

ENRAIZAMENTO *in vitro* E ACLIMATIZAÇÃO DO PORTA-ENXERTO DE AMEIXEIRA ‘MR. S. 2/5’

In vitro ROOTING AND ACLIMATIZATION OF ‘MR. S. 2/5’ PLUM ROOTSTOCK

ELIZETE BEATRIZ RADMANN¹, CIBELE MERCHED GALLO², CRISTINA WEISERRITTERBUSCH³, VALMOR JOÃO BIANCHI⁴, JULIANA APARECIDA FERNANDO⁴, JOSÉ ANTONIO PETERS⁴

¹Prof. Adjunto, UNIPAMPA, Campus Itaquí, Rua Luiz Joaquim de Sá Britto, s/n, Bairro Promorar, Cep. 97650-000. E-mail: eradmnn@gmail.com

²Doutoranda do curso de Fisiologia Vegetal da UFLA. E-mail: cibele.gallo@hotmail.com

³Mestranda do curso de Fisiologia Vegetal da UFPel. E-mail: crisritterbusch@hotmail.com

⁴Prof. Adjunto, Dep. de Botânica, Instituto de Biologia, UFPel. E-mails: valmorjb@yahoo.com, japeters@hotmail.com, juli_fernando@yahoo.com.br

RESUMO:

O porta-enxerto ‘Mr. S 2/5’ é propagado comercialmente na Europa apresentando importantes características agronômicas, porém, por ser um híbrido pentaploide, não é produzido por meio de sementes, necessitando assim que a propagação seja feita via assexuada. Objetivou-se avaliar o efeito da concentração de AIB e do tempo de permanência de brotações no meio de cultura, sobre o enraizamento e a sobrevivência destas na fase de aclimatização. Brotações com 1,5 cm foram cultivadas em meio MS com metade da concentração dos sais, com diferentes concentrações de AIB (0,0; 0,8; 1,6; 3,2 e 6,4 mg L⁻¹). Após ter estabelecido a melhor concentração de AIB, conduziu-se o segundo experimento, no qual foi avaliado o tempo de permanência (5, 6, 8, 12 e 14 dias) dos explantes no meio MS com metade da concentração de sais, suplementado com 1,6 mg L⁻¹ de AIB. Brotações cultivadas em meio de cultura com 1,6 mg L⁻¹ de AIB por 12 dias, apresentaram porcentagem de enraizamento superior a 85%, e maior porcentagem de plantas sobreviventes na fase de aclimatização foi de 95%.

Termos para indexação: *Prunus cerasifera x Prunus spinosa*, raiz, sobrevivência, AIB.

ABSTRACT:

The plum rootstock ‘Mr. S 2/5’ is propagated commercially in Europe presenting important agronomic traits, however, as a hybrid pentaploid, it is not produced by seed, thus requiring that the propagation is mainly asexual. This work aimed to evaluate the effects of IBA concentration and the time shoots remain in the culture medium on rooting and their survival during the acclimatization stage. Firstly, shoots with 1.5 cm were cultivated in MS medium with half of salt concentration and different IBA concentration (0.0, 0.8, 1.6, 3.2 and 6.4 mg L⁻¹). After establishing the best IBA concentration, the second trial was carried out by evaluating the time (5, 6, 8, 12 and 14 days) the explants remained in MS medium with half of the salt concentration, supplemented with 1.6 mg L⁻¹ IBA. Shoots cultivated in a culture medium with 1.6 mg L⁻¹ IBA for 12 days presented rooting percentage higher than 85%, and the highest percentage of plants that survived during acclimation was 95%.

Index terms: *Prunus cerasifera x Prunus spinosa*, root, survival, IBA.

INTRODUÇÃO

O enraizamento e a aclimatização do material cultivado *in vitro* muitas vezes é um fator limitante no processo da micropropagação de plantas lenhosas (BASTOS et al., 2007; BORGES et al., 2012), principalmente em *Prunus* spp. (DUVAL et al. 2013). A indução e a formação de raízes adventícias são importantes para a posterior transferência das plantas às condições *ex vitro* para aumentar a sobrevivência das plantas nessa fase (KRISAN, et al., 2007).

Para promover a indução de raízes e melhorar o sistema radicular formado, geralmente os meios de cultura são acrescidos de auxina (LIU et al., 2013; SAINI et al., 2013). Neste processo as auxinas mais utilizadas são o ácido indolbutírico (AIB), o ácido naftaleno acético (ANA) e o ácido 3-indolacético (AIA) (SANTOS-SEREJO et al., 2006). Dentre elas, o AIB tem sido eficiente na indução de raízes adventícias em uma grande variedade de espécies frutíferas (RADMANN et al., 2003; ROGALSKI et al., 2003a; COSTA et al., 2008; SCHMILDT et al., 2010), porém uma concentração excessiva no meio de cultura pode ser tóxica, favorecendo a formação de calos na base das brotações, comprometendo a rizogênese, o crescimento da parte aérea, como também a sobrevivência das plantas na fase de aclimatização (RADMANN et al., 2002).

(Recebido em 5 de setembro de 2014 e aprovado em 1 de novembro de 2014)

No Brasil, alguns trabalhos realizados com o gênero *Prunus* demonstraram que a adição do AIB no meio de enraizamento tem sido eficiente para promover acréscimo na porcentagem de enraizamento (COUTO et al., 2003; ROGALSKI et al., 2003a; VIAGANÓ et al., 2007), bem como o número de plantas sobreviventes após a transferência para as condições *ex vitro* (ROGALSKI et al., 2003b), porém, segundo estes autores a concentração ótima de AIB varia com a cultivar.

Além da concentração de auxina adicionada ao meio de enraizamento, o tempo de exposição dos explantes no meio de cultura também pode ser decisivo para o desenvolvimento do sistema radicular (NEGASH et al., 2000). O aumento do tempo de permanência das brotações enraizadas em meio de cultivo pode torná-las menos funcionais, podendo levar ao envelhecimento das raízes, prejudicando a sobrevivência quando estas plantas são aclimatizadas (PEREIRA; FORTES, 2001). Além disso, raízes mais longas também podem prejudicar a aclimatização das brotações pelo enovelamento destas. Segundo Mercier (2004), a formação de raízes adventícias ocorre de uma a três semanas, e o processo pode ser dividido em três fases, ou seja, indução, iniciação e alongamento das raízes, sendo cada fase influenciada pela concentração de auxina e o tempo de exposição a este regulador de crescimento.

Considerando que no Brasil poucos foram os trabalhos conduzidos com porta-enxertos de *Prunus* visando estudar tais efeitos na fase de aclimatização, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da concentração de AIB e do tempo de permanência das brotações no meio de cultura, sobre o enraizamento e a aclimatização de plantas do porta-enxerto de 'Mr. S 2/5'. Este porta-enxerto foi selecionado na Itália e tem origem incerta, sendo um híbrido que possui características como resistência a asfixia radicular, ao calcárie e a *Agrobacterium tumefaciens*. Além disso, este porta-enxerto é propagado comercialmente na Europa apresentando importantes características agrônomicas como à indução de baixo vigor na cultivar

copa e produção precoce, rápido crescimento e raízes profundas, induzindo boa atividade vegetativa ainda nos primeiros anos após a implantação, porém por ser um híbrido pentaplóide, não é produzido por meio de sementes (LORETI et al., 1998), necessitando assim que a propagação seja feita via assexuada.

MATERIAL E MÉTODOS

As brotações do porta-enxerto 'Mr.S. 2/5' (*Prunus cerasifera* x *Prunus spinosa*) utilizadas para os experimentos de enraizamento foram inicialmente estabelecidas *in vitro* a partir de segmentos nodais em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) sem regulador de crescimento, e posteriormente multiplicadas em meio MS com 0,5 mg L⁻¹ de BAP e 0,01 mg L⁻¹ para a obtenção de material vegetal para a condução dos experimentos de enraizamento.

Experimento 1 - Efeito das concentrações do AIB

Com objetivo de identificar a melhor concentração de AIB no enraizamento *in vitro* e na aclimatização, brotações apicais com aproximadamente 1,5 cm, oriundos de multiplicações prévias, foram transferidos para meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), contendo mio-inositol (100 mg L⁻¹), sacarose (30 g L⁻¹), ágar (7 g L⁻¹), sem regulador de crescimento. Quinze dias após, estes explantes foram transferidos para meio de enraizamento, constituído pelo meio MS com metade da concentração de sais, mio-inositol (100 mg L⁻¹), sacarose (30 g L⁻¹), ágar (7 g L⁻¹) e AIB nas seguintes concentrações (0,0; 0,8; 1,6; 3,2 e 6,4 mg L⁻¹). Após a inoculação dos explantes, os frascos contendo os meios foram transferidos para sala de crescimento, com temperatura de 23°C ± 2°C, permanecendo por cinco dias no escuro e sete dias em fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo luminoso de 38 μmol m⁻²s⁻¹.

Ao final dos 12 dias de cultivo em meio de enraizamento, avaliaram-se, porcentagem de enraizamento, número e comprimento de raízes. Posteriormente, todas as brotações foram transferidas para bandejas plásticas com tampa com capacidade de

um litro, contendo vermiculita de granulometria média, sendo estas mantidas por 30 dias em casa de vegetação com temperatura de 28°C e umidade relativa de 80%. Após trinta dias de aclimatização, foram avaliados o comprimento da maior raiz, comprimento da parte aérea e porcentagem de sobrevivência.

O experimento foi conduzido em delineamento completamente casualizado, com cinco tratamentos (0,0; 0,8; 1,6; 3,2 e 6,4 mg L⁻¹ de AIB) e seis quatro repetições contendo cinco brotações cada. Os dados obtidos durante o cultivo *in vitro* foram analisados por regressão polinomial, utilizando o programa WinStat 2.0 (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2003), e os dados da aclimatização analisados de forma descritiva.

Experimento 2 - Influência do tempo de cultivo no meio de enraizamento

Visando identificar o melhor tempo de cultivo *in vitro* em meio de enraizamento, na rizogênese e na aclimatização do porta-enxerto Mr. S. 2/5, brotações apicais com aproximadamente 1,5 cm, cultivadas nas mesmas condições do experimento anterior foram inoculadas no meio MS com metade da concentração de sais, suplementado com AIB (1,6mg L⁻¹), mio-inositol (100 mg L⁻¹), sacarose (30 g L⁻¹) e ágar (7 g L⁻¹). Após a inoculação, as brotações foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura de 23±2°C, por diferentes tempos em fotoperíodo de 16 horas: [tratamento 1: 5 dias no escuro (5 dias); tratamento 2: 5 dias de escuro + 1 dia com fotoperíodo (6 dias); tratamento 3: 5 dias de escuro + 3 dias com fotoperíodo (8 dias); tratamento 4: 5 dias de escuro + 7 dias com fotoperíodo (12 dias); tratamento 5: 5 dias de escuro + 9 dias com fotoperíodo (14 dias)].

Ao final de cada período de cultivo em meio de enraizamento foram avaliados a porcentagem de enraizamento, a porcentagem de indução de primórdios radiculares, número de raiz por brotação e comprimento de raiz, sendo a indução de primórdios radiculares caracterizada pela formação de protuberâncias esbranquiçadas na base dos explantes. Adicionalmente,

foram realizados cortes anatômicos da base das brotações com objetivo de avaliar o desenvolvimento do sistema radicular.

Para as análises anatômicas, as brotações foram coletadas, fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965, modificado com a utilização de tampão fosfato pH 7,2), desidratadas em série etílica ascendente e infiltradas em resina plástica (Leica Historesin®). As amostras foram seccionadas em micrótomo rotativo manual (ANCAP) com navalha descartável (Feather). As secções com 5 µm de espessura foram coradas com azul de toluidina 0,05% (SAKAI, 1973) em tampão fosfato e citrato (McILVAINE, 1921) pH 4,5 e montadas em resina sintética "Entellan" (Merck®).

O experimento foi conduzido da mesma forma que o anterior. Os dados obtidos durante o cultivo *in vitro* foram analisados por regressão polinomial, utilizando o programa WinStat 2.0 (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O enraizamento foi afetado significativamente pelas concentrações de AIB. Quando não se utilizou AIB não houve formação de raízes (Gráfico 1), indicando a necessidade deste regulador para a formação do sistema radicular.

Estes resultados corroboram com os obtidos por outros autores, que apontam a necessidade da utilização de auxina no meio de cultura para induzir a formação e a iniciação de raízes adventícias em porta-enxertos de *Prunus* (COUTO et al., 2003; FOTOPOULOS; SOTIROPOULOS, 2005; VIAGANÓ et al., 2005; MANSSERI-LAMRIOUI et al., 2011), estes autores observaram a não formação de raízes ou porcentagem de enraizamento muito baixa, aproximadamente 5%, em meio de cultura sem AIB. Entretanto, é necessário ajustar a melhor concentração de auxina para obtenção de um sistema radicular funcional e uniforme para que se alcance elevada porcentagem de sobrevivência na fase de aclimatização (SANTOS-SEREJO et al., 2006; COSTA et al., 2008; SCHMILDT et al., 2010).

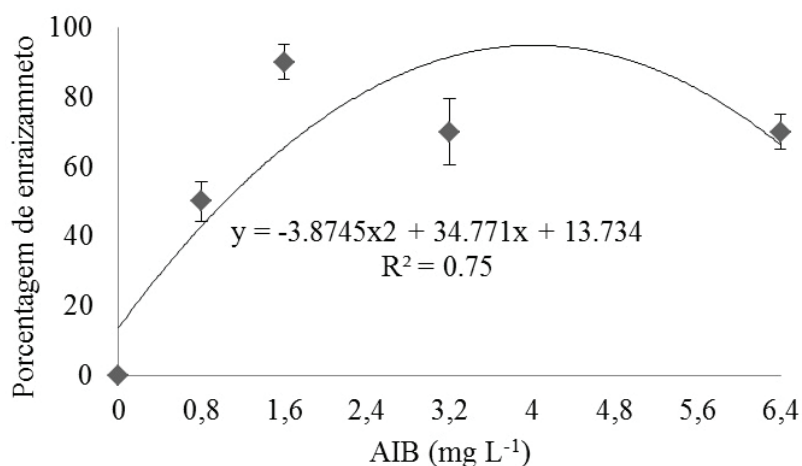


GRÁFICO 1 – Porcentagem de enraizamento obtido com o porta-enxerto ‘Mr. S. 2/5’, cultivado por 12 dias em meio de enraizamento com diferentes concentrações de AIB. As barras no gráfico indicam o erro padrão.

Para a porcentagem de enraizamento, embora se obteve uma resposta quadrática, com o ponto de máxima estimado na concentração de 4,48 mg L⁻¹ de AIB (91,46%), verificou-se um percentual absoluto de enraizamento similar a este, na concentração de 1,6 mg L⁻¹ de AIB (95%) (Gráfico 1). Apesar de não ter sido observado desenvolvimento de raízes em todas as brotações, para aquelas que não apresentaram raízes visíveis, pôde-se verificar a indução de primórdios radiculares em todos os tratamentos contendo auxina, sendo estes caracterizados como protuberâncias esbranquiçadas na base das brotações. Além disso, nas concentrações mais altas (3,2 e 6,4 mg L⁻¹ de AIB) houve a formação de calo na base do explante. Segundo Pedrotti; Voltolini (2001) quando a concentração de auxina no meio é excessiva, esta pode ser tóxica, induzindo a formação de calo e comprometendo a formação de raízes. Este fato pode explicar a menor porcentagem de enraizamento obtidas nas concentrações mais altas em comparação a 0,8 mg L⁻¹ de AIB.

Quanto ao número de raízes, a resposta quadrática inferiu ponto de máxima em 3,8mg L⁻¹ de AIB, ou seja, aproximadamente de 7,5 raízes por brotação (Gráfico 2).

Já, raízes formadas a partir 3,2 mg L⁻¹ de AIB, conforme relatado anteriormente apresentaram a formação de calo na base dos explantes e raízes fibrosas, sendo

estas características não apropriadas para a fase de aclimatização (RADMANN et al., 2002). Portanto, entre as concentrações testadas, 1,6 mg L⁻¹ de AIB apresentou as melhores respostas, pois além da formação de raízes sem presença de calo, o número de raízes formadas nesta concentração é apenas 0,5 raízes menor que nos explantes cultivados com 3,2 mg L⁻¹ de AIB. Estes resultados estão condizentes com o efeito das auxinas durante a rizogênese, visto que, estas aumentam o enraizamento e melhoram a qualidade do sistema radicular para aquelas espécies que apresentam dificuldade durante este processo até uma determinada concentração.

O maior comprimento de raiz foi encontrado em brotações provenientes do meio contendo 0,8 mg L⁻¹ de AIB, 0,75 cm (Gráfico 3).

O maior comprimento de raiz observado na menor concentração de AIB testada pode ser explicado pela influência da auxina na indução e no crescimento das raízes, pois a presença da auxina é necessária para a fase de indução, conforme se aumenta a concentração, diminui o comprimento das raízes, ou seja, segundo Mercier (2004) a concentração de auxina durante o enraizamento é diferente de acordo com a etapa organogenética, sendo esta necessária na fase de indução radicular, porém, a concentração inicialmente favorável a indução pode reduzir ou inibir o crescimento da mesma.

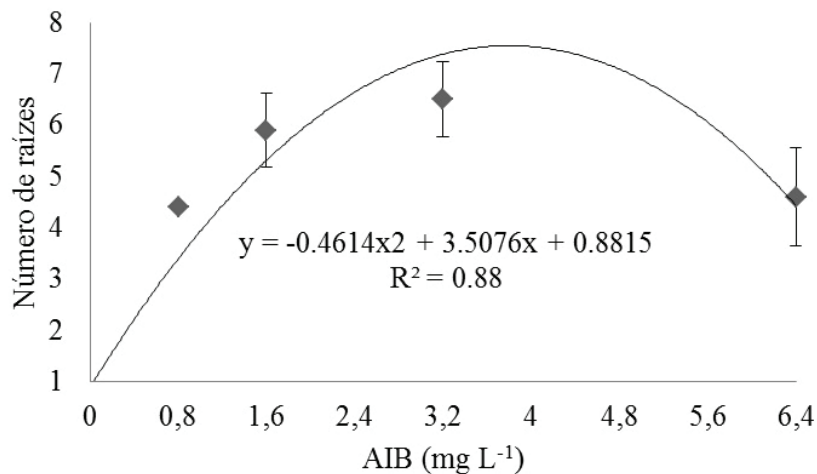


GRÁFICO 2 – Número de raízes obtido por brotação com o porta-enxerto ‘Mr. S. 2/5’, cultivado por 12 dias em meio de enraizamento com diferentes concentrações de AIB. As barras no gráfico indicam o erro padrão.

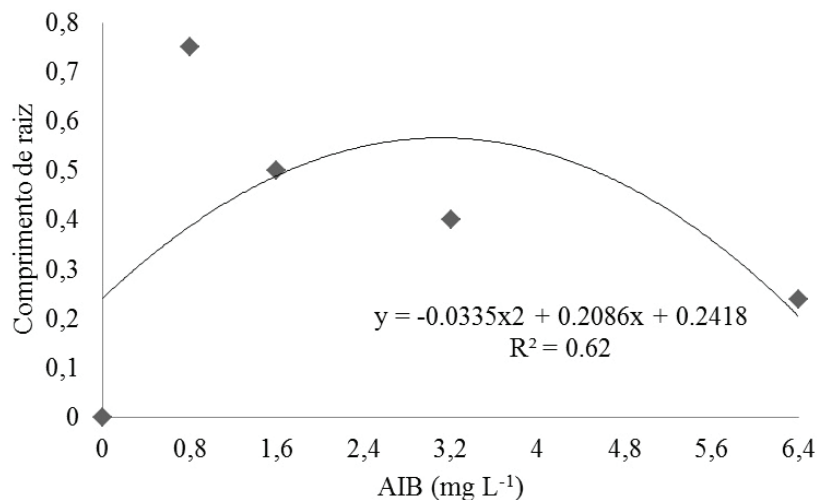


GRÁFICO 3 – Comprimento de raiz obtido com o porta-enxerto ‘Mr. S. 2/5’, cultivado por 12 dias em meio de enraizamento com diferentes concentrações de AIB. As barras no gráfico indicam o erro padrão.

Quando se compara as concentrações de AIB durante o período de aclimatização pode-se observar, que brotações cultivadas em meio de enraizamento com 1,6 mg L⁻¹ de AIB, apresentaram maior porcentagem de aclimatização (95%) (Tabela 1) e maior comprimento de parte aérea (média de 6,7 cm) (Gráfico 4), porém, o comprimento da maior raiz foi observado nas plantas oriundas de meio contendo 0,8 mg L⁻¹ de AIB, média de 11 cm, ou seja acompanhando o resultado obtido *in vitro* (Gráfico 4).

Estes resultados mostram a dependência da indução do enraizamento *in vitro* na fase de aclimatização do porta-enxerto ‘Mr. S. 2/5’, pois brotações oriundas de meio sem AIB não sobreviveram após o transplante para as condições *ex vitro*. Segundo Campana et al. (1994), Rogalski et al. (2003b) e Bandeira et al. (2012) a adição de auxina no meio de enraizamento tem sido eficiente, promovendo acréscimo na sobrevivência de cultivares de *Prunus* na fase

de aclimatização. No entanto, estes autores também verificaram que concentrações excessivas favorecem a formação de raízes fibrosas e de calo, prejudicando a sobrevivência das plantas nesta fase. De acordo com Santos-Serejo (2006), a formação de raízes fibrosas podem interferir na funcionalidade do sistema radicular, comprometendo assim a aclimatização das plantas, justificando desta forma a redução na porcentagem de sobrevivência, conforme observado naquelas brotações cultivadas em meio com 3,2 e 6,4 mg L⁻¹.

Portanto, a maior sobrevivência de plantas e o maior crescimento da parte aérea observada naquelas provenientes do meio com 1,6 mg L⁻¹, possivelmente esta associado a maior porcentagem de explantes enraizados e ao tipo de raiz formada. No entanto, a concentração ótima pode variar de acordo com a cultivar, resultados estes confirmados por Rogalskiet al. (2003b), os quais obtiveram maior sobrevivência com os porta-enxertos de *Prunus* ‘Capdeboscq’ (92%) e ‘VP411’ (84%), quando estes foram cultivados em

meio de enraizamento com 1,0 mg L⁻¹ e 0,1 mg L⁻¹ de AIB, respectivamente.

Já, o maior comprimento da raiz observado para aquelas plantas provenientes de meio com a menor concentração de AIB (0,8 mg L⁻¹) possivelmente esta associado ao maior comprimento já observado durante o cultivo *in vitro*.

Com relação ao desenvolvimento do sistema radicular *in vitro*, aos seis dias de cultivo houve o início na formação de raízes, com 30% das brotações com raízes visíveis e 25% com indução de primórdios radiculares (Tabela 2). As maiores respostas para a porcentagem de enraizamento foram observadas com 12 e 14 dias de cultivo *in vitro*, com 95 e 90% de brotações enraizadas, respectivamente, diferindo significativamente dos demais tratamentos. Embora não tenha ocorrido desenvolvimento de raízes visíveis em todas as brotações cultivadas em meio de enraizamento até 12 e 14 dias de cultivo, pode-se observar a indução de primórdios radiculares nas demais brotações destes tratamentos (Tabela 2).

TABELA 1 – Porcentagem de sobrevivência de plantas do porta-enxerto ‘Mr. S. 2/5’, após 30 dias de aclimatização, provenientes de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de AIB.

AIB (mg L ⁻¹)	0	0,8	1,6	3,2	6,4
Porcentagem de sobrevivência	0	40	95	10	20

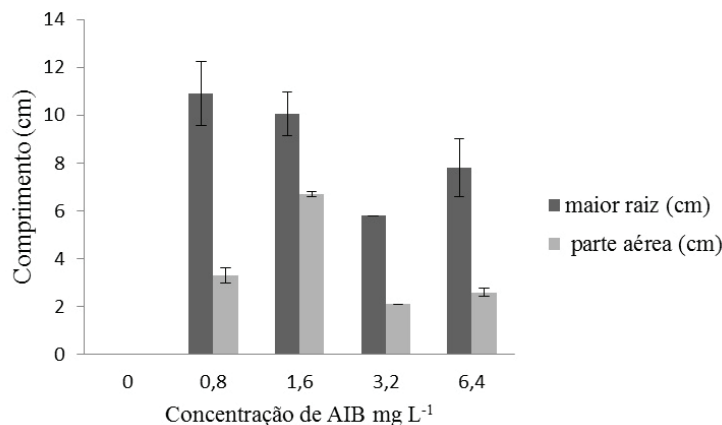


GRÁFICO 4 – Comprimento da maior raiz e da parte aérea de plantas do porta-enxerto ‘Mr. S. 2/5’, após 30 dias de aclimatização, provenientes de cultivo *in vitro* com diferentes concentrações de AIB. As barras no gráfico indicam o erro padrão.

TABELA 2 – Porcentagem de protuberâncias esbranquiçadas, porcentagem de enraizamento, número de raízes por explante e comprimento de raiz, obtido com o porta-enxerto ‘Mr. S. 2/5’, cultivado por diferentes períodos em meio de enraizamento com 1,6 mg L⁻¹ de AIB.

Cultivo <i>in vitro</i> (dias)	Visualização de protuberâncias esbranquiçadas (%)	Porcentagem de enraizamento	Número de raízes por explante	Comprimento de raiz (cm)
14	0 b	95 a	11.25 a	0.85 a
12	10 b	90 a	7.50 a b	0.67 a
8	30 a	60 b	3.25 b c	0.35 b
6	25 b	30 c	2.50 c	0.10 c
5	20 b	0 c	0.00 c	0.00 c

*Médias seguidas por letras distintas na coluna, diferem entre si (Tukey $p \leq 0,05$).

Com relação ao número e comprimento das raízes formadas, as respostas foram semelhantes às obtidas com a porcentagem de explantes enraizados, ou seja, explantes cultivados por mais tempo (12 e 14 dias) apresentaram os melhores resultados, com 7,5 e 11,25 raízes por explante, e 0,67 cm e 0,85 cm, de comprimento, respectivamente (Tabela 2).

Os resultados obtidos no presente trabalho comprovam a influência do tempo de exposição das brotações em meio de enraizamento no desenvolvimento da rizogênese *in vitro*. De acordo com Mercier (2004), a formação de raízes adventícias ocorre de uma a três semanas, e pode ser dividida em indução, iniciação e alongamento das raízes, sendo que as duas primeiras etapas dependem de auxina no meio de cultura, enquanto que o alongamento pode ser inibido nestas condições *in vitro*. Porém, no presente trabalho 14 dias de cultivo *in vitro* não foram suficientes a ponto de inibir o alongamento das raízes, visto que brotações cultivadas em meio durante este período formaram raízes de maior comprimento.

Durante o período de aclimatização, verificou-se que brotações cultivadas por 12 dias no meio de enraizamento apresentaram maior porcentagem de sobrevivência (95%). Entretanto, brotações cultivadas no meio de enraizamento por cinco dias não sobreviveram, e brotações cultivadas em meio por 6, 8 e 14 dias, apresentaram 45, 60 e 40% de sobrevivência, respectivamente.

Cabe evidenciar que a origem das raízes adventícias é endógena direta, ocorrendo a partir de divisões das

células cambiais e do parênquima do floema, sendo possível identificar o início de formação dos primórdios radiculares no sexto dia de cultivo *in vitro* (Figura 1A). No 12º dia observou-se o desenvolvimento do primórdio e o estabelecimento de conexão vascular com o explante (Figura 1B). Esta origem endógena das raízes adventícias e a conexão vascular adequada pode indicar o sucesso na aclimatização do porta-enxerto ‘MR. S. 2/5’, como observado para *Gomphrenama crocephal*, micropropagada na presença de AIB (MOREIRA et al., 2000).

A baixa sobrevivência das plantas cultivadas por períodos inferiores a 12 dias, pode ser atribuída à baixa quantidade de reserva para o crescimento *ex vitro* (COSTA et al., 2008). A avaliação de enraizamento sob diferentes concentrações de AIB em *Calliandra brevipes* mostrou o armazenamento degrânulos de amido na medula, fator considerado essencial para a formação de raízes adventícias (MAYER et al., 2008). Importante considerar que não se observou a presença deste carboidrato no parênquima medular dos explantes de ‘MR. S. 2/5’ e que, possivelmente, a conexão vascular entre raiz adventícia e explante ainda não era adequada nos períodos inferiores a 12 dias de cultivo *in vitro* ocasionando baixo índice de sobrevivência. Também é importante salientar que o sistema radicular pouco funcional, seja por baixo tempo de indução ou excesso de exposição ao regulador de crescimento, provoque uma baixa taxa de absorção de água e resultem na morte da planta.

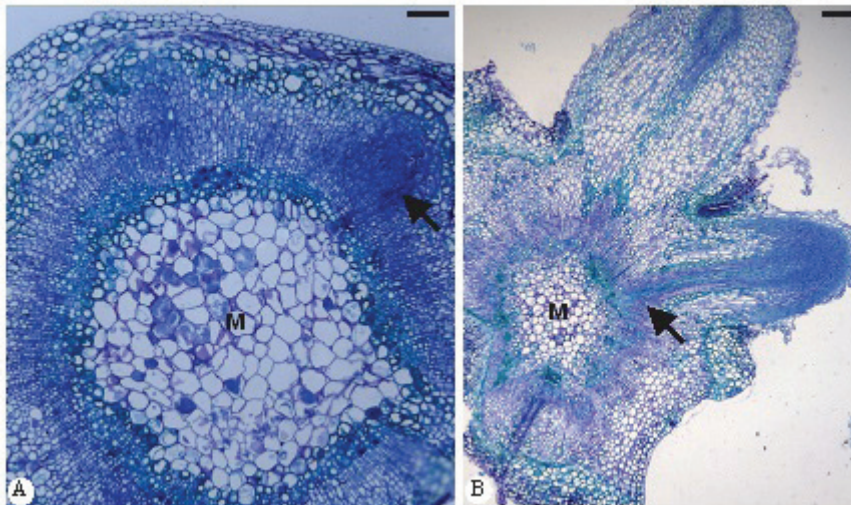


FIGURA 1 – Seção transversal do porta-enxerto ‘Mr.S.2/5’ evidenciando o início de formação do primórdio de raiz (A, seta) (A) e a conexão vascular entre raiz adventícia e o explante (B), aos 6 e 12 dias de cultivo *in vitro*, respectivamente. M = medula; Barras: A = 100 μm ; B = 200 μm .

Por outro lado, a baixa sobrevivência observada no material cultivado com 14 dias pode ser devido presença de raízes fibrosas e quebradiças, características não apropriadas para a fase de aclimatização (Figura 2).

Estes resultados corroboram com Santos-Serejo (2006), os quais suportam a hipótese de que a redução do cultivo em meio de enraizamento pode aumentar e melhorar a aclimatização de plantas na casa de vegetação. Estes autores relataram que a maior sobrevivência com a redução do período de cultivo *in vitro* esta associada a formação de raízes mais curtas, sendo estas mais adequadas para o transplante, pois além de facilitar o manuseio no momento do transplante, normalmente as raízes estão numa fase de crescimento ativo, o que facilita o pegamento e o posterior desenvolvimento *ex vitro* das plantas. Resultados positivos quanto a redução do período de permanência em meio de enraizamento foram também evidenciados por Pereira e Fortes (2001), os quais verificaram que o transplante das brotações de macieira mantidas por 12 dias *in vitro* possibilitou sobrevivência média superior a 90%.

Após o período de aclimatização, o comprimento da maior raiz foi observado para as brotações que foram mantidas por 6 dias no cultivo *in vitro*, com 10,8 cm,

enquanto que o maior comprimento da parte aérea foi observado em plantas cultivadas *in vitro* por 12 dias, com 6,7 cm (Gráfico 5).

O maior comprimento das raízes observado em plantas provenientes de cultivo *in vitro* por seis dias, deve-se possivelmente, por estas serem mais curtas, favorecendo o seu crescimento no substrato. Além disso, estas plantas por apresentarem o menor número de raízes formadas durante o cultivo *in vitro*, apresentaram menor competição entre elas, portanto beneficiando o seu crescimento. O maior comprimento da parte aérea das plantas provenientes de 12 dias de cultivo *in vitro*, provavelmente esta associado ao número de raízes formadas e ao tipo de sistema radicular, possibilitando desta forma uma maior absorção de água e de nutrientes pelas raízes, favorecendo o crescimento da parte aérea.

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, verificou-se que a presença da auxina no meio de cultura para o enraizamento do porta-enxerto ‘Mr. S. 2/5’ é fundamental para estabelecer um protocolo de indução do sistema radicular, visando otimizar o tempo de enraizamento *in vitro*, porém sem haver perdas significativas de plantas na fase de aclimatização.

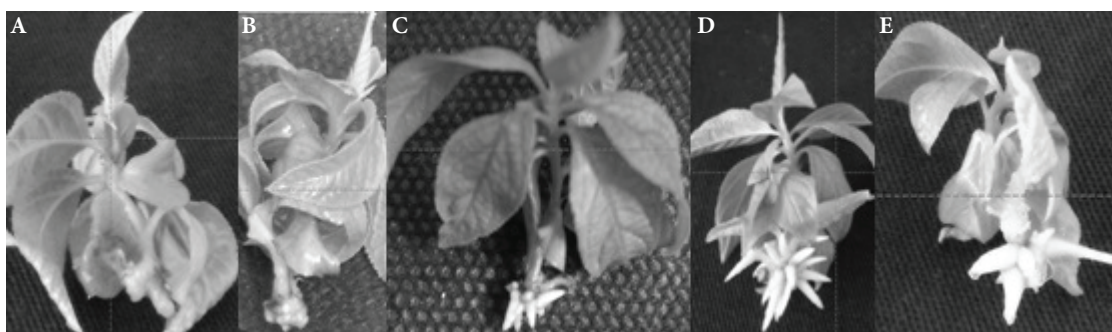


FIGURA 2 – Brotações enraizadas do porta-enxerto ‘Mr. S. 2/5’ provenientes de diferentes períodos de cultivo *in vitro*, (A) 5 dias, (B) 6 dias, (C) 8 dias, (D) 12 dias e (E) 14 dias.

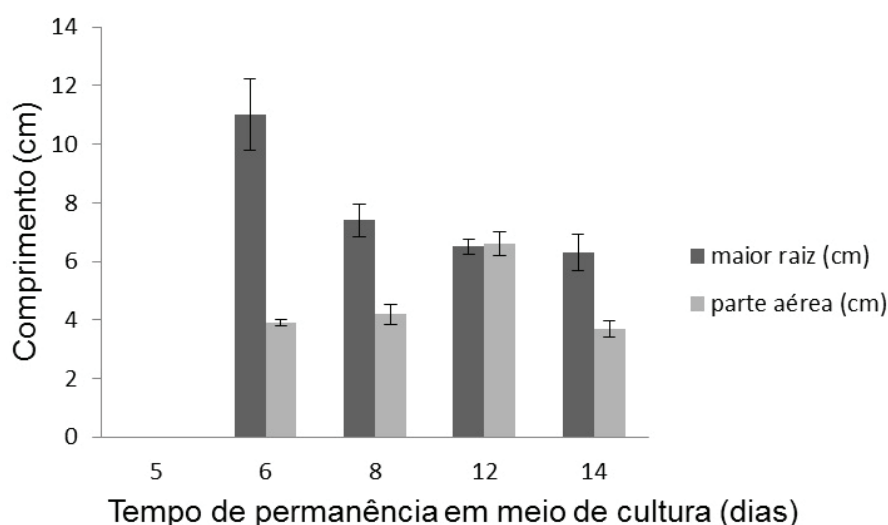


GRÁFICO 5 – Comprimento da parte aérea e da maior raiz do porta-enxerto ‘Mr. S. 2/5’, obtidos a partir de plantas que sobreviveram após 30 dias de aclimatização, provenientes de diferentes períodos de cultivo *in vitro*. As barras no gráfico indicam o erro padrão.

CONCLUSÃO

De acordo com as condições em que foram conduzidos os experimentos, pode-se concluir que, o período de cultivo *in vitro* por 12 dias contendo 1,6 mg L⁻¹ de AIB é recomendado para o enraizamento e aclimatização do porta-enxerto ‘Mr.S 2/5’.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANDEIRA, J. de M. et al. Rooting and acclimatization of the Japanese plum tree, cv. América. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.34, n.2, p.597-603, 2012.

BASTOS, L. P. et al. Cultivo *in vitro* de Mangabeira (*Hancorniaspeciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 1122-1124, 2007. Suplemento.

BORGES, S.R. et al. Estabelecimento *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 3, p. 605-616, set., 2012.

CAMPANA, B.M. et al. Enraizamento *in vitro* del porta injerto Damas GF 1869 (*Prunus insititia x Prunus spinosa*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.16, n.3, p.85-94, 1994.

- COSTA, F.H.S. et al. Relação entre o tempo de enraizamento *in vitro* e o crescimento de plantas de bananeira na aclimatização. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, n.1, p.31-37, 2008.
- COUTO, M. A.; WAGNER JÚNIOR, A; QUEZADA. A.C. Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* sp. 'Barrier' em diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) e do meio Murashige & Skoog (MS). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.9, n.4, p. 367-370, 2003.
- DUVAL, H. et al. High-resolution mapping of the RMia gene for resistance to root-knot nematodes in peach. **Tree Genetics & Genomes**, Davis, 2013.
- FOTOPOULOS, S.; SOTIROPOULOS, T.E. *In vitro* rooting of PR 204/84 rootstock (*Prunus persicax* P. *amygdalus*) as influenced by mineral concentration of the culture medium and to darkness for a period. **Agronomy Research**, Estonia, v.3, n.1, p.3-8, 2005.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v.27, p.137-138, 1965.
- KRISAN, B. et al. Effects of paclobutrazol and indole-3-butyric acid on *in vitro* rooting and growth of some rootstocks of the genus *Prunus* L. **European Journal of Horticultural Science**. Stuttgart, v.72, n.5, p.198-201, 2007.
- LORETTI, F.; MASSAI, R.: Il contributo dell'Università di Pisa al miglioramento genético dei portinnesti. **Rivista di Fruticultura**, Pisa, Itália, n.4, p.9-13, 1998
- MACHADO, A.A.; CONCEIÇÃO, A.R. **WinStat - sistema de análise estatística para Windows**. Versão Beta. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2003.
- MASSERI-LAMRIOUI, A. et al. Proliferation and rooting of wild cherry: The influence of cytokinin and auxin types and their concentration. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 10, n.43, p. 8613-8624, 2011.
- MAYER, J.L.S. et al. Formação de raízes em estacas de duas species de *Calliandra* (Leguminosae - Mimosoideae). **Rodriguésia**, Rio de Janeiro v. 59, n.3, p. 487-495, 2008.
- McILVAINE, T.C. A buffer solution for colorimetric comparison. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.49, n.1, p.183-186, 1921.
- MERCIER, H. Auxinas. In: KERBAUY, G.B. (ed.). **Fisiologia vegetal**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 217-249, 2004.
- MOREIRA, M.F., APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; ZAIDAN, L.B.P. Anatomical aspects of IBA-treated microcuttings of *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.4, n.2, p.221-227, 2000.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biomass with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3, p. 473-479. 1962.
- NEGASH, A. et al. *In vitro* regeneration and micropropagation of enset from Southeastern Ethiopia. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.62, p.153-158, 2000.
- PEDROTTI, E.L., VOLTOLINI, J.A. Enraizamento *ex vitro* e aclimação do porta-enxerto de macieira M.9. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.2, p. 234-239, 2001.
- PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. de L. Multiplicação e aclimatização da macieira influenciada pelo tipo de explante e pelo tempo de permanência em meio de cultura de enraizamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.2, p. 417-420, 2001.
- RADMANN, E. B.; FACHINELLO, J. C.; PETERS, J.A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira 'M-9'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.3, p.624-628, 2002.
- RADMANN, E.B.; GONÇALVES, E.D.; FORTES, G.R. de L. Concentrações de ácido indolbutírico e períodos de escuro no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta (*Rubus* spp.), cv. Ébano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.1, p.124-126, 2003.
- ROGALSKI, M. et al. Enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* sp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p.293-296, 2003a.

- ROGALSKI, M. et al. Aclimatização de porta-enxertos de *Prunus* sp. micropropagados. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p.279-281, 2003b.
- SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, Baltimore, v.48, n.5, p. 247-249, 1973.
- SANTOS-SEREJO, J.A. et al. Meios nutritivos para micropropagação de plantas. In: SOUZA, A.S.; JUNGHANS, T.G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p. 80-98.
- SCHMILDT, E.R. et al. Níveis de ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento *in vitro* de microestacas de mamoeiro ‘Tainung 01’. **Acta Scientiarum. Agronomy**. Maringá, v.32, n.1, p.125-129, 2010.
- VIAGANÓ, C.R. et al. Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de *Prunus* cv. Mr. S. 1/8: concentrações de IBA em meio de cultura acrescido de ágar ou vermiculita. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.23, n.3, p.60-65, 2007.