPÍNDULA, M. C.; ALVES, E. A. Aclimatização de mudas micropropagadas de *Coffea Canephora*. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, v. 5, p. 12-19, 2014.
- SILVA, A. L. L.; OLIVEIRA, Y.; COSTA, J. L.; SCHEIDT, G. N.; CARVALHO, D. C.; SANTOS, J. D.; GUERRA, E. P. Pré-aclimatização e aclimatização em cultivo hidropônico de plantas micropropagadas de *Eucalyptus saligna Symphyomyrtus*. *Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais*, v. 9, p. 179-184, 2011.
- SILVA, F. A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. *Principal Components Analysis in the Software Assisat-Statistical Attendance*. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.
- SILVA, R. P.; COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, A. S. ALMEIDA, W. A. B.. Regeneração de plantas de laranja 'Pêra' via organogênese *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.40, p.1153-1159, 2005a.
- SILVA, R. P.; SOUZA, E. S.; REBOUÇAS, F. S.; ALMEIDA, W. A. B.. Otimização de protocolos para regeneração de plantas *in vitro* de tangerina 'Cleópatra' (*Citrus resnyi Hort. ex Tan.*). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.27, p.484-487, 2005b.
- SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. D.; NERY, F. C.; VARGAS, D. P.; SILVA, D. R. G. Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. *Revista Ciência e Agrotecnologia*, v. 35, p. 152-157, 2011.
- SORGATO, J. C.; LEMES, C. S. R.; RAMOS, W. B.; SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J. Acido naftalenoacético no enraizamento *in vitro* de

Dendrobium phalaenopsis Fitzgerald. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, v.10, p. 72-79, 2014.

SOUTO, J. S.; MORIMOTO, J. M.; FERREIRA, W. M.; NAKABASHI, M.; SUZUKI, M. Efeitos do ácido naftalenoacético no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindl. (Orchidaceae). *Revista Brasileira de Biociências*, v. 8, p.179-185. 2010.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. v.9, p.103-117, 2007.

SOUZA, A. V.; SOUZA, A. V.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Conservação e enraizamento *in vitro* de infalível (*Mandevilla velutina* K.Schum.), uma planta medicinal do Cerrado. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.13, p.319-327, 2011.

VIEIRA, R. L.; LEITE, G. B.; WAMSER, A. F. Efeito de substratos porosos no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira M-9 (*Malus pumilla*). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.29, p.128-132, 2007.

Contribuição dos autores: O trabalho é parte da dissertação de mestrado do primeiro autor (Bruna de Oliveira Soares), ou seja, participou de todas as etapas para a realização deste trabalho. Vicente Savonitti foi o orientador do primeiro autor, contribuindo com a idéia e objetivos do trabalho, orientou, ajudou na revisão dos dados e discussão dos resultados.

Agradecimentos: À Universidade Federal Rural da Amazônia, através do programa de pós-graduação em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de pós-graduação ao primeiro autor.

Fonte de financiamento: A Universidade Federal Rural da Amazônia, através do programa de pós-graduação em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária pelo fornecimento de material e disponibilização do laboratório, e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo fornecimento da bolsa de pós-graduação.

Conflito de interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesse.