

# **EFEITO DO ÁCIDO INDOLBUTÍRICO E TEMPO DE INCUBAÇÃO NA ACLIMATIZAÇÃO DE BROTOS OBTIDOS 'IN VITRO' DO PORTA- ENXERTO *Citrus sunki* Hort ex Tan.<sup>1</sup>**

Maria Aparecida Moreira<sup>2</sup>

Moacir Pasqual<sup>2</sup>

Gladyston R. Carvalho<sup>2</sup>

Mariana Del Ben Mayer<sup>2</sup>

## **1. INTRODUÇÃO**

O Brasil é um dos principais países produtores de citros e o maior exportador de suco concentrado congelado. Dentre os estados brasileiros, São Paulo tem-se destacado como o principal produtor. A produtividade paulista é ainda considerada baixa, podendo entretanto ser melhorada com adoção de tecnologias mais aprimoradas no estabelecimento e na condução dos pomares (16).

O porta-enxerto mais utilizado no Brasil é o limão-cravo, que apresenta excepcionais qualidades que satisfazem tanto o produtor de mudas quanto o citricultor. A diversificação dos porta-enxertos é importante, porque, atualmente, verifica-se o abandono de três dos mais importantes porta-enxertos: a laranja azeda, em razão do vírus da tristeza, o

---

<sup>1</sup>Aceito para publicação em 22.08.1997.

<sup>2</sup>Departamento de Agricultura. Universidade Federal de Lavras (UFLA). Cx. P. 37, 37200-000 Lavras-MG.

limão rugoso e a Trifoliata, cujas causas desse abandono não são ainda conhecidas (14).

O porta-enxerto *Citrus sunki* Hort ex Tan. pode ser uma opção para essa diversificação, graças às seguintes características: bom comportamento em relação ao vírus da tristeza (6), tolerância ao declínio (15), boa produção em peso de frutos (4), precocidade de produção (3) e boa qualidade de frutos (17).

A cultura de tecidos possibilita a regeneração de plantas de interesse econômico, a partir de meristemas, células ou órgãos, com o objetivo de aumentar a produção e produtividade agrícola.

CROCOMO *et alii* (2) citam 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 (19).

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, em razão de algumas particularidades apresentadas por essas espécies como: poliembrionia, esterilidade gamética, incompatibilidade e longo período juvenil das plântulas.

A fase de aclimatização dos brotos obtidos "in vitro" pode tornar-se um fator limitante na micropropagação, em virtude das mudanças drásticas que as plantas enfrentam quando são transferidas dos tubos de ensaio para as casas de vegetação.

Algumas técnicas alternativas têm sido estudadas, com o propósito de não se perder plantas na aclimatação. São elas: embebição de gemas em meio enraizante e transferência das plantas para outro composto quando aparecem as raízes (8); eliminação ou redução da fonte de açúcar no meio de enraizamento; aumento da concentração de CO<sub>2</sub> e intensidade luminosa (7); e retirada da tampa do frasco ou tubo cinco ou seis dias antes da transferência das plantas para o substrato (5).

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, do ponto de vista econômico e de qualidade do sistema radicular (7), mesmo porque as raízes formadas no ágar não são funcionais quando transplantadas e, por essa razão, novas raízes têm que se desenvolverem e se tornarem aptas para absorver água do solo (1). Considerando esse aspecto, ZIMMERNAN *et alii* (20) citam que pode-se

fazer a indução ao enraizamento "in vitro" e deixar que o alongamento ocorra no substrato de transplante, o que leva a um melhor desenvolvimento do sistema radicular (20), concordando com Monette (1986), citado por GRATTAPAGLIA e MACHADO (7), que conseguiu melhores resultados ao enraizar partes aéreas diretamente em substrato, após tratamento em AIB em solução aquosa.

O uso do meio líquido para enraizamento também leva à formação de um sistema radicular mais completo. KITTO e YOUNG (11) observaram decréscimo de 70% para 10% na taxa de enraizamento de citrus com o aumento na concentração de ágar de 0,5 para 2%. JAMES e THURDON (9); SNIR e EREZ (18); e JAMES e THURDON (10) citam que o meio líquido pode controlar o excesso de calos que prejudicam o alongamento das raízes. O uso do meio líquido com AIB também reduz a formação de calos (13).

O objetivo deste trabalho foi promover a indução ao enraizamento 'in vitro' do porta-enxerto *Citrus sunki* Hort ex Tan. com posterior transferência das plantas para o substrato plantmax, em casa de vegetação.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de cultura de tecidos e na casa de vegetação do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Os brotos utilizados na aclimação foram obtidos pela germinação "in vitro" de sementes em meio de cultura contendo os 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. O material obtido na germinação foi multiplicado, usando-se o meio MS suplementado com os reguladores de crescimento e respectivas dosagens: 2,0 mg/l de BAP; 0,1 mg/l de ANA; e 4,0 mg/l de GA<sub>3</sub>.

Foram feitas sucessivas repicagens até a obtenção de material suficiente para realizar o experimento. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 4 (concentrações de AIB - 0, 20, 40 e 60 mg/l; incubação - 12, 24, 48 e 96 horas), sendo constituído de quatro repetições com quatro plantas/repetição.

A incubação dos explantes (2,5-3,0 cm) foi feita em tubos de ensaio de 150 x 25 mm, contendo água, e o regulador de crescimento autoclavado, com a ajuda de uma ponte de papel-filtro para que se mantivesse apenas a parte basal mergulhada na solução. Os tubos, contendo as plantas, foram mantidos em sala de crescimento, sob temperatura variando entre 22 e

26°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa em torno de 60 $\mu$ mol quantum/m<sup>2</sup>s<sup>2</sup>, 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 por 45 dias, com temperatura e umidade controladas.

A avaliação do número de plantas sobreviventes, número de plantas enraizadas e peso de matéria seca de raiz foi feita após 45 dias.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando os dados obtidos na aclimatização verificou-se que o porta-enxerto *Citrus sunki* Hort ex Tan. tem ótimo comportamento nesta fase, pois o índice de plantas sobreviventes (Quadro 1) foi de 94,92%, destas 100% enraizaram.

QUADRO 1 - Número médio de plantas sobreviventes obtido na aclimatização do porta-enxerto <i>Citrus sunki</i> Hort ex Tan.				
Tempo (h)	AIB(mg/l)			
	0	20	40	60
12	4,00	4,00	4,00	4,00
24	3,75	4,00	3,75	3,00
48	4,00	4,00	3,75	3,25
96	4,00	3,75	4,00	3,50

Quanto ao peso da matéria seca de raiz, os dados obtidos (Quadro 2) mostraram significância apenas do tempo de incubação e não-significância das doses de AIB e interação entre os dois fatores. Esses resultados podem ser visualizados na Figura 1, onde o máximo de matéria seca de raiz ocorreu com aproximadamente 60 horas, independentemente do uso de AIB.

A perda de plantas ocorreu nos primeiros 21 dias e foi observado acúmulo de musgo no substrato que, provavelmente, foi a causa da deterioração do colo da planta. Por isso, é desejável adequar um substrato ideal que suporte muita umidade, sem favorecer o desenvolvimento de microrganismos, porque nos primeiros dias de aclimatização a planta necessita de muita umidade.

QUADRO 2 - Peso médio de matéria seca de raiz obtido na aclimatização do porta-enxerto <i>Citrus sunki</i> Hort ex Tan.				
Tempo(h)	AIB(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

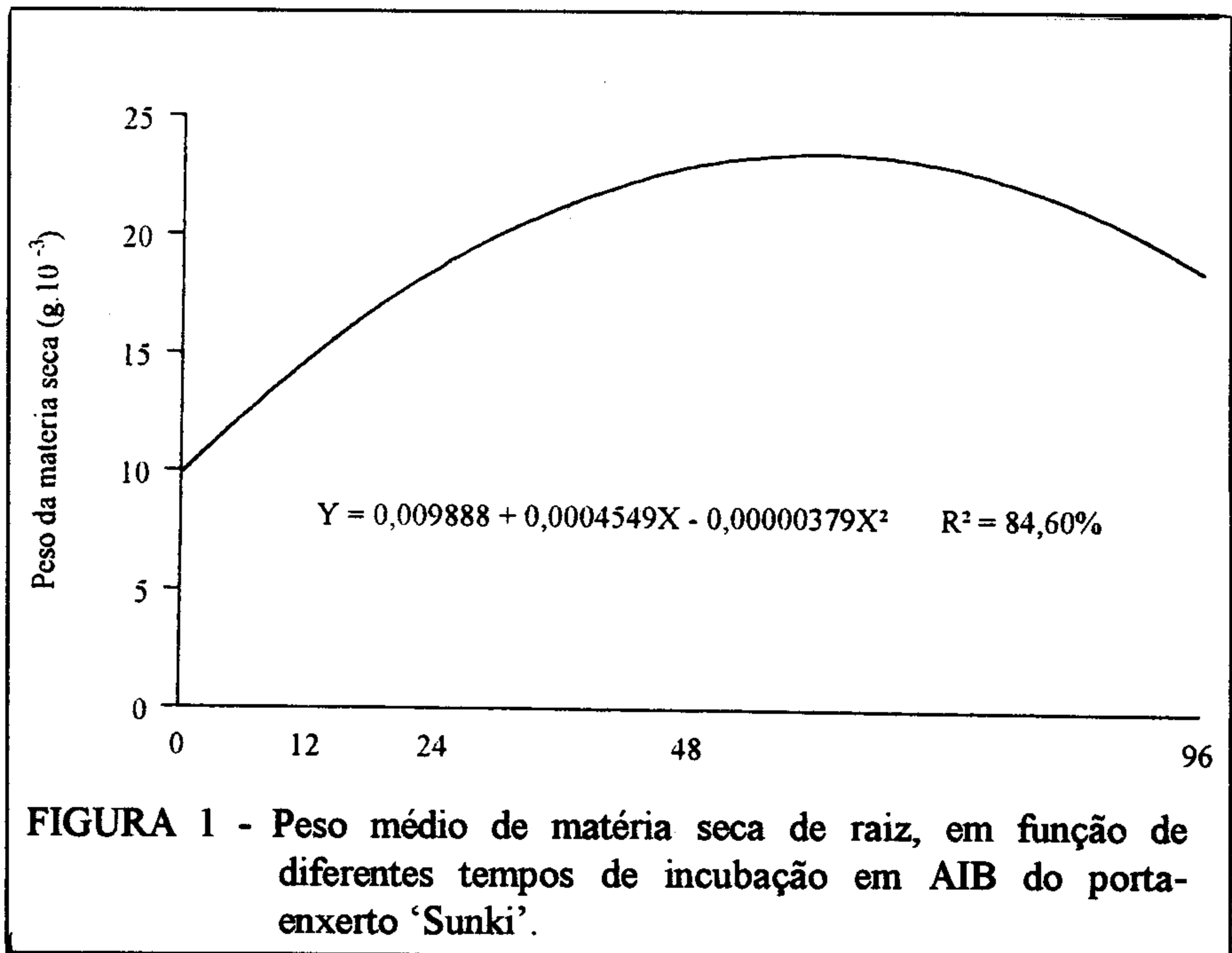


FIGURA 1 - Peso médio de matéria seca de raiz, em função de diferentes tempos de incubação em AIB do porta-enxerto 'Sunki'.

Segundo MELLO (12), um substrato ideal deve ser de baixa densidade, boa capacidade de retenção de água, aeração e drenagem, boa coesão entre partículas ou aderência junto às raízes e ser preferencialmente um meio estéril.

A variável peso da matéria seca da raiz indicou a necessidade de incubação em água por 60h para obtenção de maior peso dessa matéria.

A formação de calos é uma barreira física para o alongamento das raízes, após iniciação radicular. Uma forma de controlar o excesso de calos é transferir as plantas para um meio sem reguladores de crescimento (9, 10, 18). Isso foi observado para o porta-enxerto "Sunki", quando as plantas

eram mantidas em meio MS sem regulador de crescimento, onde as plantas enraizaram com facilidade. Um outro meio de reduzir a formação de calos é utilizar meio líquido com AIB (13).

A redução da sacarose nos meios de cultura estimula a planta a realizar fotossíntese (7), e a incubação em água funcionaria como uma pré-aclimatização.

#### 4. CONCLUSÕES

1) Não foi observada influência do AIB na aclimatização da tangerineira 'Sunki'.

2) A incubação em água por 60 horas resultou em máximo acúmulo de matéria seca de raiz.

#### 5. RESUMO

A micropropagação tem se mostrado de grande eficiência em inúmeras espécies, principalmente frutíferas e ornamentais. No entanto, o que se observa nesta técnica é a elevada percentagem de perda de plantas na fase de aclimatização e de transferência das plantas micropropagadas para o substrato, em casa de vegetação. Objetivou-se, com este trabalho, a aclimatização de brotos obtidos "in vitro" do porta-enxerto *Citrus sunki* Hort ex Tan. Brotos com 2,5 a 3,0 cm foram incubados em água, em concentrações de 0, 20, 40 e 60 mg/l de AIB, durante 12, 24, 48 e 96 horas, utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Avaliaram-se o número de plantas sobreviventes, número de plantas enraizadas e peso de matéria seca de raiz. Os dados mostraram índice de enraizamento de 100%, índice de plantas sobreviventes de 94,92%, e para peso de matéria seca de raiz constatou-se que há necessidade de incubação das plantas em água, durante 60 horas, para obtenção de maior peso dessa matéria.

#### 6. SUMMARY

(EFFECT OF IBA AND INCUBATION TIME ON ACCLIMATION OF SPROUTS OBTAINED 'IN VITRO' FROM *Citrus sunki* HORT EX TAN. ROOTSTOCK)

Micropropagation has proved to be very effective to a number of species, specially fruit trees and ornamentals. A disadvantage of this technique, however, is the high percentage of plants loss during acclimation

and transfer to the substratum. This work aimed to acclimate sprouts obtained 'in vitro' from the rootstock of *Citrus sunki* Hort ex Tan. Sprouts 2.5 to 3.0 cm long were incubated in water at the concentration of 0, 20, 40 and 60 mg/l of IBA during 12, 24, 48 and 96 hours using a completely randomized design with 4 replications. The number of surviving plants, rooted plants and root dry matter weight were evaluated. The data obtained showed a root index of 100% and an index of surviving plants of 94.92%. Based on the root dry matter weight obtained, it was concluded that in order to increase it, plants should be incubated in water for 60 hours.

## 7. LITERATURA CITADA

1. 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, Bergamon Press, 1984. p. 311-346.
2. CROCOMO, O.J.; SHARP, W.R. & MELO, M. (eds). *Biotechnologia para produção vegetal*. Piracicaba, CEBTEC/FEALQ, 1991. 539p.
3. 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. 501-516.
4. FIGUEIREDO, J.O. de; POMPEU JUNIOR, J.; RODRIGUEZ, O.; CAETANO, A.A.; 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. 442-463.
5. GOUSSARD, P.G. & WIID, J. A revised approach to the acclimatation of grapevine plantlets cultured "in vitro". *Deciduous Fruit Grower*, 39(1):29-31, 1989.
6. 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*, 45(6):416-421, 1961.
7. GRATTAPLAGIA, D. & 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.
8. HUSSEY, G. In vitro propagation. In: INGRAM, D.S.(ed.). *Tissue culture methods for plant pathologists*. Oxford, Blackwell Scientif Publications, 1980. p. 53-60.
9. JAMES, D.J. & THURDON, I.J. Rapid "in vitro" rooting of apple rootstock M-9. *Journal of Horticultural Science*, 54:309-311, 1979.
10. 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*, 56:15-20, 1981.
11. KITTO, S.L. & YOUNG, M.J. "In vitro" propagation of "Carrizo citrange". *HortScience*, 16:305-306, 1981.
12. MELLO, A.C.G. de. *Efeito de recipientes e substratos no comportamento silvicultural de plantas de Eucaliptus grandis Hill ex Maiden e de E. urophylla S.T. Blake*. Piracicaba, ESALQ, 1989. 80p. (Dissertação - Mestrado).

13. OCHAT, S.J. & CASO, O. M. In vitro meristem of M-4 apple (*Malus pumila* Mill). I. optimal nutrient medium. *Plant Cell Organ Culture*, 2:39-48. 1983.
14. POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxerto para citros. In: FUNDAÇÃO CARGILL (ed). *Citricultura brasileira*. Campinas, 1980., p. 279-296.
15. POMPEU JUNIOR, J. Copas e porta-enxertos. In: SIMPÓSIO DE CITRICULTURA, 3, Jaboticabal, 1988. *Anais...* Jaboticabal, FCAV-FUNEP, 1988. p. 155-161.
16. RODRIGUEZ, O. Produtividade de citros no Brasil. In: SIMPÓSIO DE CITRICULTURA, 3, Jaboticabal, 1988. *Anais...* Jaboticabal, FCAV-FUNEP, 1988. p. 15-21.
17. SALIBE, A.A & 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.
18. SNIR, J. & EREZ, A. In vitro propagation of maling merton apple rootstocks. *HortScience*, 15:597-598, 1980.
19. VAZ, R. I. Cultura de tecidos: potencial e aplicação. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1, Brasília, 1985. *Anais...* Brasília, EMBRAPA, 1986. p. 9-10.
20. ZIMMERMAN, R.H. & FORDHAM, I. Simplified method for rooting apple cultivars in vitro. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 1710:34-38, 1985.