



**ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO DE
MUDAS MICROPROPAGADAS DOS
PORTA-ENXERTOS DE MACIEIRA
'MARUBAKAIDO' E 'M-26'**

ALEXANDRE HOFFMANN

1999

ALEXANDRE HOFFMANN

**ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS
MICROPROPAGADAS DOS PORTA-ENXERTOS DE MACIEIRA
'MARUBAKAIDO' E 'M-26'**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Curso de Pós-
Graduação em Agronomia, área de concentração em
Fitotecnia, para obtenção do título de "Doutor".

Orientador

Prof. Nilton Nagib Jorge Chalfun

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

1999

**Ficha Catalográfica preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Hoffmann, Alexandre

Enraizamento e aclimatização de mudas micropropagadas dos porta-
enxertos de macieira 'Marubakaido' e 'M-26' / Alexandre Hoffmann. --
Lavras : UFLA, 1999.

240p. : il.

Orientador: Nilton Nagib Jorge Chalfun.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Propagação vegetativa. 2. Propagação de planta. 3. Cultura de
tecido. 4. Biotecnologia. 5. Enraizamento. 6. Aclimatização. 7. Maçã. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 634.113

– 631.541

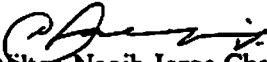
ALEXANDRE HOFFMANN

**ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS
MICROPROPAGADAS DOS PORTA-ENXERTOS DE MACIEIRA
'MARUBAKAIDO' E 'M-26'**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação
em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para
obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 05 de maio de 1999.

Prof. Moacir Pasqual	UFLA
Prof. Ruben Delly Veiga	UFLA
Prof. José Carlos Fachinello	FAEM/UFPEL
Pesq. Murillo de Albuquerque Regina	EPAMIG


Prof. Nilton Nagib Jorge Chalfun
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL



“Se o Senhor não edificar a casa, em vão trabalham os que a edificam”

A Deus, criador e mantenedor de todas as formas de vida, que conduz os passos da ciência e dos cientistas para estudarem as maravilhas da Sua Criação.

À Simonen, esposa, amiga e companheira de todas as horas, ofereço.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de toda a inspiração e sabedoria.

A meus pais, de sangue e de coração, pelo carinho, incentivo e amizade.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de realização do Curso e pelas alternativas de atividades oferecidas no transcorrer do mesmo.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos.

À EMBRAPA - Uva e Vinho, pelo apoio para redação final desta tese.

Ao colega, amigo e professor Nilton Nagib Jorge Chalfun, pelo apoio, orientação, companheirismo e amizade.

Aos professores Moacir Pasqual, José Darlan Ramos, Ruben Delly Veiga e Márcio Ribeiro do Vale, pelo auxílio, orientação e amizade.

Aos demais professores do Curso, pelos ensinamentos, idéias e oportunidades.

Ao professor José Carlos Fachinello, pelo apoio e amizade.

Ao pesquisador e amigo Gerson Renan de Luces Fortes, pelo fornecimento do material básico de propagação.

Aos funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos e do Pomar Didático da UFLA, pelo apoio na realização dos experimentos.

Aos bolsistas Adriano Bortolotti da Silva, Sílvia Serra Negra Vieira e Chrystiane Borges Fráguas, pelo empenho, desprendimento e ajuda na realização dos experimentos.

A todos os colegas de Curso, em especial os amigos Luís Eduardo Corrêa Antunes, Antonio Chalfun Junior e Mauro Brasil Dias Tofanelli.

A todos aqueles que, de uma ou de outra forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1	
1 Introdução	1
2 Referencial teórico geral	3
3 Metodologia geral	16
4 Referências bibliográficas	20
CAPÍTULO 2: Substratos no enraizamento <i>in vitro</i> e aclimatização de mudas micropropagadas de porta-enxertos de macieira	
1 Resumo	27
2 Abstract	28
3 Introdução	28
4 Material e métodos	31
5 Resultados e discussão	36
6 Conclusões	61
7 Referências bibliográficas	62
CAPÍTULO 3: Sacarose na multiplicação, enraizamento <i>in vitro</i> e aclimatização de mudas micropropagadas do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido'	
1 Resumo	65
2 Abstract	66
3 Introdução	66
4 Material e métodos	69
5 Resultados e discussão	72

	Página
6 Conclusões	92
7 Referências bibliográficas	93
CAPÍTULO 4: Pré-aclimatização de mudas micropropagadas do porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido’	
1 Resumo	97
2 Abstract	98
3 Introdução	98
4 Material e métodos	101
5 Resultados e discussão	106
6 Conclusões	128
7 Referências bibliográficas	129
CAPÍTULO 5: Fatores que afetam o enraizamento <i>ex vitro</i> de brotações micropropagadas do porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido’	
1 Resumo	133
2 Abstract	134
3 Introdução	134
4 Material e métodos	137
5 Resultados e discussão	142
6 Conclusões	162
7 Referências bibliográficas	162
CAPÍTULO 6: Crescimento de mudas do porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido’ provenientes do enraizamento <i>in vitro</i> e “<i>ex vitro</i>”	
1 Resumo	167
2 Abstract	168
3 Introdução	168
4 Material e métodos	170
5 Resultados e discussão	174

	Página
6 Conclusões	195
7 Referências bibliográficas	195
ANEXOS	199

RESUMO

HOFFMANN, Alexandre. Enraizamento e aclimatização de mudas micropropagadas dos porta-enxertos de macieira 'Marubakaido' e 'M-26'. Lavras: UFLA, 1999. 240p. (Tese – Doutorado em Agronomia).

O presente trabalho teve como objetivo estudar alguns dos fatores envolvidos no enraizamento e na aclimatização de mudas dos porta-enxertos de macieira 'Marubakaido' e 'M-26', visando o aumento do rendimento na produção de mudas através da micropropagação. Foram realizados vários experimentos na Universidade Federal de Lavras (Lavras, MG), os quais foram agrupados em cinco capítulos, abordando o uso de diferentes substratos no enraizamento *in vitro* e na aclimatização, o efeito da sacarose no enraizamento e aclimatização, a avaliação de técnicas de pré-aclimatização, o estudo de fatores que afetam o enraizamento *ex vitro* e a avaliação do crescimento de mudas durante e após a aclimatização. O ágar como substrato de enraizamento *in vitro* (indução ou desenvolvimento de raízes) e o Plantmax como substrato para aclimatização proporcionaram os melhores resultados. A sacarose, em concentrações de 10-30 g.L⁻¹ no meio de enraizamento, favoreceu a formação de raízes *in vitro*, mas elevadas concentrações (45-60 g.L⁻¹) aumentaram a sobrevivência e o crescimento durante a aclimatização. O aumento da sobrevivência e do crescimento das mudas durante a aclimatização foi obtido mantendo-se as mudas a 5°C durante 4 ou mais dias e tratando-as com 28-33 mg.L⁻¹ de GA₃. Pôde-se obter em torno de 70% de brotações enraizadas *ex vitro* de 'Marubakaido' utilizando-se AIB a 36 mg.L⁻¹/16 horas ou 300 mg.L⁻¹/15 segundos em bandejas de espuma fenólica, bem como com 134,67 mg.L⁻¹/15 segundos em Plantmax. O pré-condicionamento das brotações em meio com 605 mg.L⁻¹ de cálcio favoreceu o enraizamento das brotações. O enraizamento *in vitro* em meio com 1,0 mg.L⁻¹ de AIB proporcionou melhores resultados no crescimento das mudas durante a aclimatização em relação ao tratamento por imersão rápida com 200 mg.L⁻¹ de AIB. O Plantmax favoreceu o crescimento da muda durante e após o enraizamento "ex vitro" e possibilitou o maior aprofundamento das raízes, em relação à espuma fenólica.

Comitê Orientador: Nilton Nagib Jorge Chalfim – UFLA, Lavras, MG (Orientador), Moacir Pasqual – UFLA, Lavras, MG e Ruben Delly Veiga – UFLA, Lavras, MG

ABSTRACT

HOFFMANN, Alexandre. Rooting and acclimatization of micropropagated 'Marubakaido' and 'M-26' apple rootstocks. Lavras: UFLA, 1999. 240p. (Thesis – Doctorate in Agronomy).

The objective of the present work was to study some factors involved in the rooting and in acclimatization of 'Marubakaido' and 'M-26' apple rootstocks in order to increase the efficiency of plantlets production through micropropagation. Several experiments were carried out at the Federal University of Lavras (Lavras, MG, Brazil), which were described in five chapters, emphasizing the use of different substrates and the effect of sucrose on *in vitro* rooting and acclimatization, the evaluation of pre-acclimatization techniques, the study of factors affecting *ex vitro* rooting and the evaluation of the plantlets growth during and after acclimatization. The use of agar as substrate for *in vitro* rooting (induction or development of adventitious roots) and Plantmax for acclimatization provided the best results. The use of sucrose with concentrations of 10-30 g.L⁻¹ in the rooting medium, induced *in vitro* adventitious root formation. At higher sucrose concentrations (45 - 60 g.L⁻¹) both survival and growth during acclimatization were increased. The increase of plantlet survival and growth during acclimatization was obtained maintaining them at 5°C during 4 or more days in the presence of 28-33 mg.L⁻¹ GA₃. Around 70% 'Marubakaido' rooted shoots can be obtained using 36 mg.L⁻¹ IBA/16 hours or 300 mg.L⁻¹/15 seconds in phenolic foam trays, as well as 134.67 mg.L⁻¹/15 seconds in Plantmax. Shoot pre-conditioning in medium containing 605 mg.L⁻¹ calcium favored shoot rooting. *In vitro* rooting in medium supplemented with 1.0 mg.L⁻¹ IBA provided better results for plantlets growth during acclimatization in comparison with the treatment of rapid immersion in 200 mg.L⁻¹ IBA. The use of Plantmax favored plantlet growth during and after *ex vitro* rooting and provided deeper roots when compared with the use of phenolic foam.

Guidance Committee: Nilton Nagib Jorge Chalfun – UFLA, Lavras, MG (Major Professor), Moacir Pasqual – UFLA, Lavras, MG and Ruben Delly Veiga – UFLA, Lavras, MG

1 INTRODUÇÃO

A cultura da macieira apresenta grande importância no cenário frutícola brasileiro. Nos últimos 25 anos, a produção brasileira evoluiu de forma a atender a quase toda a demanda interna de maçãs. Além disso, nos últimos 5 anos, o Brasil tornou-se exportador de parte da produção nacional. Atualmente, são produzidas no Brasil em torno de 700.000 t anuais, com tecnologia bastante avançada, graças ao esforço da pesquisa e à aceitação das novas técnicas pelos produtores.

Devido às condições climáticas, a pomicultura brasileira apresenta maior importância nos estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná, além de uma menor produção em São Paulo. Embora não seja uma região produtora expressiva, o Sul de Minas Gerais apresenta características edafoclimáticas favoráveis à adaptação de cultivares de macieira pouco exigentes em frio, as quais possibilitam uma produção mais precoce em relação ao Sul do Brasil. Por outro lado, a proximidade e a facilidade de acesso a grandes centros consumidores (Belo Horizonte, São Paulo e Rio de Janeiro) traduz-se em grande vantagem comparativa desta região.

Um dos requisitos para a elevada produtividade e longevidade dos pomares é o uso de mudas de alta qualidade. Para que estas mudas sejam produzidas dentro dos padrões exigidos por lei e possuam preços competitivos, é muito importante que ela seja otimizada, aumentando a capacidade de produção dos viveiros e reduzindo o custo unitário da muda. No método convencional, a macieira é propagada por enxertia de garfagem e o porta-enxerto, por mergulhia de cepa, a qual, embora seja uma técnica que proporciona elevados percentuais de enraizamento, acarreta baixo rendimento e intenso uso de mão de obra,

contribuindo para a elevação do custo da muda. A multiplicação através da cultura de tecidos, ou micropropagação, constitui-se, portanto, em um método que pode auxiliar na produção eficiente de mudas de macieira. A cultura de tecidos de macieira foi iniciada há mais de 30 anos e vem sendo utilizada com sucesso e com vários objetivos, desde a produção de mudas até o melhoramento genético.

Entretanto, o enraizamento das brotações e a aclimatização das mudas produzidas por micropropagação frequentemente consistem em etapas críticas e limitantes à aplicação comercial da micropropagação, diminuindo o rendimento da produção de mudas. O enraizamento das brotações oriundas do cultivo *in vitro* é afetado por diversos fatores de natureza interna e externa e requer o seu controle adequado para se obter elevados percentuais de brotações enraizadas, seja *in vitro* ou *ex vitro*. Já a aclimatização, etapa final da micropropagação e que consiste na transferência das plantas produzidas *in vitro* para as condições de casa de vegetação e, posteriormente, do pomar, é mencionada na literatura como a fase mais crítica em muitas espécies, pela perda de mudas que acarreta. As plantas produzidas *in vitro* apresentam características morfo-fisiológicas que dificultam a sobrevivência no ambiente externo ao laboratório.

Muitos estudos sobre a micropropagação da macieira já têm sido realizados, possibilitando a elaboração de protocolos para diversos genótipos. Porém, há algumas lacunas a serem estudadas nestes procedimentos, visando o aumento do enraizamento, da sobrevivência e do crescimento das mudas durante e após a aclimatização.

Dentre os diversos porta-enxertos utilizados para a macieira no Brasil, o porta-enxerto 'Marubakaido' é importante pela sua tolerância à podridão do colo, viabilizando o seu uso em replantios. Além deste, o porta-enxerto 'M-26', pelo

seu efeito ananizante sobre a copa, permite o plantio de pomares em alta densidade.

Este trabalho teve como objetivo geral estudar alguns dos fatores envolvidos no enraizamento e na aclimatização dos porta-enxertos de macieira 'Marubakaido' e 'M-26', visando o aumento do rendimento na produção de mudas através da micropropagação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO GERAL

2.1 Porta-enxertos para macieira

Há diversos porta-enxertos para a cultura da macieira, os quais permitem a adaptação das plantas a diferentes condições ambientais. Ferree e Carlson (1988) citam algumas destas condições, como: profundidade, compactação, temperatura, umidade, textura, sistema de manejo e fertilidade do solo, temperatura do ar e resistência a doenças e pragas. Os porta-enxertos de macieira mais usados mundialmente são plântulas ("seedlings") de cultivares comerciais como 'Delicious' ou de outras cultivares ('French Crab', 'Antonovka', 'Beautiful Arcade', entre outras). Porém, especialmente a partir do lançamento de porta-enxertos de origem clonal pela Estação de East Malling, na Inglaterra, estes genótipos multiplicados por via vegetativa tornaram-se de grande importância na pomicultura. Na maior parte dos pomares de macieira no Brasil, é utilizado como porta-enxerto o clone 'MM 106', embora outros genótipos apresentem importância significativa (Denardi, 1986). Este porta-enxerto, entretanto, apresenta limitações, como a sua pouca tolerância a podridões de raízes.

Mais recentemente, o porta-enxerto 'Marubakaido' (*Malus prunifolia*) surgiu como uma alternativa a essa limitação, pela sua tolerância à podridão do colo e excelente desempenho em replantios, por superar satisfatoriamente a "doença do replantio", complexo de doenças, pragas e efeitos alelopáticos que dificultam o estabelecimento das mudas em áreas previamente cultivadas com macieiras. Por essa razão, o uso deste porta-enxerto está se tornando cada vez mais difundido. Ele caracteriza-se por apresentar porte vigoroso, sistema radicular abundante, além de apresentar boa tolerância a solos pouco férteis e a períodos de estiagem, sendo indicado para plantios em baixa densidade (até 700 plantas/ha) ou para replantios (EPAGRI, 1992).

Na implantação de pomares em alta densidade (acima de 2000 plantas/ha), é necessário o uso de porta-enxertos de efeito ananizante da copa. Neste caso, um dos porta-enxertos indicados é o 'M-26'. Na América do Norte, este porta-enxerto é um dos mais utilizados (Ferree e Carlson, 1988). Segundo esses mesmos autores, o porta-enxerto 'M-26' pertence à série Malling e é resultante do cruzamento 'M-16' x 'M-9'. Tornou-se popular por conferir à copa características de precocidade, efeito ananizante (porte entre 40 a 50% inferior em relação ao pé-franco) e produtividade. Porém, apresenta incompatibilidade com algumas cultivares, é intolerante a condições extremamente úmidas do solo e somente deve ser usado com sistema de suporte (tutoramento) (EPAGRI, 1992).

2.2 Micropropagação de porta-enxertos de macieira

A propagação vegetativa é essencial para a manutenção dos caracteres agronômicos desejáveis do genótipo, especialmente em porta-enxertos de origem clonal. Comercialmente, a propagação de porta-enxertos de macieira é realizada através de mergulhia de cepa, sendo empregadas as brotações enraizadas para a

enxertia de garfagem. A mergulhia é um método de baixo rendimento que demanda tempo, mão-de-obra e considerável espaço físico, além das plantas ficarem expostas à contaminação por patógenos, reduzindo a qualidade final da muda e onerando o seu custo de produção (Yui, 1990). Por outro lado, avanços no plantio de pomares implicam na necessidade de produção de mudas em alta quantidade e baixo custo, o que requer o uso de métodos intensivos de propagação (Corrêa, 1990 e Yui, 1990).

Como outras espécies frutíferas, a macieira pode ser infectada por diversas doenças causadas por vírus. Segundo a EPAGRI (1992), a maioria das viroses é fatal para o porta-enxerto 'Marubakaido', recomendando que se trabalhe apenas com material propagativo livre de vírus.

A micropropagação, ou propagação vegetativa *in vitro*, pode ser útil tanto na produção de plantas matrizes (cepas) quanto na produção direta de porta-enxertos e de mudas das cultivares-copa sem enxertia. Esta técnica proporciona rápida multiplicação a partir de matrizes sadias, as quais são obtidas por cultura de meristemas e, portanto, são isentas de viroses (Corrêa, Pasqual e Yui, 1991). Plantas matrizes livres de vírus são fundamentais para a obtenção de mudas de boa qualidade. Através da cultura de meristemas, pode-se obter matrizes sadias, com garantia de estabilidade genética e com elevado rendimento durante o ano inteiro (Ribas e Zanette, 1992).

A micropropagação é eficiente na propagação de muitos genótipos de macieira e fornece material rejuvenescido e isento de contaminação (Fortes, 1992). Jones, Hopgood e O'Farrel (1977) descrevem métodos que possibilitam a produção de mais de 60.000 brotações do porta-enxerto 'M-26' em 8 meses a partir de uma brotação apical, sem serem encontradas mutações ou anormalidades nas plantas. Barbosa et al. (1986) estimam que, sob condições

ideais de meio de cultura, a partir de 100 explantes podem ser obtidas 500.000 plantas de macieira em 18 meses ou menos, com economia de espaço e de tempo.

Mesmo a macieira sendo uma das espécies lenhosas propagadas com sucesso através de técnicas de cultura *in vitro*, têm-se observado respostas diferenciadas em uma mesma cultivar e entre diferentes cultivares durante as diversas fases do cultivo (Ribas e Zanette, 1992). Conforme afirmam Peixoto et al. (1992), para a utilização eficiente da micropropagação na produção de mudas, devem ser proporcionadas as condições adequadas, desde a obtenção do explante até a aclimatização das mudas, através do uso de técnicas apropriadas para cada espécie e cultivar, devido a exigências peculiares das mesmas quanto aos fatores que afetam a regeneração *in vitro*.

2.3 Enraizamento de brotações obtidas por cultura de tecidos

A formação de raízes adventícias, ou enraizamento, é uma etapa essencial e muitas vezes limitante para a constituição da muda completa proveniente da cultura de tecidos (Haissig, Davis e Riemenschneider, 1992). O enraizamento pode ocorrer *in vitro* (dentro do frasco de cultura) ou *ex vitro* (após a retirada da brotação do frasco de cultura e simultânea à aclimatização). Conforme mencionam Dunstan e Turner (1984), há vantagens e desvantagens em ambos os casos. Quando o enraizamento ocorre *in vitro*, há maior sobrevivência e percentual de brotações enraizadas, especialmente em espécies de difícil enraizamento. Porém, implica em uma fase adicional de aclimatização após o enraizamento. Já o enraizamento *ex vitro* (ou *in vivo*) possibilita a ocorrência concomitante do enraizamento e da aclimatização, proporcionando a redução do tempo de produção da muda por micropropagação, aumentando a rusticidade e a qualidade da muda já durante o seu enraizamento e diminuindo o seu custo de

produção (Pierik,1998). Por outro lado, requer facilidade de enraizamento do material propagativo e ambiente favorável ao enraizamento/aclimatização.

Independente do método de enraizamento, *in vitro* ou *ex vitro*, os princípios morfo-fisiológicos relativos à indução, formação e alongamento de raízes adventícias, são os mesmos.

A formação de raízes adventícias é resultante da influência de fatores internos e externos. Entre os fatores internos mais importantes, estão o balanço hormonal, a condição fisiológica da matriz, a nutrição, entre outros. Os fatores externos mais importantes são a temperatura, umidade, substrato, pré-condicionamento e aplicação de reguladores de crescimento. Há a necessidade de definir, para cada genótipo e forma de propagação, as condições mais adequadas de modo a maximizar o enraizamento.

Segundo Hu e Wang (1983) e Grattapaglia e Machado (1998), a rizogênese pode ser dividida em três fases distintas: indução, iniciação e alongamento. As duas primeiras fases são dependentes da auxina e a terceira, inibida pela presença da mesma. Harbage, Stimart e Evert (1993), estudando a anatomia da formação de raízes adventícias em brotações apicais de macieira 'Gala', observaram que algumas células do parênquima do floema apresentaram o citoplasma denso e nucléolo proeminente em um dia após o tratamento com AIB; a atividade meristemática no floema intensificou-se após 2 dias e as células do parênquima do floema, por mitoses contínuas, avançaram em direção ao córtex após 3 dias. Os primórdios de raiz tornaram-se visíveis aos 4 dias após o tratamento e, após 6 dias, houve intensa emissão de raízes.

A auxina é o hormônio mais importante no desencadeamento da rizogênese e é considerada como fator fundamental no enraizamento de explantes ou estacas (Margara, 1988). A auxina tem ação em um curto período, nas primeiras fases da rizogênese, a indução e a iniciação (Moncousin, 1988) e a sua

presença no meio de enraizamento durante o alongamento das raízes pode inibir o seu desenvolvimento (George, 1993). Assim, é indicado utilizar-se um meio para indução do enraizamento, com auxina, e posteriormente, outro isento de auxina, para desenvolvimento das raízes. Além disso, pode-se fazer o tratamento em solução concentrada de auxina, com a posterior transferência para meio de cultura sem fitorreguladores (Grattapaglia e Machado, 1998).

Moncousin (1988) menciona que a formação de raízes adventícias pode ser dividida nos seguintes estágios: ausência de fenômenos citológicos visíveis, dilatação do núcleo das células-alvo, divisões periclinais do câmbio, presença de áreas morfogenéticas radiais, meristemas radiculares internos e emergência das raízes. Com base em estudos metabólicos, bioquímicos e enzimáticos, o autor verificou que o enraizamento é dependente da evolução na produção de etileno, AIA-livre e orto-dihidroxifenóis, bem como da atividade da peroxidase.

Para que ocorra a formação de uma muda a partir de uma brotação ou estaca, deve haver um balanço adequado entre auxinas e citocininas. O aumento na concentração de auxina favorece a iniciação radicular, enquanto que o balanço favorável às citocininas induz a proliferação de brotações (George, 1993). As auxinas sintéticas utilizadas com maior frequência na indução do enraizamento são o ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenoacético (ANA) e ácido indolacético (AIA). Compostos fenólicos também estão envolvidos na rizogênese, os quais podem atuar como protetores da auxina ou sinérgicos na síntese de auxinas e nas fases iniciais da formação de raízes.

2.4 Aclimatização de mudas obtidas por micropropagação

A aclimatização é conceituada como sendo a fase ou estágio da micropropagação em que ocorre a transferência das mudas produzidas *in vitro*

para o ambiente natural ou um ambiente de transição, como uma casa de vegetação ou telado (Debergh e Maene, 1981). Há controvérsias no uso dos termos “aclimatação” e “aclimatização”. Brainerd e Fuchigami (1981) e George (1993) definem a aclimatação (“acclimation”) como um processo de adaptação regulado pela natureza, e aclimatização (“acclimatization”) como sendo aquele controlado pelo homem. Ambos, porém, são processos de adaptação de um organismo a uma alteração ou mudança ambiental.

Para muitas espécies, a aclimatização é considerada uma fase crítica da micropropagação. Segundo Read e Fellman (1985), um dos maiores obstáculos à aplicação prática dos métodos de cultura de tecidos na propagação de plantas é a dificuldade de transferir com sucesso as mudas da condição *in vitro* para o solo, devido à grande diferença entre as duas condições ambientais. Segundo Sutter e Hutzell (1984), a perda de vigor e a subsequente morte devida ao dessecamento são dois sérios problemas que ocorrem com plantas que são transferidas das condições *in vitro* para a estufa. O sucesso da transferência de plantas micropropagadas para a casa de vegetação é essencial para um sistema de micropropagação bem sucedido.

Segundo Dunstan e Turner (1984), a aclimatização é constituída de dois fatores: enraizamento (*in vitro* ou “*in vivo*”) e transferência para condições não-estéreis com temperatura e umidade controladas. Preece e Sutter (1991) citam que as técnicas de aclimatização podem ser efetuadas durante o cultivo *in vitro* e após a transferência das mudas.

Há diversos fatores envolvidos na aclimatização de mudas micropropagadas e é a interação e o manejo adequado dos mesmos que irá condicionar o sucesso deste estágio. O genótipo, o estresse hídrico, a alteração do metabolismo heterotrófico para autotrófico, a infecção por patógenos e o estresse pela luz são alguns dos fatores mencionados na literatura. Segundo Dunstan e

Turner (1984), os principais fatores que interferem nos resultados da aclimatização de mudas de macieira micropropagadas são a temperatura, irrigação/umidade do ar e do solo, contaminação e a época do ano.

Entretanto, a perda excessiva de água pelas mudas produzidas *in vitro* é apontada como um dos principais fatores. De acordo com Brainerd e Fuchigami (1981), o estresse hídrico é a principal causa do “choque do transplante” de plantas produzidas assepticamente. A perda de água é maior em plantas produzidas *in vitro* do que em plantas já aclimatizadas ou mantidas em casa de vegetação. Este estresse hídrico é devido principalmente à pequena quantidade de cera epicuticular e ao lento mecanismo de fechamento e abertura dos estômatos. A quantidade de cera epicuticular encontrada em plantas sob condições *in vitro* chega a ser de 25% do total encontrado em plantas sob casa de vegetação, embora a presença de cera epicuticular não seja um indicativo suficiente da sobrevivência das plantas na aclimatização (Sutter, 1988 e Preece e Sutter, 1991). Segundo estes autores, a alta umidade relativa do ar no interior dos recipientes é um dos principais fatores que provocam alterações significativas na estrutura e funcionamento dos tecidos, levando à incapacidade das mudas em controlar as perdas de água. A redução da umidade relativa aumenta a capacidade de resposta dos estômatos, a deposição de ceras epicuticulares e reduz o murchamento após a transferência para o solo (Sciutti e Morini, 1995).

Marin e Gella (1988) questionaram a dessecação dos tecidos como a causa da baixa taxa de sobrevivência na aclimatização de mudas de *Prunus cerasus*. Baseados em observações do funcionamento estomático, estrutura e espessura da cutícula e anatomia do xilema da raiz e da parte aérea, os autores não comprovaram a hipótese de que a dessecação seja a causa da baixa taxa de sobrevivência na aclimatização, o que é ratificado por dois fatos: a) a taxa de sobrevivência aumentou de 15 para 85% em *Prunus cerasus*, uma espécie com

dificuldade de aclimatização, ao serem alteradas as condições ambientais e b) a morte das mudas iniciou-se 15 dias após a transferência para o solo.

O questionamento feito por esses autores possibilita a abordagem de outro fator envolvido na aclimatização: a mudança do metabolismo heterotrófico para autotrófico. As plantas *in vitro* possuem metabolismo do carbono predominantemente heterotrófico, sendo a sacarose do meio de cultura a principal fonte de carbono e energia para o crescimento e desenvolvimento *in vitro*. Segundo Serret et al. (1996), explantes ou plantas *in vitro* apresentam estrutura e fisiologia do aparato fotossintético modificadas, resultantes de algumas condições peculiares: baixa irradiância, altos níveis de sacarose e baixo teor de CO₂ disponível. Estas condições afetam a sobrevivência *ex vitro*. Porém, conforme citam Kozai, Koyama e Watanabe (1988), desde que sejam dadas condições físicas (luz e CO₂, principalmente), as plantas *in vitro* podem desenvolver o metabolismo autotrófico. Sob tais condições, a sacarose no meio não é necessária. O cultivo autotrófico (sem açúcar) apresenta muitas vantagens sobre o heterotrófico, tais como menor contaminação, menor vitrificação, menor uso de mão-de-obra e maior adaptabilidade à automatização. A utilização de selamentos permeáveis a trocas gasosas em frascos de cultura pode estimular o desenvolvimento da fotoautotrofia *in vitro* (Serret et al., 1997).

Há vários métodos que podem ser empregados para a aclimatização de mudas micropropagadas, os quais podem ser agrupados em três classes: a) métodos que aproximam as condições *in vitro* das condições naturais; b) métodos que aproximam as condições naturais daquelas *in vitro* e c) métodos que favorecem o crescimento das mudas após a aclimatização. Em uma mesma situação, podem ser empregados diversos métodos. Segundo Gribaudo e Fronda (1993), a técnica convencional de aclimatização consiste no enraizamento *in vitro* em substrato com ágar, seguida da repicagem para o solo sob túnel ou

nebulização, para inicialmente manter o ambiente com alta umidade relativa do ar, reduzindo-a posteriormente de forma gradativa. O período de aclimatização em geral dura de 1 a 4 semanas, conforme a técnica adotada e a espécie.

A classe de métodos que objetivam aproximar as condições *in vitro* das condições naturais inclui diversas técnicas, que, de modo geral, proporcionam a pré-aclimatização. Dentre elas, podem ser citados o uso de redutores da umidade relativa do ar no interior do recipiente de cultura, tais como parafina e sílica-gel (Wardle, Dobbs e Short, 1983) e de indutores de estresse hídrico controlado, como o polietileno-glicol (PEG) (Gribaudo e Fronda, 1993), os quais induzem uma resposta estomática mais intensa, bem como favorecem a elaboração de ceras epicuticulares. Outra técnica nesta classe é a do uso de substratos alternativos ao ágar, como a vermiculita, areia ou substratos comerciais (Leite, 1995), de modo a proporcionar raízes mais ramificadas e de melhor qualidade para tolerar a aclimatização. O favorecimento de trocas gasosas através do selamento permeável dos recipientes de cultura (Serret et al., 1997), o enriquecimento da atmosfera do recipiente com CO₂, normalmente associado ao aumento da intensidade luminosa na sala de crescimento e à redução da concentração de sacarose no meio de cultura (Fujiwara, Kozai e Watanabe, 1988; Seko e Nishimura, 1996 e Serret et al., 1996), também são técnicas incluídas nesta classe e possibilitam o desenvolvimento e intensificação da fotoautotrofia ainda no interior dos recipientes de cultura.

Na classe de métodos que visam aproximar as condições naturais das condições *in vitro*, podem ser mencionados o uso de ambientes com elevada umidade relativa do ar (acima de 90%) através do uso de nebulização intermitente ou de coberturas plásticas ou de vidro sobre o recipiente de aclimatização (estufim) (Marin e Gella, 1988; Gribaudo e Fronda, 1993 e Corsato, 1993). Como a umidade relativa do recipiente de cultura *in vitro* é próxima de 100%,

será favorecida a aclimatização, sendo necessária, entretanto, a redução gradativa da mesma após o período crítico inicial. O sombreamento no local onde estão as plantas em aclimatização também é muito importante, para evitar o estresse pela luz (George, 1993). Nesta classe, estão incluídas desde técnicas simples, como a manutenção da sanidade do ambiente e das mudas (George, 1993), até aquelas mais complexas, como o uso de sistemas automatizados e unidades de aclimatização (Hayashi, Nakayama e Kozai, 1988).

Estão incluídos na classe dos métodos que favorecem o crescimento das mudas após a aclimatização, o enraizamento *ex vitro* ou “in vivo” (Gray e Klein, 1987; Gray e Klein, 1989; Pasqual e Lopes, 1991 e Biasi, 1996), a escolha do substrato adequado (Normah, Nor-Azza e Alliudin, 1995), o uso de micorrizas (Corsato, 1993) e o uso de inoculantes de bactérias fixadoras de nitrogênio, no caso de leguminosas. Segundo Howard (1987), as mudas provenientes do cultivo *in vitro* são de pequeno tamanho (menos de 5 cm de altura) quando transplantadas, de modo que necessitam aumentar entre 10 a 20 vezes o seu tamanho para serem utilizadas. Isto é especialmente importante quando a micropropagação é apenas o primeiro estágio da produção do porta-enxerto ou da planta.

2.5 Enraizamento de brotações e aclimatização de mudas de macieira produzidas por cultura de tecidos

A micropropagação de macieira tem sido estudada com frequência, embora ainda haja necessidade de otimização dos protocolos para diferentes condições de propagação de vários genótipos. Jones, Hopgood e O’Farrel (1977) e Dunstan e Turner (1984) descreveram protocolos para micropropagação de macieira, desde o estabelecimento *in vitro* até a aclimatização.

Além disso, muitos ensaios têm sido realizados sobre o enraizamento de macieira, principalmente enfocando o enraizamento *in vitro*. Simmonds (1983) observou que baixas concentrações do meio MS contribuem para aumentar o enraizamento de brotações do porta-enxerto 'M-26' e concluiu que alguns procedimentos, apesar de aumentarem o enraizamento *in vitro*, prejudicam a aclimatização; portanto, não devem ser aplicados a protocolos de propagação. Broome e Zimmerman (1984) mencionam que, para o enraizamento de macieira, usam-se brotações de 1-2 cm de comprimento e o meio para enraizamento é o mesmo utilizado para a multiplicação, mas com os minerais e a sacarose reduzidos pela metade e sem benziladenina ou ácido giberélico. A resposta ótima para diversas cultivares de macieira tem sido obtida em baixas concentrações de auxina ($4,9 \times 10^{-7}$ a $1,47 \times 10^{-6}$ M AIB). Hutchinson (1984) estudou diversos fatores envolvidos no estabelecimento, proliferação, iniciação de raízes adventícias de macieira 'Northern Spy' a partir de meristemas. As raízes foram facilmente induzidas com uso de AIB e a concentração de sais e o suporte físico influenciaram também o enraizamento e o crescimento das raízes. O autor cita que baixas concentrações de sais são benéficas apenas se utilizadas com baixas concentrações de AIB. Van der Krieken et al. (1992) observaram que o máximo enraizamento em explantes de macieira ocorreu após a incubação em escuro em meio contendo 3,2 ou 10 μ M de AIB + riboflavina. Os autores concluíram que o efeito sinérgico da riboflavina e o efeito antagônico da luz na formação de mudas induzidas pelo AIB não são baseados unicamente nas mudanças das concentrações dos componentes da auxina, resultando na absorção de AIB. Ribas e Zanette (1992), objetivando a produção rápida de mudas de macieira 'Gala', testaram diversos fatores envolvidos na micropropagação. Zanol (1996), trabalhando com a micropropagação do porta-enxerto 'Marubakaido', observou que brotações de origem apical apresentam maior facilidade de enraizamento.

Além disso, constatou que a exposição dos explantes por períodos superiores a 6 dias e concentrações maiores que $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB foram prejudiciais ao enraizamento, diminuindo a sobrevivência em casa de vegetação. Bolar et al. (1998), trabalhando com 7 cultivares de macieira, induziram o enraizamento das brotações durante 1 semana em meio MS adicionado de AIB (3 mg.L^{-1}), com posterior repicagem para meio sem auxina, para alongamento das raízes. Após transferirem as brotações enraizadas para torrões (“plugs”) de turfa, os autores obtiveram 70 a 100% de sobrevivência das mudas.

Diversos autores mencionam a aclimatização de mudas de macieira enraizadas *in vitro*. Segundo Belaizi et al. (1989), a aclimatização é um dos fatores limitantes para a propagação da macieira. Brainerd e Fuchigami (1981) estudaram o efeito da exposição de mudas de macieira cv. Mac-9 produzidas *in vitro* à baixa umidade relativa do ar (30-40%) durante 0 a 6 dias, avaliando o teor relativo de água e o percentual de fechamento estomático em folhas de plantas *in vitro* submetidas à pré-aclimatização e de plantas mantidas em casa de vegetação (testemunha). Os autores observaram que plantas cultivadas *in vitro* perderam mais água do que aquelas em casa de vegetação e concluíram que as folhas de plantas cultivadas *in vitro* podem ser aclimatizadas a baixa umidade relativa do ar (30-40% por 4 a 5 dias). Dias-Pérez, Schakel e Sutter (1995) avaliaram as alterações fisiológicas que ocorrem durante a aclimatização de brotações e plântulas enraizadas *in vitro* de macieira. Os autores observaram que houve redução gradual na condutância das folhas, sendo que brotações e plântulas pré-aclimatizadas apresentaram condutância 50% menor quando comparadas às não-aclimatizadas. A redução da condutância, resultante da aclimatização, contribui para a redução da transpiração sob condições de elevada demanda evaporativa.

O enraizamento *ex vitro* é uma técnica de uso cada vez mais frequente na micropropagação de macieira. Webster e Jones (1989) compararam o enraizamento *in vitro* e *ex vitro* de brotações do porta-enxerto 'M-9', utilizando, para o enraizamento *ex vitro*, o tratamento com AIB em pó (0,2%) + Captan. Esses autores obtiveram, em média, 45% de enraizamento *in vitro* e 83% de enraizamento *ex vitro*. Mansani, Voltolini e Pedrotti (1997) trabalharam com os porta-enxertos de macieira 'M7', 'M9' e 'Marubakaido', induzindo o enraizamento *ex vitro* após o tratamento com AIB a 500 ppm durante 5 segundos, utilizando como substrato a vermiculita + casca de arroz, em ambientes de estufim e casa de vegetação.

3 METODOLOGIA GERAL

O presente trabalho foi constituído de diversos experimentos, correspondentes aos estádios 3 e 4 da micropropagação, que consistem, respectivamente, no enraizamento das brotações e na transferência das mudas micropropagadas para as condições de casa de vegetação (Debergh e Maene, 1981). Para a sua realização, foram utilizados o Laboratório de Cultura de Tecidos e a casa de vegetação do Pomar Didático, vinculados ao Departamento de Agricultura da UFLA, em Lavras, MG.

Para a realização dos experimentos, o material propagativo inicial foi obtido do Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (CPACT) da EMBRAPA, em Pelotas, RS e consistiu de brotações não-enraizadas, mantidas em tubos de ensaio, dos porta-enxertos 'Marubakaido' (*Malus prunifolia*) e 'M-26' (*Malus sp.*).

Os meios de cultura utilizados nas fases de multiplicação e enraizamento *in vitro* foram variações do meio MS (Murashige e Skoog, 1962). As modificações do meio básico são citadas na metodologia específica de cada experimento. Para o preparo destes meios, foram utilizadas soluções-estoque preparadas com água destilada e armazenadas em frascos de vidro escuro, a uma temperatura próxima a 5°C. O ajuste do pH do meio foi realizado com NaOH 0,5 e 0,1 N e, quando necessário, com HCl 0,1 N, antes da adição do ágar. Após o preparo, os meios foram autoclavados à pressão de 1,5 atm e à temperatura de 120°C durante 20 minutos.

O manuseio do material vegetal ocorreu em câmara de fluxo laminar, desinfestada com álcool (etanol) a 70%. Os instrumentos (pinças e bisturis) foram autoclavados e, no momento do uso, esterilizados com etanol 96 GL, sendo periodicamente flambados durante o seu uso. O manuseio dos explantes foi realizado sobre placas de petri de vidro, previamente autoclavadas. Após o manuseio, os frascos contendo as plantas foram colocados em sala de crescimento, com luminosidade em torno de $47 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas. Como recipiente para cultivo, foram utilizados frascos de vidro com capacidade para 250 cm^3 cobertos com tampas plásticas translúcidas e seladas com filme de PVC. O período em que as plantas foram mantidas em sala de crescimento foi variável conforme o experimento, sendo citado na metodologia específica de cada capítulo.

Para aclimatização, foi utilizada uma casa de vegetação (marca Van der Hoeven), dotada de sistema de nebulização intermitente, com controle automático de umidade e ventilação. A temperatura no interior da casa de vegetação oscilou em torno de 25 a 30°C. As plantas em aclimatização foram mantidas em bancada de tela metálica (malha de 3 x 3 cm, à altura de 1,0 m abaixo dos bicos de nebulização). Sobre a bancada e acima da tubulação de nebulização, foi disposta

uma camada dupla de tela plástica de sombreamento (Sombrite), de coloração preta e com capacidade de 50% de sombreamento. O período de aclimatização foi variável conforme o experimento, sendo apresentado nas respectivas metodologias específicas.

Durante a condução dos experimentos, foram feitas pulverizações semanais com Benomyl (2 g.L⁻¹ do produto comercial Benlate), com a finalidade de evitar a contaminação das mudas e o aparecimento de doenças.

Na Tabela 1.1, são apresentadas as variáveis analisadas nos experimentos e a forma de determinação das mesmas.

TABELA 1.1. Variáveis analisadas nos experimentos. Lavras, UFLA, 1999.

Variável	Forma de determinação	Unidade
Altura da muda ou do explante	medição direta, com régua, da altura da haste única de cada muda ou explante, compreendida desde o colo até o meristema apical	cm
Área foliar	variável conforme o experimento (descrito nas metodologias específicas)	cm ² /muda
Comprimento da maior raiz	medição, com régua, da maior raiz adventícia primária (1 ^a ordem) emitida em cada explante, após lavagem e retirada do substrato	cm
Comprimento dos entrenós	medida da distância entre duas gemas axilares, com posterior cálculo da média em cada planta	cm
Comprimento de raízes primárias	medição, com régua, de todas as raízes adventícias primárias (1 ^a ordem) emitidas em cada explante, após lavagem e retirada do substrato, posterior cálculo da média por planta	cm

Variável	Forma de determinação	Unidade
Enraizamento <i>in vitro</i> ou percentual de brotações enraizadas	contagem do total de brotações (microestacas) enraizados em cada repetição, independente do número e comprimento das raízes emitidas, em relação ao total de explantes da repetição	%
Matéria seca da microestaca	pesagem, em balança analítica de 4 dígitos de toda a microestaca (brotação obtida <i>in vitro</i> , com cerca de 2 cm de comprimento e 1 mm de diâmetro, com meristema apical e 2 pares de folhas no ápice), em cada repetição, após secagem em estufa a 60-70°C até peso constante, com posterior cálculo da média por microestaca	mg/ micro- estaca
Matéria seca da parte aérea	idem anterior, incluindo apenas a porção da muda acima do colo com posterior cálculo da média por muda	mg/muda ou g/muda
Matéria seca das raízes	idem anterior, incluindo as raízes adventícias (primárias e secundárias) e da região da microestaca onde foram emitidas as raízes, com posterior cálculo da média por muda	mg/muda ou g/muda
Matéria seca dos explantes	relação entre o peso da matéria seca dos explantes, obtida após secagem em estufa a 60-70°C e o peso da matéria fresca, logo após a retirada do frasco de cultivo <i>in vitro</i>	%
Mudas com mais de um entrenó	relação entre o número de mudas com dois ou mais entrenós com mais de 5 mm e o total de mudas de cada repetição	%
Número de folhas	contagem do total de folhas, independente da sua dimensão, em cada muda	folhas/ muda
Número de raízes primárias	contagem do total de raízes adventícias primárias (1ª ordem), emitidas a partir do explante (microestaca), independente do seu comprimento, em cada muda	raízes primárias/ muda
Número de raízes secundárias	contagem do total de raízes adventícias secundárias (2ª ordem), emitidas a partir das raízes primárias, independente do seu comprimento, em cada muda	raízes secundá- rias/muda

Variável	Forma de determinação	Unidade
Peso de mudas <i>in vitro</i>	pesagem em balança analítica (2 dígitos) do frasco contendo as mudas <i>in vitro</i> , descontando-se o peso dos frascos com o meio de cultura, previamente determinado, e a perda de peso do meio de cultura devido à dessecação	mg/muda
Rendimento de microestacas	número de microestacas aptas para uso em enraizamento (<i>in vitro</i> ou <i>ex vitro</i>) retiradas a partir de um explante submetido à multiplicação <i>in vitro</i>	micro-estacas/ex-plante
Sobrevivência	relação entre o total de mudas sobreviventes no tempo 'Ti' e o total inicial de mudas em cada repetição na implantação do experimento ("T ₀ ")	%

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso para todos os experimentos, sendo os tratamentos comparados através do teste de Tukey a 5%, para fatores qualitativos, ou por análise de regressão, para fatores quantitativos. Quando foram realizadas avaliações sequenciais, foi utilizada a análise em parcelas subdivididas no tempo.

As análises estatísticas dos resultados obtidos foram realizadas com uso do software SANEST (Zonta e Machado, 1991), seguindo-se as peculiaridades de cada experimento, conforme citado na metodologia específica de cada capítulo.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, W. et al. Propagação vegetativa *in vitro* de cultivares de macieira. *Bragantia*, Campinas, v.45, n.1, p.143-154, 1986.
- BIASI, L.A. Avaliação do desenvolvimento inicial de porta-enxertos e de mudas de videira obtidos através de diferentes métodos de propagação. Piracicaba: ESALQ, 1996, 177p. (Tese - Doutorado em Agronomia)

BELAIZI, M. et al. Improved techniques of micropropagation in apple (*Pyrus malus*) cultivar Golden Delicious. **Bulletin de La Societé Botanique de France Lettres Botaniques**, Paris, v.136, n.3, p.187-198, 1989.

BOLAR, J.P. et al. An efficient method for rooting and acclimation of micropropagated apple cultivars. **HortScience**, Alexandria, v.33, n.7, p.1251-1252, 1998.

→ BRAINERD, K.E.; FUCHIGAMI, L.H. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 106, n.4, p.515-518, 1981.

BROOME, O.C.; ZIMMERMAN, R.H. Culture of shoots meristems: fruit plants *in vitro*: VASIL, I.K. (ed.) **Cell culture and somatic cell genetics of plants - Laboratory procedures and their applications**, v.1. Orlando: Academic Press, 1984, p.111-122.

CORRÊA, D. de M. Enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira (*Malus domestica* Borkh.). Lavras: ESAL, 1990, 50p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia)

CORRÊA, D. de M.; PASQUAL, M.; YUI, E. Concentrações de ácido giberélico e de ácido naftalenoacético na propagação *in vitro* da macieira 'Fuji'. **Ciência e Prática**, Lavras, v.15, n.1, p.26-31, 1991.

→ CORSATO, C.E. Comportamento fisiológico do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) micropropagado e aclimatado na presença de fungos endomicorrízicos. Piracicaba: ESALQ, 1993, 48p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas)

→ DEBERGH, P.C.; MAENE, L.V. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.14, p. 335-345, 1981.

* DENARDI, F. Porta-enxertos. In: EMPRESA CATARINENSE DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Manual da cultura da macieira**. Florianópolis: EMPASC, 1986, p.92-132.

DIAZ-PÉREZ, J.C.; SHACKEL, K.A.; SUTTER, E.G. Effects of In vitro formed roots and acclimatization on water status and gas exchange of tissue cultured apple shoots. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v.120, n.3, p.435-440, may 1995.

→ DUNSTAN, D.I.; TURNER, K.E. The acclimatization of micropropagated plants. In: VASIL, I.K. (ed.) *Cell culture and somatic cell genetics of plants - Laboratory procedures and their applications*, v.1. Orlando: Academic Press, 1984, p.123-129.

↘ EPAGRI (EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E DIFUSÃO DE TECNOLOGIA DE SANTA CATARINA). *Recomendação de cultivares para o Estado de Santa Catarina 1992-1993*. Florianópolis, 1992. 126p. (EPAGRI. Boletim Técnico, 57)

✓ FERREE, D.C.; CARLSON, R.F. Apple rootstocks. In: ROM, R.C.; CARLSON, R.F. *Rootstocks for fruit crops*. New York: Wiley-InterScience, 1988, p. 79-93.

FORTES, G.R. de L. *Calogênese e organogênese in vitro de macieira (Malus spp.) afetadas por fatores físicos, químicos e biológicos*. Viçosa: UFV, 1992, 163p. (Tese – Doutorado em Fitotecnia)

→ FUJIWARA, K.; KOZAI, T.; WATANABE, I. Development of a photoautotrophic tissue culture system for shoots and/or plantlets at rooting and acclimatization stages. *Acta Horticulturae*, Wageningen, n.230, p.153-158, 1988.

→ GEORGE, E.F. *Plant propagation by tissue culture – Part 1: The technology*. 2nd ed. Edington: Exegetics, 1993. 786p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998, p.183-260.

→ GRAY, D.J.; KLEIN, C.M. In vitro micropropagation and plant establishment of 'Orlando Seedless' grape and 'Tampa' rootstock. *Proceedings of Florida State Horticultural Society*, Orlando, v.100, p.308-309, Oct. 1987.

- GRAY, D.J.; KLEIN, C.M. In vitro micropropagation and plant establishment of 'Blanc du Bois' grape. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, Tampa, v.102, p.221-223, Nov. 1989.
- GRIBAUDO, I.; FRONDA, A. L'ambientamento delle piante frutticole micropropagate. **Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura**, Bologna, v.51, n.1, p.75-80, 1993.
- HAISSIG, B.E.; DAVIS, T.D.; RIEMENSCHNEIDER, D.E. Researching the controls of adventitious rooting. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.84, p.310-317, 1992.
- HARBAGE, J.F.; STIMART, D.P.; EVERT, R.F. Anatomy of adventitious root formation in microcuttings of *Malus domestica* Borkh. 'Gala'. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.118, n.5, p.680-688, 1993.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, JR., F.T. **Plant Propagation: principles and practices**. 5.ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1990. 647p.
- HAYASHI, M.; NAKAYAMA, M.; KOZAI, T. An application of the acclimatization unit for growth of carnation explants, and for rooting and acclimatization of the plantlets. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.230, p.189-194, 1988.
- HOWARD, B.H. Propagation. In: ROM, R.C.; CARLSON, R.F. **Rootstocks for fruit crops**. New York: Wiley InterScience, 1987, p.29-77.
- HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. **Handbook of plant cell cultures**, New York: MacMillan, v.1, 1983, p.177-227.
- HUTCHINSON, J.F. Factors affecting shoot proliferation and root initiation in organ cultures of the apple 'Northern Spy'. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.22, p. 347-358, 1984.
- JONES, O.P.; HOPGOOD, M.E.; O'FARREL, D. Propagation *in vitro* of M-26 apple rootstocks. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.52, n.2, p.235-238, 1977.

- ✓ KOZAI, T.; KOYAMA, Y.; WATANABE, I. Multiplication of potato plantlets *in vitro* with sugar free medium under high photosynthetic photon flux. *Acta Horticulturae*, Wageningen, n.230, p.121-127, 1988.
- ✓ LEITE, G.B. Efeito de reguladores de crescimento, substratos, sacarose e intensidade luminosa na micropropagação de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Bartlett e do clone OH x 97. Pelotas: UFPEL, 1995, 50p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia)
- MANSANI, A.; VOLTOLINI, J.A.; PEDROTTI, E.L. Aclimatização de clones de porta-enxertos micropropagados. II ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL (Gramado: 1997). Programa e Resumos... Gramado, FAO-REDBIO/EMBRAPA/UFRGS, p.163, 1997.
- MARGARA, J. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Madrid: Mundi-Prensa, 1988. 232p.
- ⇒ MARIN, J.A.; GELLA, R. Is desiccation the cause of the poor survival rate in the acclimatization of micropropagated *Prunus cerasus* L.? *Acta Horticulturae*, Wageningen, n.230, p.105-112, 1988.
- MONCOUSIN, C. Adventitious rhizogenesis control: new developments. *Acta Horticulturae*, Wageningen, v.230, p.97-104, 1988.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, Copenhagen, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- ⇒ NORMAH, M.N.; NOR-AZZA, A.B.; ALIUDIN, R. Factors affecting *in vitro* shoot proliferation and *ex vitro* establishment of mangosteen. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.43, n.3, p.291-294, Dec. 1995.
- ⇒ PASQUAL, M.; LOPES, P.A. Efeitos da concentração e tempo de incubação em ácido indolbutírico sobre o enraizamento e posterior desenvolvimento de brotos de *Pyrus calleryana* L. obtidos *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.26, n.7, p.975-980, 1991.
- PEIXOTO, P.H.P. et al. Influência da concentração de ágar na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de pessegueiro 'Okinawa' (*Prunus persica* (L.) Batsch.). *Ciência e Prática*, Lavras, v.16, n.3, p.377-380, 1992.

PIERIK, R.L.M. Handicaps for the large scale commercial application of micropropagation. *Acta Horticulturae*, Wageningen, n.230, p. 63-71, 1988.

→ PREECE, J.E.; SUTTER, E.G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (eds.) *Micropropagation*. Dordrecht: Kluwer Academic, p. 71-93, 1991.

→ READ, P.E.; FELLMAN, C.D. Accelerating acclimation of *in vitro* propagated woody ornamentals. *Acta Horticulturae*, Wageningen, n.166, p.15-20, 1985.

RIBAS, L.L.F.; ZANETTE, F. Propagação da macieira cv. Gala através da cultura de meristemas. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, São Carlos, v.4, n.1, p.39-43, Jul. 1992.

→ SCIUTTI, R.; MORINI, S. Water loss and photosynthesis of plum plantlets is influenced by relative humidity during rooting *in vitro*. *Journal of Horticultural Science*, Ashford, v.70, n.2, p.221-228, 1995.

→ SEKO, Y.; NISHIMURA, M. Effect of CO₂ and light on survival and growth of rice regenerants grown *in vitro* on sugar-free medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.46, n.3, p.257-264, Sept. 1996.

→ SERRET, M.D. et al. Development of photoautotrophy and photoinhibition of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.45, n.1, p.1-16, Apr. 1996.

→ SERRET, M.D. et al. The effect of different closure types, light and sucrose concentrations on Carbon isotope composition and growth of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation and subsequent acclimation *ex vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.47, n.3, p.217-230, Jan. 1997.

SIMMONDS, J. Direct rooting of micropropagated M-26 apple rootstock. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.21, n.3, p.233-242, 1983.

→ SUTTER, E. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry, and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v. 113, n.2, p. 234-238, 1988.

★ SUTTER, E.G.; HUTZELL, M. Use of humidity tents and antitranspirants in the acclimatization fo tissue-cultured plants to the greenhouse. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.23, n.4, p.303-312, 1984.

VAN DER KRIEKEN, W.M. et al. Effect of light and riboflavin on indolebutyric acid-induced root formation on apple *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.85, n.4, p.289-594, August 1992.

← WARDLE, K.; DOBBS, E.B.; SHORT, K.C. *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v.108, n.3, p.386-389, 1983.

WEBSTER, C.A.; JONES, O.P. Micropropagation of the apple rootstock M-9: effect of sustained subculture on apparent rejuvenation *in vitro*. *Journal of Horticultural Science*, Ashford, v.64, n.4, p.421-428, July 1989.

YUL, E. *Multiplicação in vitro* de porta-enxertos de macieira (*Malus domestica* Borkh.). Lavras: ESAL, 1990,69P. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia)

ZANOL, G.C. *Enraizamento in vitro* do porta-enxerto Marubakaido (*Malus prunifolia*) afetado pela exposição de períodos de escuro, concentrações de ácido indolbutírico e floroglucinol. Pelotas: UFPEL, 1996; 81p. (Dissertação- Mestrado em Fruticultura de Clima Temperado)

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. *Manual do SANEST: Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores*. Pelotas: UFPEL, 1991. 102p.

CAPÍTULO 2

SUBSTRATOS NO ENRAIZAMENTO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS MICROPROPAGADAS DE PORTA-ENXERTOS DE MACIEIRA

Resumo: Neste trabalho, foram estudados os efeitos de diferentes substratos sobre o enraizamento de brotações e a aclimatização de mudas dos porta-enxertos de macieira 'Marubakaido' e 'M-26' cultivados *in vitro*. Foram realizados três experimentos, utilizando explantes previamente mantidos *in vitro*, no Laboratório de Cultura de Tecidos da UFLA (Lavras, MG). No primeiro, foram estudadas seis proporções de areia, vermiculita e Plantmax, em relação à proporção complementar do ágar na fase de enraizamento *in vitro* de 'Marubakaido'. No segundo, foi estudado o efeito de substratos alternativos ao ágar (Vermiculita e Plantmax) durante as fases de indução e desenvolvimento de raízes adventícias de 'Marubakaido' e 'M-26'. No terceiro experimento, foram testados cinco substratos (Plantmax, Vermiculita, Solo + Areia, Composto Orgânico + Areia e Solo + Composto Orgânico + Areia) na aclimatização de mudas de 'Marubakaido' enraizadas *in vitro*. Em todos os experimentos, foram avaliados parâmetros relativos à qualidade das raízes, sobrevivência e crescimento durante a aclimatização em casa de vegetação. Os melhores resultados foram obtidos com o ágar, isolado ou combinado com 20% de areia ou vermiculita em 'Marubakaido'. O ágar, na fase de indução do enraizamento e o ágar ou Plantmax, na fase de desenvolvimento das raízes adventícias proporcionaram bons resultados para o 'Marubakaido' e para o 'M-26'. Na fase de aclimatização das mudas de 'Marubakaido', a maior sobrevivência e crescimento das mudas foram obtidos com o Plantmax.

Palavras-chave: cultura de tecidos, *Malus*, Rosaceae, propagação

SUBSTRATES ON *IN VITRO* ROOTING AND ACCLIMATIZATION OF MICROPROPAGATED APPLE ROOTSTOCK PLANTLETS

Abstract: In this work, the effect of different substrates on shoot rooting and acclimatization of *in vitro* propagated 'Marubakaido' and 'M-26' apple plantlets were studied. Three experiments were carried out using explants previously maintained *in vitro* at the Tissue Culture Laboratory of the UFLA (Lavras, MG). In the first experiment, six proportions of sand, vermiculite and Plantmax, in relation to the complementary proportion of agar were studied during the *in vitro* rooting phase of 'Marubakaido' shoots. In the second experiment, the effect of alternative propagation media (Vermiculite and Plantmax) to agar during the induction and adventitious root development phases of 'Marubakaido' and 'M-26' was studied. In the third experiment, five substrates (Plantmax, Vermiculite, Soil + Sand, Compost + Sand and Soil + Compost + Sand) were tested in the acclimatization of *in vitro* rooted 'Marubakaido' plantlets. In all experiments, parameters related to quality of adventitious roots, plantlet survival and growth during acclimatization in greenhouse were evaluated. The best results were obtained using agar, isolated or in combination with 20% sand or vermiculite for 'Marubakaido'. The use of agar during rooting induction and agar or Plantmax, during adventitious root development provided good results for 'Marubakaido' and 'M-26' plantlets. Higher survival and growth were obtained when Plantmax was used during the acclimatization phase of 'Marubakaido' plantlet.

Key words: tissue culture, *Malus*, Rosaceae, propagation

1 INTRODUÇÃO

O substrato, que é o meio de sustentação ou suporte durante o cultivo *in vitro* e aclimatização das mudas, é um dos fatores externos de maior influência sobre o enraizamento de brotações e sobre a qualidade das raízes adventícias, desempenhando papel importante na sua sobrevivência e seu desenvolvimento. O substrato afeta principalmente a aeração e, além disso, o escurecimento do ambiente de enraizamento, pH, umidade e resistência física ao crescimento das raízes, entre outros (George, 1993 e Leite, 1995)

O método convencional de micropropagação consiste no enraizamento *in vitro* de brotações em meio geleificado com ágar, com a posterior transferência das mudas enraizadas para casa de vegetação. Porém, o sistema radicular adventício emitido em meio semi-solidificado com ágar ou produto equivalente é, em geral, pouco ramificado, quebradiço e isento de pêlos radiculares (Leite, 1995), de modo que as raízes assim formadas são pouco eficientes na absorção de água e nutrientes durante a aclimatização. Grout e Aston (1977) e Zimmerman (1981) também apontam a baixa qualidade da raiz formada em ágar como uma das causas da baixa sobrevivência das mudas durante a aclimatização, além de ser o componente de maior custo do meio de cultura (Leite, 1995).

O efeito do substrato pode ser variável conforme a fase do enraizamento em que se utiliza um ou outro tipo. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), a rizogênese pode ser dividida em três fases: indução, iniciação e alongamento. Assim, é provável que, de acordo com o material utilizado como substrato em cada fase, os resultados sobre o percentual de enraizamento ou mesmo sobre o padrão de desenvolvimento das raízes adventícias poderão afetar a sobrevivência e o crescimento das mudas durante a aclimatização.

O uso de substratos alternativos para o enraizamento visando a obtenção de um sistema radicular mais apropriado para a adaptação da muda em casa de vegetação já foi testado em diversos trabalhos. Grattapaglia e Machado (1998) mencionam que a vermiculita, perlita ou espumas de poliuretano embebidas com meio líquido podem ser alternativas mais baratas e dar melhores resultados que o ágar. Zimmerman e Fordham (1985) mencionam o uso de vermiculita, areia e perlita como suporte para o enraizamento. Hutchinson (1984), trabalhando com enraizamento de explantes de macieira 'Northern Spy' em meio líquido e em meios com areia grossa, perlita ou ágar, obteve 90 a 100% de iniciação de raízes nos três meios, mas houve pouco crescimento das raízes em ágar. Leite (1995) obteve, em relação ao ágar, maior ramificação do sistema radicular e maior

densidade de pelos absorventes em explantes de pereira com a utilização de vermiculita como substrato para enraizamento, concluindo que este material substitui com vantagens o ágar, além de ser mais barato. Maciel et al. (1997), trabalhando com o porta-enxerto de macieira 'M7', usaram diversas concentrações do meio MS (0, 50, 100, 150 e 200%) e três substratos (ágar 3 e 6 g.L⁻¹), vermiculita e areia. Após 45 dias, os autores obtiveram melhor desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular com ágar 3 e 6 g.L⁻¹, em qualquer concentração de sais. O uso de areia proporcionou resultados similares ao ágar quando foi empregada a concentração de 100% dos sais de MS. Além disso, Caldas, Haridasan e Ferreira (1998) mencionaram que, na fase de enraizamento "in vitro", a vermiculita, umedecida com solução nutritiva, pode favorecer a formação de raízes, pelo maior grau de aeração que proporciona.

Na fase de aclimatização de mudas enraizadas *in vitro* ou *ex vitro*, o substrato afeta a sobrevivência e o crescimento. Hutchinson (1984), trabalhando com macieira 'Northern Spy', testou dois substratos compostos para aclimatização (vermiculita + perlita 1:1 v/v e turfa + areia grossa 1:3 v/v), obtendo bons resultados com os mesmos. Ponchia e Gardiman (1993) utilizaram turfa + composto + areia (1:1:1), composto + areia (2:1) e turfa + areia (2:1) na aclimatização de *Prunus laurocerasus*. Normah, Nor-Azza e Aliudin (1995) avaliaram o efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de mangostão, testando o uso de vermiculita + solo (1:1 v/v), areia + solo (1:1 v/v), areia + solo + material orgânico (3:2:1 v/v) e vermiculita + areia (1:1 v/v), obtendo o maior crescimento em altura das mudas com areia + solo e areia + solo + material orgânico.

Este trabalho teve por objetivo estudar o efeito de diferentes substratos no enraizamento *in vitro* nas etapas de indução e desenvolvimento *in vitro* de raízes adventícias e na aclimatização de mudas micropropagadas dos porta-enxertos de macieira 'Marubakaido' e 'M-26'.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos que constituem este trabalho foram conduzidos utilizando brotações apicais dos porta-enxertos 'Marubakaido' (*Malus prunifolia*) e 'M-26' (*Malus* sp.), obtidas *in vitro*. Na transferência para o meio de enraizamento, as brotações foram preparadas com cerca de 2 a 3 cm de comprimento (4 a 6 gemas), retirando-se as folhas inferiores e mantendo-se o meristema apical e 2 pares de folhas próximas ao meristema. O protocolo geral para o cultivo *in vitro* encontra-se descrito no Capítulo 1 (Metodologia Geral).

Este trabalho foi constituído de três experimentos:

Experimento 1 - Substratos no enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido'

Neste experimento, os tratamentos consistiram de seis proporções entre ágar e vermiculita, ágar e areia e ágar e Plantmax (substrato comercial, elaborado com vermiculita expandida e materiais orgânicos de origem vegetal, isento de pragas, microorganismos e sementes de invasoras), de acordo com a Figura 2.1.

Utilizou-se vermiculita de granulometria fina, areia média lavada e peneirada e Plantmax com 51,45% de umidade. Para o preparo dos substratos, foi feita a sua pesagem dentro dos frascos (250 cm³), aos quais foi adicionado o meio de cultura.



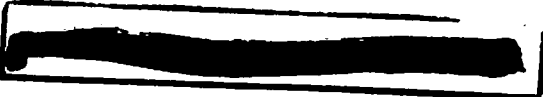
Ágar	7,0 g.L ⁻¹ (100%) +	5,6 g.L ⁻¹ (80%) +	4,2 g.L ⁻¹ (60%) +	2,8 g.L ⁻¹ (40%) +	1,4 g.L ⁻¹ (20%) +	- (0%) +
Vermiculita	- (0%) ou	2,4 g/fr. (20%) ou	4,8 g/fr. (40%) ou	7,2 g/fr. (60%) ou	9,6 g/fr. (80%) ou	12 g/fr. (100%) ou
Areia	- (0%) ou	29,6 g/fr. (20%) ou	59,2 g/fr. (40%) ou	88,8 g/fr. (60%) ou	118,4 g/fr. (80%) ou	148 g/fr. (100%) ou
Plantmax	- (0%)	12 g/fr. (20%)	24 g/fr. (40%)	36 g/fr. (60%)	48 g/fr. (80%)	60 g/fr. (100%)
Prop. Substrato						
Prop. Ágar						

FIGURA 2.1. Representação dos tratamentos adotados no experimento. Lavras, UFLA, 1999.

A partir do tratamento convencional (testemunha), que consistiu no uso de 40 ml de meio de cultura acrescido de 7,0 g.L⁻¹ de ágar, foram sendo reduzidas as concentrações de ágar e aumentadas as concentrações dos substratos até o uso do substrato umedecido com meio líquido (sem ágar). Como meio de cultura, foi utilizado o meio MS, com metade da concentração dos sais, acrescido de vitaminas (1,5 mg.L⁻¹), glicina (2,0 mg.L⁻¹), mio-inositol (100 mg.L⁻¹), sacarose (30 g.L⁻¹) e AIB (1,0 mg.L⁻¹). Foram colocadas 4 brotações por frasco, mantendo-se os explantes em sala de crescimento, durante 55 dias.

Após este período, foram realizadas as seguintes avaliações: percentagem de brotações enraizadas, altura da brotação e número de raízes primárias. A seguir, as raízes foram lavadas com água destilada e as mudas foram repicadas para bandejas de poliestireno expandido (tipo Plantágil, com 128 células de 50 cm³ cada), contendo como substrato uma mistura de Plantmax + vermiculita de granulometria média, na proporção de 2:1 v/v, as quais foram colocadas em casa de vegetação, com sistema de nebulização intermitente. Após



35 dias de aclimatização, foi realizada a avaliação final, sendo determinada a sobrevivência, altura da brotação, número de raízes primárias e matéria seca das raízes e da parte aérea.

Foi adotado o delineamento experimental inteiramente ao acaso, com 4 repetições e 8 explantes por repetição. Os resultados foram comparados através do teste de Tukey a 5% de probabilidade, sendo efetuada a transformação $\sqrt{x+0}$ para a matéria seca da parte aérea e $\arcsen \sqrt{x+100}$ para a variável sobrevivência.

Experimento 2 – Substratos na indução e desenvolvimento de raízes adventícias em brotações de macieira ‘Marubakaido’ e ‘M-26’

Neste experimento, foram testados três substratos para a indução do enraizamento *in vitro* e três substratos para o desenvolvimento das raízes adventícias em brotações dos porta-enxertos ‘Marubakaido’ e ‘M-26’. O experimento foi desenvolvido em duas fases (Figura 2.2):

a) Primeira fase – Metade das brotações dos dois porta-enxertos foram repicadas para meio de cultura com a metade da concentração dos sais de MS, acrescido de vitaminas ($1,5 \text{ mg.L}^{-1}$), glicina ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$), mio-inositol (100 mg.L^{-1}), sacarose (30 g.L^{-1}) e AIB ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$). Os tratamentos consistiram no uso de três substratos para a indução do enraizamento: ágar ($4,2 \text{ g.L}^{-1}$); Plantmax (36 g/frasco) + ágar ($2,8 \text{ g.L}^{-1}$) e vermiculita de grânulos finos ($7,2 \text{ g/frasco}$) + ágar ($2,8 \text{ g.L}^{-1}$). Em cada frasco (250 cm^3), foram adicionados 40 ml de meio de cultura. O período de indução do enraizamento foi de 7 dias, em sala de crescimento com luz. Após a indução, as brotações foram transferidas para o meio de cultura com a concentração normal dos sais de MS, vitaminas, glicina e mio-inositol, porém isento de AIB e solidificado com 7 g.L^{-1} de ágar, para desenvolvimento das raízes adventícias.

b) Segunda fase – Metade das brotações dos dois porta-enxertos foram repicadas para meio de cultura de indução do enraizamento, com metade da concentração dos sais de MS, acrescido de vitaminas ($1,5 \text{ mg.L}^{-1}$), glicina ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$) e mio-inositol (100 mg.L^{-1}), sacarose (30 g.L^{-1}) e AIB ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$), solidificado com ágar (7 g.L^{-1}), onde foram mantidas durante 7 dias, em frascos com 250 cm^3 de capacidade. Os tratamentos consistiram no uso de três substratos para desenvolvimento das raízes adventícias: ágar (7 g.L^{-1}), Plantmax (48 g/frasco) e vermiculita de grânulos finos (14 g/frasco), nos quais foram adicionados 40 ml de meio de cultura MS, com a concentração normal dos sais e isento de AIB.

O período de desenvolvimento das raízes adventícias em ambas as fases foi de 49 dias. Na primeira etapa, durante o enraizamento *in vitro*, foi avaliado o percentual de brotações enraizadas a cada 7 dias. Após o enraizamento *in vitro*, foram avaliados o percentual de brotações enraizadas, número de raízes primárias e altura da muda ou brotação não-enraizada. Em ambas as etapas, foram utilizadas 7 brotações/frasco.

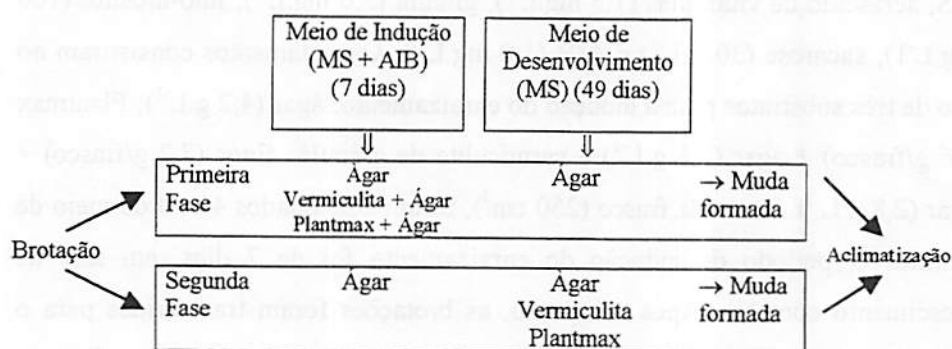


FIGURA 2.2. Representação gráfica dos tratamentos efetuados no experimento. Lavras, UFLA, 1999.

Após o período de enraizamento, as raízes das mudas ou a base das brotações foram lavadas com água destilada e tanto as brotações enraizadas quanto as não enraizadas foram repicadas para as mesmas condições de aclimatização mencionadas para o Experimento 1. Após 60 dias de aclimatização, foi realizada a avaliação final, sendo determinados a sobrevivência, altura da muda, número de raízes primárias e matéria seca da raiz e da parte aérea.

Foi adotado o delineamento experimental inteiramente ao acaso, com 4 repetições e 7 explantes por repetição. Os resultados foram comparados através do teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para as variáveis número de raízes primárias, percentual de enraizamento, altura e sobrevivência de mudas, quando tomadas periodicamente, foi adotado o esquema de parcelas subdivididas no tempo.

Experimento 3 - Substratos na aclimatização de mudas do porta-enxerto 'Marubakaido' enraizadas *in vitro*

Neste experimento, foram testados cinco substratos na aclimatização de mudas enraizadas *in vitro* do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido'. Para o enraizamento, as brotações foram colocadas em meio de cultura MS, com a metade da concentração dos sais, acrescido de vitaminas ($1,5 \text{ mg.L}^{-1}$), glicina ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$) e mio-inositol (100 mg.L^{-1}), sacarose (30 g.L^{-1}) e AIB ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$), solidificado com ágar (7 g.L^{-1}), sendo utilizadas 7 brotações/frasco de 250 cm^3 . Após 35 dias de enraizamento *in vitro*, as brotações enraizadas foram transferidas para bandejas de isopor, com 72 células de 120 cm^3 cada, nas quais foram colocados os substratos, que constituíram os tratamentos deste experimento: Plantmax, vermiculita de grânulos médios, solo (latossolo vermelho escuro) + areia média lavada (1:1 v/v), composto orgânico, preparado

a partir de esterco bovino e restos culturais de gramíneas + areia (1:1 v/v) e solo + composto orgânico + areia (2:2:1 v/v). O ambiente de aclimatização foi semelhante ao utilizado no Experimento 1.

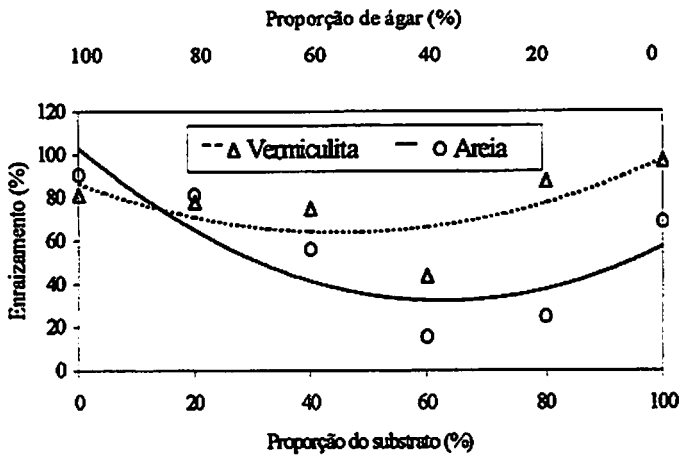
No momento da transferência para os substratos, foram avaliados a altura da muda e número de raízes primárias em quatro amostras de 5 plantas cada. Após 35 dias de aclimatização, foram avaliados a altura da muda, número de raízes primárias e matéria seca da raiz e da parte aérea.

Foi adotado o delineamento experimental inteiramente ao acaso, com 4 repetições e 8 explantes por repetição. Os resultados foram comparados através do teste de Duncan a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1 - Substratos no enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas do porta-enxerto de macieira “Marubakaido”

O percentual de brotações enraizadas *in vitro* foi afetado pelo substrato e pela proporção do substrato em relação ao ágar, sendo significativa a interação substrato x proporção (Tabela 1.A - Anexo). Conforme é demonstrado na Figura 2.3, houve efeito quadrático das proporções dos substratos tanto da vermiculita quanto da areia, sendo que os menores percentuais de enraizamento obtidos foram de 45,86 % (vermiculita) e 62,64% (areia). Isto indica que tanto o ágar na concentração integral (0% de substrato) quanto o substrato umedecido com meio líquido (100%) tendem a proporcionar os melhores resultados nesta variável. Nas proporções intermediárias, havia menos substrato e concentrações baixas de ágar em relação aos extremos (0 e 100%), de modo a dar ao meio uma consistência mais líquida e, portanto, com menor aeração, o que pode ter prejudicado o enraizamento.



Equações:

$$Y_{\text{vermiculita}} = 86,607 - 1,009 x + 0,011 x^2$$

$$r^2 = 0,5045$$

$$Y_{\text{areia}} = 100,00 - 2,255 x + 0,018 x^2$$

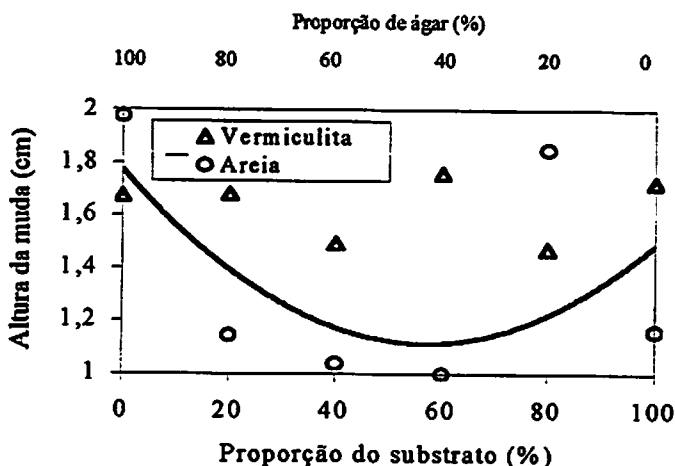
$$r^2 = 0,7377$$

FIGURA 2.3. Efeito da proporção de vermiculita ou areia, em relação ao ágar, sobre o enraizamento *in vitro* de brotações de macieira 'Marubakaido'. Lavras, UFLA, 1999.

Druart, Opatmy e De Klerk (1997) observaram que o ágar não foi necessário quando utilizada a vermiculita umedecida com água no enraizamento de brotações de macieira e mencionaram que a falta de aeração no substrato inibiu o enraizamento *in vitro*. De modo semelhante, Navatel e Bourrain (1994) observaram que a vermiculita umedecida com meio MS líquido proporcionou maior enraizamento, em quantidade e qualidade, de brotações de macieira e noqueira. Observa-se, ainda, que o efeito das proporções de areia foi mais marcante do que as proporções de vermiculita. Embora proporcione suficiente porosidade, a areia, pela sua elevada densidade, constitui-se em barreira para a emissão e desenvolvimento de raízes, diminuindo o percentual de brotações enraizadas.

Não foi observado enraizamento algum e a sobrevivência de brotações foi nula quando utilizado o Plantmax, em quaisquer das proporções testadas, exceto com o ágar na concentração integral, cujo resultado foi semelhante ao testado para os outros substratos (areia e vermiculita). Quanto maior a proporção deste substrato, maior a incidência de apodrecimento na base das brotações.

A altura da muda e o número de raízes primárias após o enraizamento *in vitro* foram afetados pelo substrato e pela proporção, sendo significativa a interação entre os fatores estudados (Tabela 1.A). Para a altura das mudas (Figura 2.4), somente quando utilizada a areia a regressão quadrática foi significativa, sendo o menor valor encontrado com 56,93% (areia).



Equação e Média:

Média Vermiculita = 1,64 cm

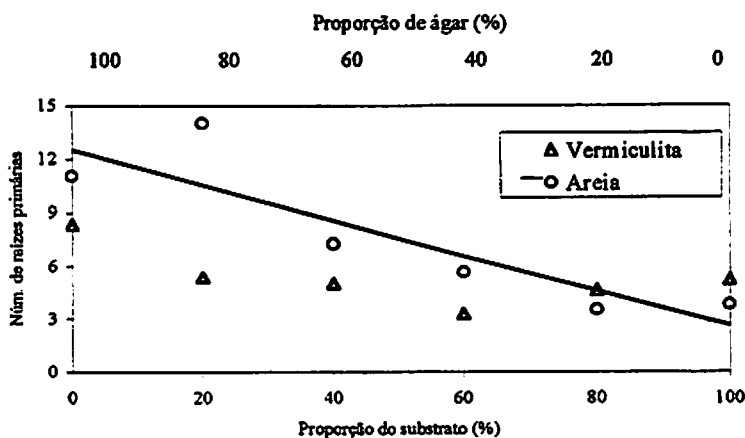
$Y_{\text{Areia}} = 1,775 - 0,023 x + 0,000202 x^2$

$r^2 = 0,3223$

FIGURA 2.4. Efeito da proporção de areia ou vermiculita, em relação ao ágar, sobre a altura de mudas de macieira 'Marubakaido' após o enraizamento *in vitro*. Lavras, UFLA, 1999.

Com o incremento das proporções de areia, houve aumento do impedimento físico ao desenvolvimento dos explantes, prejudicando a altura das mudas, até 60% do substrato. Como esse impedimento foi menor quando utilizada a vermiculita, não houve efeito das proporções sobre esta variável. Navatel e Bourrain (1994) obtiveram maior crescimento apical em mudas de macieira e noqueira micropropagadas durante a aclimatização quando o enraizamento ocorreu em vermiculita umedecida com meio MS líquido.

Para o número de raízes primárias (Figura 2.5), somente quando utilizada a areia, houve efeito linear decrescente com o aumento da proporção do substrato, ou seja, utilizando-se apenas o meio solidificado com ágar, mais raízes primárias foram emitidas.



Equação e Média:

Média _{Vermiculita} = 5,31 raízes/muda

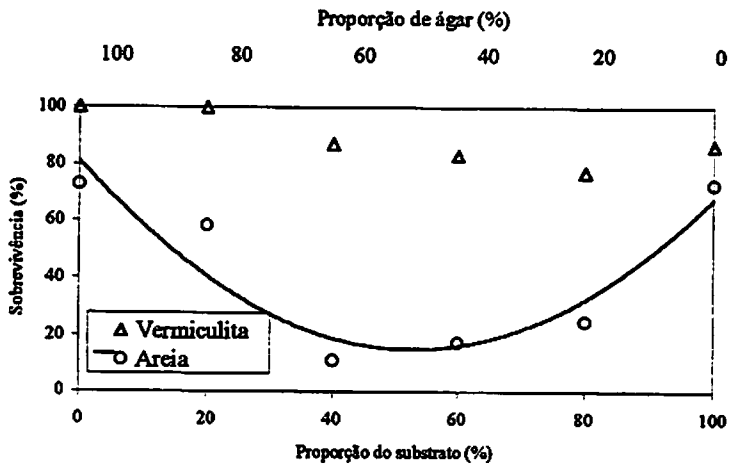
$Y_{\text{Altura}} = 12,502 - 0,099 x$

$r^2 = 0,7802$

FIGURA 2.5. Efeito da proporção de areia ou vermiculita, em relação ao ágar, sobre o número de raízes primárias de mudas de macieira 'Marubakaido' após o enraizamento *in vitro*. Lavras, UFLA, 1999.

A alteração do substrato em substituição ao ágar, portanto, não foi eficiente para aumentar o número de raízes primárias emitidas das brotações. Assim como observado com a altura das mudas, o aumento da proporção de vermiculita, em relação ao ágar, não afetou o número de raízes primárias. O número de raízes é importante para a fixação das mudas durante a aclimatização, embora sua funcionalidade seja discutível quando estas são emitidas em meio solidificado com ágar (Pierik, 1988).

Após 35 dias de aclimatização, foi efetuada a avaliação da sobrevivência e do crescimento das mudas. O percentual de mudas sobreviventes foi afetado pelos fatores estudados, sendo significativa a interação entre eles (Tabela 2.A). Observa-se, pela Figura 2.6, que apenas com a areia houve ajuste a uma regressão quadrática significativa.



Equação e Média:

Média $_{vermiculita} = 89,10 \%$

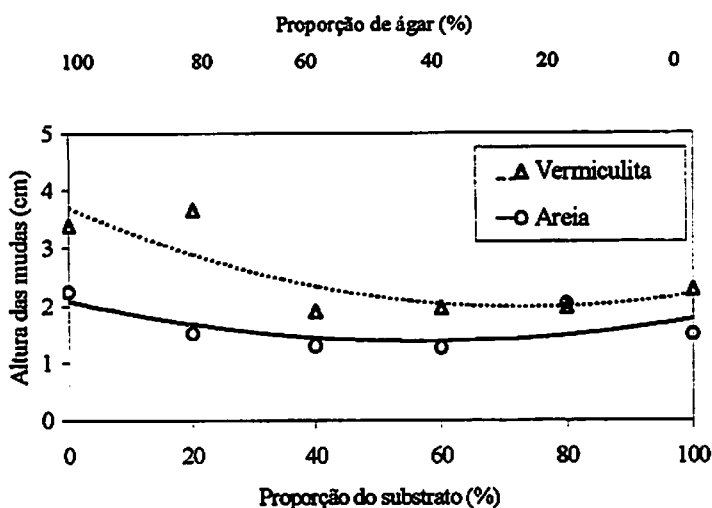
$Y_{areia} = 81,273 - 2,504 x + 0,0237 x^2$

$r^2 = 0,8687$

FIGURA 2.6. Efeito da proporção de vermiculita ou areia, em relação ao ágar, sobre o percentual de mudas sobreviventes de macieira 'Marubakaido' após 35 dias de aclimatização. Lavras, UFLA, 1999.

A média para as diferentes proporções de vermiculita foi de 89,10% de sobrevivência, superior ao que foi observado com a areia. Os menores percentuais de sobrevivência foram encontrados nas proporções de 52,83% (areia) e 80% (vermiculita). Navatel e Bourrain (1994), trabalhando com macieira e noqueira, obtiveram maior sobrevivência das mudas na aclimatização com vermiculita umedecida com meio MS (90%), em relação ao ágar (10-30%).

A altura das mudas (Figura 2.7) e o número de raízes primárias (Figura 2.8) após a aclimatização apresentaram regressões quadráticas significativas para a vermiculita e a areia. Observou-se que a tendência foi semelhante à da altura e número de raízes após o enraizamento “in vitro”, ou seja, o efeito da proporção manteve-se após a aclimatização.



Equações:

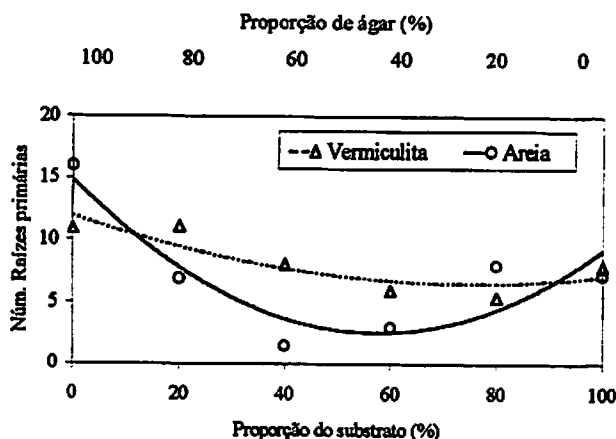
$$Y_{\text{vermiculita}} = 3,709 - 0,047 x + 0,00032 x^2$$

$$r^2 = 0,7143$$

$$Y_{\text{areia}} = 2,082 - 0,0248 x + 0,00021 x^2$$

$$r^2 = 0,4423$$

FIGURA 2.7. Efeito da proporção de vermiculita ou areia, em relação ao ágar, sobre a altura das mudas de macieira ‘Marubakaido’ após a aclimatização. Lavras, UFLA, 1999.



Equações:

$$Y_{\text{vermiculita}} = 11,898 - 0,143 x + 0,0009 x^2$$

$$r^2 = 0,7730$$

$$Y_{\text{areia}} = 14,854 - 0,427 x + 0,004 x^2$$

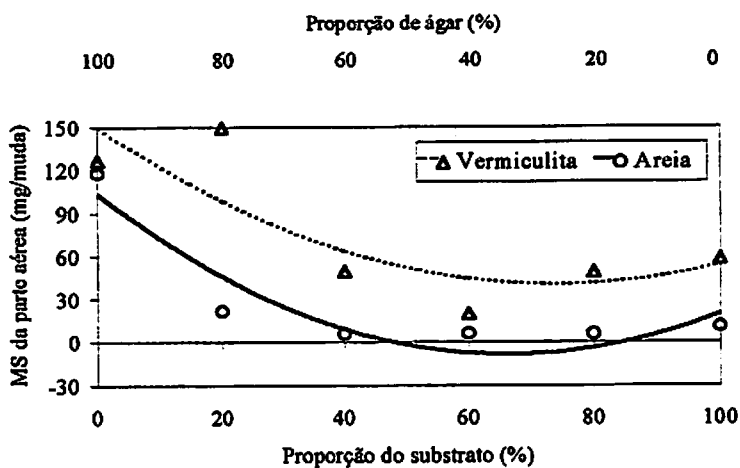
$$r^2 = 0,8117$$

FIGURA 2.8. Efeito da proporção de vermiculita ou areia, em relação ao ágar, sobre o número de raízes primárias em mudas de macieira 'Marubakaido' após a aclimatização. Lavras, UFLA, 1999.

Logo, pode-se afirmar que uma boa condição de enraizamento e desenvolvimento da muda *in vitro* tem consequências sobre o crescimento da muda durante a aclimatização. Os menores valores de altura das mudas foram observados nas concentrações de 73,44% (vermiculita) e 59,05% (areia). Os menores valores de número de raízes primárias foram obtidos com 79,44% (vermiculita) e 53,38% (areia). Observou-se, ainda, que ao serem utilizadas proporções de vermiculita entre 20 a 60%, os resultados foram superiores em relação às mesmas proporções de areia.

Com relação à matéria seca da parte aérea, houve efeito dos fatores estudados e interação significativa entre eles (Tabela 2.A). Para ambos os substratos, ocorreram ajustes a regressões quadráticas significativas, obtendo-se os maiores valores com proporções de 0 a 20% dos substratos, decrescendo até 70% (vermiculita) e 65,75% (areia) (Figura 2.9).

Este resultado está de acordo com os demais parâmetros do crescimento observados anteriormente. O mesmo comportamento foi observado com a matéria seca da raiz (Figura 2.10), sendo que os menores valores foram obtidos com 62,81% (vermiculita) e 68,44% (areia). Isto evidencia o crescimento equivalente da raiz e da parte aérea, independente da proporção estudada. É importante considerar que novamente, a vermiculita proporcionou resultados superiores quanto à acumulação de matéria seca das mudas, em relação à areia.



Equações:

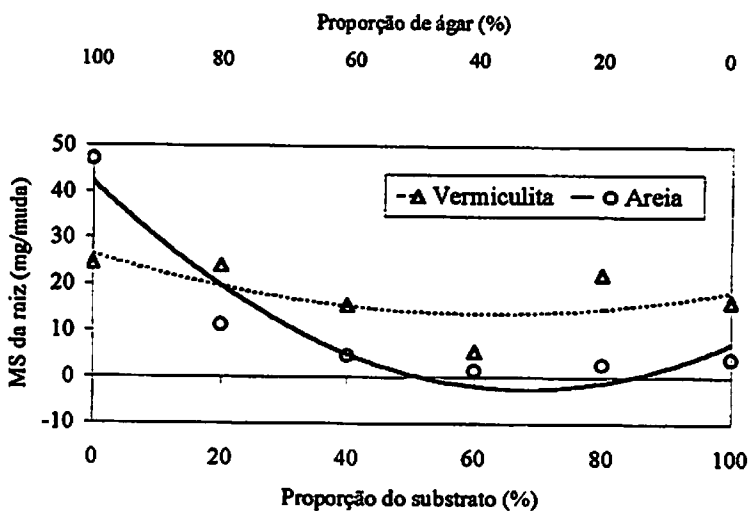
$$Y_{\text{vermiculita}} = 12,582 - 0,182 x + 0,0013 x^2$$

$$r^2 = 0,6810$$

$$Y_{\text{areia}} = 10,164 - 0,263 x + 0,0020 x^2$$

$$r^2 = 0,9468$$

FIGURA 2.9. Efeito da proporção de vermiculita ou areia, em relação ao ágar, sobre a matéria seca da parte aérea de mudas de macieira 'Marubakaido'. Lavras, UFLA, 1999.



Equações:

$$Y_{\text{vermiculita}} = 26,195 - 0,402 x + 0,0032 x^2$$

$$r^2 = 0,4135$$

$$Y_{\text{areia}} = 42,153 - 1,314 x + 0,0096 x^2$$

$$r^2 = 0,9127$$

FIGURA 2.10. Efeito da proporção de vermiculita ou areia, em relação ao ágar, sobre a matéria seca da raiz de mudas de macieira 'Marubakaido' após a aclimatização. Lavras, UFLA, 1999.

Constataram-se, em função dos tratamentos, modificações nas características das raízes. Utilizando-se 40% ou mais de vermiculita ou areia, houve intensa formação de pêlos radiculares, sendo que, quanto maior a proporção do substrato em relação ao ágar, maior a formação de pêlos. Tal resultado está diretamente relacionado à aeração proporcionada pelo substrato (Leite, 1995). Esta característica é desejável, pois favorece a qualidade do sistema radicular.

A formação de calo diminuiu em quantidade e intensidade à medida que foi aumentada a proporção de substrato, de modo que, somente quando utilizados 100% (sem ágar), não houve formação de calo (dados não apresentados). Este resultado, provavelmente, é função da menor disponibilidade de auxina ao explante quando aumentada a proporção de vermiculita ou de areia,

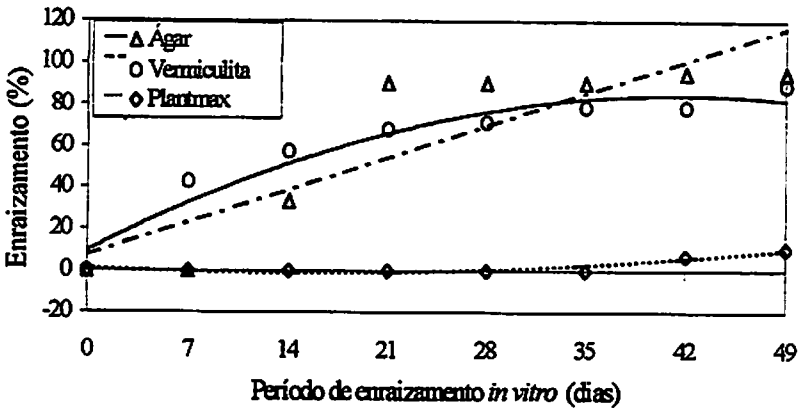
visto que a permanência em meio de cultura com AIB durante longo período pode favorecer a formação de calo. Além disso, as raízes formadas nas proporções de 0 e 20% de vermiculita ou areia apresentaram raízes mais longas e menos ramificadas.

De modo geral, os melhores resultados, após o enraizamento *in vitro* e após a aclimatização, foram obtidos com o meio solidificado com ágar e com as proporções de 20 e 100%, especialmente de vermiculita. Proporções intermediárias, entre 40 e 80%, não foram eficientes. Isto indica que são promissoras as técnicas de enraizamento *in vitro* e aclimatização utilizando-se como substratos a vermiculita ou a areia, umedecidas com meio de cultura líquido, ou mesmo proporções de 20% do substrato, umedecido com 80% da concentração convencional de ágar. Desta forma, é possível reduzir a utilização do ágar no meio de cultura como suporte físico para os explantes, pois segundo Leite (1995), o ágar é o componente mais caro do meio para cultura de tecidos, devido à grande quantidade utilizada para o preparo.

Porém, como pode ser observado nas figuras anteriores, houve tendência da proporção 0% de substrato (ágar na concentração integral) resultar em valores das variáveis analisadas superiores às do substrato umedecido com meio de cultura líquido. Isso pode ser explicado pela maior facilidade de acesso aos nutrientes e pela condição física uniforme em todo o meio de cultura, diferente da areia e da vermiculita, que poderiam constituir barreiras à expansão radicular, acesso à água e nutrientes e, por consequência, ao crescimento da parte aérea e do sistema radicular das mudas.

Experimento 2 – Substratos na indução e desenvolvimento de raízes adventícias em brotações de macieira ‘Marubakaido’ e ‘M-26’

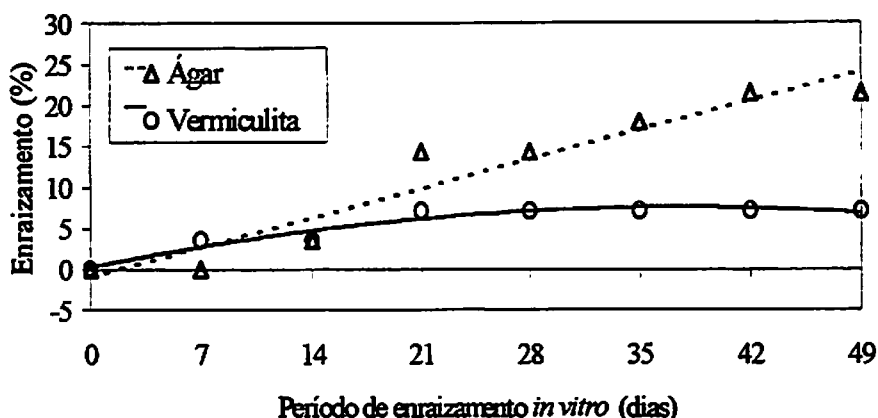
Sob efeito dos substratos de indução do enraizamento *in vitro* (primeira fase), o percentual de brotações enraizadas evoluiu ao longo do tempo de forma diferenciada entre os tratamentos (porta-enxertos e substratos), tendo ocorrido interação significativa entre os fatores tempo, porta-enxerto e substrato (Tabela 3.A). Em ‘Marubakaido’, houve aumento linear do percentual de enraizamento quando este foi induzido em ágar. Quando a indução ocorreu em vermiculita ou Plantmax, esta evolução foi quadrática (Figura 2.11).



Equações:	
$Y_{\text{Ágar}} = 7,142 + 2,235 x$	$r^2 = 0,7818$
$Y_{\text{Vermiculita}} = 9,525 + 3,608 x - 0,0434 x^2$	$r^2 = 0,9364$
$Y_{\text{Plantmax}} = 1,042 - 0,301 x + 0,0100 x^2$	$r^2 = 0,8981$

FIGURA 2.11. Evolução do percentual de brotações de macieira ‘Marubakaido’ enraizadas *in vitro*, sob efeito de diferentes substratos para indução do enraizamento. Lavras, UFLA, 1999.

Para o porta-enxerto 'M-26', observou-se o mesmo comportamento, exceto quando utilizado o Plantmax como substrato para indução, no qual não houve formação de raízes adventícias durante o período de enraizamento *in vitro* (Figura 2.12). Estes resultados podem ser atribuídos ao fato de que, quando utilizada a vermiculita, há maior aeração, necessária ao fornecimento de oxigênio para a respiração, proporcionando resposta mais rápida em emissão de raízes após a inoculação.



Equações

$$Y_{\text{Ágar}} = -0,893 + 0,510 x$$

$$r^2 = 0,9231$$

$$Y_{\text{Vermiculita}} = 0,298 + 0,389 x - 0,0052 x^2$$

$$r^2 = 0,9345$$

FIGURA 2.12. Evolução do percentual de brotações de macieira 'M 26' enraizadas *in vitro*, sob efeito de dois substratos para indução do enraizamento. Lavras, UFLA, 1999.

Para o percentual de brotações enraizadas, avaliado após 49 dias de permanência das brotações em meio para desenvolvimento das raízes adventícias, foi observada interação significativa entre os fatores porta-enxerto e substrato para indução (Tabelas 4.A e 2.1). Nos substratos ágar e vermiculita, o porta-enxerto 'Marubakaido' apresentou percentuais de enraizamento significativamente superiores ao porta-enxerto 'M-26'. A facilidade de enraizamento deste porta-enxerto é também apontada por Jones e Aldwinckle (1991).

TABELA 2.1. Percentual de brotações enraizadas, número de raízes primárias e altura da muda ou brotação de dois porta-enxertos de macieira após 49 dias de enraizamento *in vitro* sob efeito de três substratos para indução do enraizamento. Lavras, UFLA, 1999.

Substrato para indução	Enraizamento (%)		Núm. de rzs. Prim.		Altura da muda (cm)	
	Maruba- kaido	M-26	Maruba- kaido	M-26	Maruba- kaido	M-26
Agar	95,24 aA	21,43 aB	6,37 aA	1,25 aB	1,67 aA	1,18 aB
Vermiculita	89,28 aA	7,15 Ab	3,31 bA	1,25 aB	1,18 aA	0,45 bB
Plantmax	10,72 bA	0,00 Aa	0,50 cA	0,00 aA	0,72 cA	0,43 bA

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Não houve diferença entre os porta-enxertos apenas quando utilizado o Plantmax, pois neste caso ocorreram percentuais muito baixos de enraizamento nos dois porta-enxertos. Houve efeito do substrato para indução do enraizamento apenas para o porta-enxerto 'Marubakaido', sendo o Plantmax significativamente inferior ao ágar e a vermiculita; entre estes substratos, não houve diferença significativa. Entretanto, com o porta-enxerto 'M-26', nenhum dos substratos foi eficiente na indução do enraizamento, não havendo diferença significativa entre os mesmos, embora a indução em ágar tenha proporcionado 21,43% de enraizamento. O número de raízes primárias foi afetado pelos

tratamentos de forma semelhante à variável enraizamento, porém, neste caso, o número de raízes emitidas nas brotações de 'Marubakaido' foi significativamente superior quando utilizado o ágar como substrato para indução. Em ambos os porta-enxertos, o ágar proporcionou o maior crescimento em altura da muda ou brotação, não havendo diferença entre os porta-enxertos apenas quando utilizado o Plantmax na indução do enraizamento.

Simões (1988), trabalhando com laranja 'Pera', observou que o meio de cultura condicionou o padrão morfológico das raízes. Segundo o mesmo autor, as raízes crescidas em ágar, ao continuarem o seu desenvolvimento em vermiculita, desenvolveram estrutura semelhante à de raízes oriundas de sementes, possuindo pêlos absorventes, córtex mais compacto e com espaços intercelulares menores.

Após 49 dias de aclimatização (Tabela 2.2), observou-se que a sobrevivência foi afetada pelos tratamentos apenas no porta-enxerto Marubakaido, obtendo-se o maior percentual de plantas vivas quando o enraizamento foi induzido em Plantmax e em vermiculita. Somente com Plantmax a sobrevivência foi maior em 'Marubakaido' do que em 'M-26'. Embora quando utilizado o Plantmax como substrato de indução o enraizamento *in vitro* tenha sido nulo ('M-26') ou próximo de zero ('Marubakaido'), verifica-se a superioridade deste substrato na sobrevivência das mudas. Isto ocorreu devido ao fato de que foram repicadas todas as brotações mantidas *in vitro*, independente da formação de raízes, a qual ocorreu somente após as brotações terem sido levadas para a aclimatização. Face a este resultado, pode-se deduzir que o enraizamento poderia ter ocorrido até mesmo *ex vitro*, após os 7 dias de indução em Plantmax.

TABELA 2.2. Sobrevivência, altura da muda e número de raízes primárias de dois porta-enxertos de macieira, após 49 dias de aclimatização, sob efeito de três substratos para indução do enraizamento. Lavras, UFLA, 1999.

Substrato para indução	Sobrevivência (%)		Altura da muda (cm)		Núm. Rzs. Prim.	
	Maruba- kaido	M-26	Maruba- kaido	M-26	Maruba- kaido	M-26
Ágar	38,10 bA	39,28 aA	2,63 aA	1,61 aA	15,08 aA	3,88 aB
Vermiculita	50,00 abA	28,57 aA	1,94 aA	1,69 aA	8,00 bA	3,17 aA
Plantmax	78,57 aA	25,00 aB	1,62 aA	1,30 aA	6,25 bA	2,25 aA

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

A altura das mudas não foi afetada por qualquer um dos fatores estudados (Tabela 5.A), indicando que o efeito do substrato sobre a indução do enraizamento *in vitro* manifesta-se durante a emissão de raízes e nas fases iniciais da aclimatização. Com o passar do tempo, entretanto, este efeito não permanece, a ponto de não serem observadas diferenças significativas. Cabe ressaltar que o tempo de aclimatização (49 dias) foi relativamente longo, o que permitiu a uniformização da altura das mudas provenientes de diferentes tratamentos. O número de raízes primárias foi afetado pelo substrato de indução do enraizamento, sendo as médias obtidas com 'M-26' inferiores aos de 'Marubakaido', o que também está associado à facilidade do enraizamento no segundo porta-enxerto, como já havia sido observado na fase anterior à aclimatização. Em 'Marubakaido', o número de raízes primárias foi significativamente superior quando o enraizamento foi induzido em meio solidificado com ágar. Em 'M-26', não houve efeito do substrato.

Não houve efeito dos fatores estudados sobre a matéria seca das plantas após a aclimatização. Embora outras variáveis tenham sido afetadas, esta

diferença não foi manifestada sobre a acumulação de matéria seca, das raízes ou da parte aérea (Tabela 2.3).

TABELA 2.3. Matéria seca das raízes e da parte aérea de mudas de dois porta-enxertos de macieira, após 49 dias de aclimatização, sob efeito de três substratos para indução do enraizamento. Lavras, UFLA, 1999.

Substrato para Indução	Matéria seca das raízes (mg/muda)		Matéria seca da parte aérea (mg/muda)	
	Marubakaido	M-26	Marubakaido	M-26
Ágar	61,4 aA	23,1 aA	96,2 aA	75,6 aA
Vermiculita	66,4 aA	67,5 aA	95,3 aA	73,6 aA
Plantmax	10,4 aA	8,8 aA	41,2 aA	34,7 aA

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Ao ser avaliado o efeito dos mesmos substratos durante a fase de desenvolvimento das raízes, após a indução por 7 dias em meio solidificado com ágar (segunda fase), observou-se que a altura das brotações (enraizadas e não-enraizadas), ao final de 49 dias de enraizamento, foi afetada pelos fatores substrato e porta-enxerto, sendo a interação porta-enxerto x substrato não-significativa (Tabela 6.A). Nas Tabelas 2.4 e 2.5, são apresentados os resultados para as variáveis mencionadas.

Nos três substratos, a altura das mudas do porta-enxerto 'M-26' foi significativamente inferior à das mudas de 'Marubakaido'. Além disso, o ágar proporcionou o maior crescimento em altura das mudas em relação aos outros substratos, que não diferiram entre si. Possivelmente, a maior facilidade de acesso dos nutrientes ao explante no meio solidificado com ágar foi o principal fator que contribuiu para este resultado.

TABELA 2.4. Altura e número de raízes primárias de mudas de dois porta-enxertos de macieira, após 49 dias de enraizamento, sob efeito de três substratos para desenvolvimento das raízes adventícias. Lavras, UFLA, 1999.

Substrato para Desenvolvimento	Altura da muda (cm)		Número de raízes primárias	
	Marubakaido	M-26	Marubakaido	M-26
Ágar	2,51 Aa	2,01 aB	9,91 aA	3,66 aB
Vermiculita	2,05 Ba	1,09 bB	0,20 cA	0,00 bA
Plantmax	1,77 bA	1,18 bB	2,00 Bb	4,02 aA

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

TABELA 2.5. Enraizamento e morte de brotações de dois porta-enxertos de macieira, após 49 dias de enraizamento, sob efeito de três substratos para desenvolvimento das raízes adventícias. Lavras, UFLA, 1999.

Substrato para desenvolvimento	Enraizamento (%)		Morte de brotações (%)	
	Marubakaido	M-26	Marubakaido	M-26
Ágar	85,71 Aa	72,14 aA	0,00 bA	0,00 aA
Vermiculita	5,71 Ba	0,00 aA	62,86 aA	2,86 aB
Plantmax	28,57 bB	71,43 aA	14,29 bA	2,86 aB

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Quando utilizado o ágar como substrato para o enraizamento, o número de raízes primárias foi superior em 'Marubakaido', ocorrendo o inverso quando utilizado o Plantmax. Apenas quando utilizada a vermiculita, não houve diferença entre os porta-enxertos, devido aos baixos valores obtidos com este substrato.

O percentual de enraizamento de brotações só foi afetado pelo porta-enxerto quando se utilizou o Plantmax, em que o enraizamento de

'Marubakaido' foi superior ao de 'M-26'. Observou-se, ainda, que em 'Marubakaido', o ágar proporcionou o maior percentual de enraizamento, enquanto que, em 'M-26', tanto o ágar quanto o Plantmax foram eficientes como substratos para desenvolvimento *in vitro* das raízes adventícias. Segundo George (1993), o enraizamento *in vitro* em substratos porosos, como areia, perlita, espuma e outros, também facilita a repicagem, pois as mudas podem ser transferidas do frasco de cultura com poucas perturbações nas raízes. Apesar disso, a vermiculita foi o substrato menos eficiente, provavelmente devido aos grandes espaços intercelulares existentes neste material, o que dificulta a aderência do explante e causa a sua morte. Quando o desenvolvimento das raízes ocorreu em vermiculita e em Plantmax, formaram-se raízes mais curtas e com maior densidade de pêlos radiculares, devido à maior aeração nestes substratos, em relação ao meio solidificado com ágar.

O percentual de brotações mortas somente diferiu entre os porta-enxertos quando empregada a vermiculita, sendo que este valor foi superior em 'Marubakaido'. Isto ocorreu porque as brotações do 'M-26' possuem composição morfológica diferente das do 'Marubakaido', com brotações mais espessas e com maior teor relativo de água e reservas, o que, provavelmente, permitiu a sobrevivência da brotação mesmo sem o seu enraizamento. Em outras palavras, as brotações de 'Marubakaido' enraízam com maior facilidade, porém as de 'M-26' resistem melhor ao dessecação e à morte antes do enraizamento.

A presença de espaços porosos no substrato, embora favoreça a aeração e o enraizamento *in vitro*, também pode prejudicá-lo, o que pode ser comprovado quando utilizado o ágar, condição em que nenhuma brotação morreu. Convém ressaltar que a morte das brotações somente foi observada quando não houve o seu enraizamento.

Comparando-se esses resultados com aqueles obtidos na primeira fase do experimento, no qual a vermiculita proporcionou o maior percentual de

enraizamento *in vitro*, pode-se afirmar que a aeração parece ser mais importante na fase de indução do que propriamente durante o desenvolvimento das raízes adventícias, embora, como mencionado por Hutchinson (1984), haja relação direta entre a aeração do meio e o desenvolvimento das raízes nas brotações.

Conforme é demonstrado na Tabela 2.6, ao final do período de aclimatização, a sobrevivência foi afetada somente pelo substrato, sendo que, quando utilizado o ágar e o Plantmax, a sobrevivência foi superior em relação à vermiculita. De modo semelhante, a altura das mudas foi afetada apenas pelo substrato (Tabela 7.A), obtendo-se, em 'Marubakaido', as maiores alturas em ágar e em Plantmax. Com o porta-enxerto 'M-26', não houve diferença entre substratos. O número de raízes primárias foi afetado pelos fatores estudados, sendo a interação entre eles significativa (Tabela 7.A). Também com estes substratos, obteve-se maior número de raízes primárias em 'M-26', porém não houve diferença entre os porta-enxertos quando o enraizamento *in vitro* ocorreu em vermiculita.

TABELA 2.6. Sobrevivência, altura de mudas e número de raízes primárias de dois porta-enxertos de macieira após 49 dias de aclimatização sob efeito de três substratos para desenvolvimento das raízes adventícias. Lavras, UFLA, 1999.

Substrato para indução	Sobrevivência (%)		Altura da muda (cm)		Núm. Rzs. Prim.	
	Maruba- kaido	M-26	Maruba- kaido	M-26	Maruba- kaido	M-26
Ágar	41,57 aA	44,64 aA	2,64 aA	2,27 aA	14,96 aB	25,20 aA
Vermiculita	8,33 bA	14,29 bA	1,50 bA	1,72 aA	2,20 bA	8,80 bA
Plantmax	32,14 abA	37,62 abA	2,32 aA	1,88 aA	11,32 aB	33,84 aA

Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Em ambos os porta-enxertos, os maiores valores para as variáveis analisadas após a aclimatização, de modo geral foram obtidos com ágar e Plantmax como substratos para o desenvolvimento *in vitro* das raízes. Os resultados obtidos neste experimento estão em acordo com os obtidos por Hutchinson (1984) que, trabalhando com brotações de macieira ‘Northern Spy’, nas fases de enraizamento e aclimatização, obtiveram bons resultados com areia, perlita e ágar, o que não ocorreu quando foram utilizadas a celulose e a vermiculita. Já Aldrufeu (1987) sugeriu, para o enraizamento “in vitro” de *Pelargonium zonale*, o uso da celulose, perlita e vermiculita.

A matéria seca, das raízes e da parte aérea, foi afetada pelos fatores estudados e a interação entre eles foi significativa em ambas as variáveis (Tabelas 7.A e 2.7). Houve diferença entre porta-enxertos quando utilizado o Plantmax (MS das raízes e MS da parte aérea), bem como com a vermiculita (MS da parte aérea). Em ‘Marubakaido’, o ágar foi o substrato que proporcionou o melhor resultado, enquanto em ‘M-26’, os melhores resultados foram obtidos em ágar e Plantmax.

TABELA 2.7. Matéria seca das raízes e da parte aérea de mudas de dois porta-enxertos de macieira, após 49 dias de aclimatização, sob efeito de três substratos para indução do enraizamento. Lavras, UFLA, 1999.

Substrato para indução	Matéria seca das raízes (g/muda)		Matéria seca da parte aérea (g/muda)	
	Marubakaido	M-26	Marubakaido	M-26
Ágar	0,0642 aA	0,0737 aA	0,0747 aA	0,0778 aA
Vermiculita	0,0040 bA	0,0174 bA	0,0047 bB	0,0265 bA
Plantmax	0,0183 bB	0,0718 aA	0,0273 bB	0,0835 aA

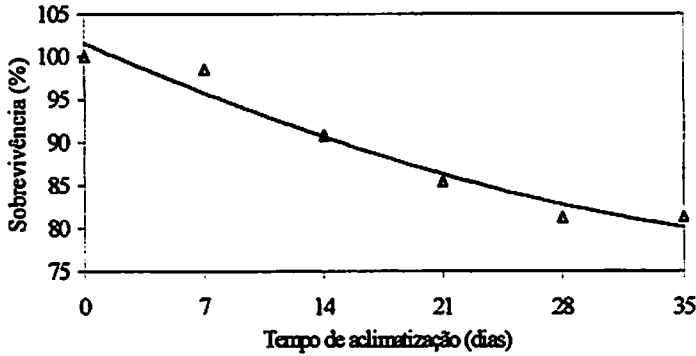
Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

O bom desempenho do Plantmax durante a aclimatização deve-se ao fato de que tanto o enraizamento quanto a aclimatização ocorreram no mesmo substrato, não havendo alteração quando a este fator envolvido na aclimatização. Conforme observou Hutchinson (1984), utilizando-se a areia como meio de enraizamento *in vitro*, o aumento no número e comprimento de raízes pode ser devido à aeração do meio, pois há relação direta entre este fator e o enraizamento das brotações. Além disso, de acordo com Apter, McWilliams e Davies Jr. (1993), raízes emitidas no ágar em geral têm poucos ou nenhum pêlo radicular, e aqueles que existem morrem após o transplante, causando a paralisação do crescimento. Esses resultados são um indicativo de que o Plantmax pode ser um substituto eficiente para o ágar durante o desenvolvimento *in vitro* das raízes.

Experimento 3 - Substratos na aclimatização de mudas do porta-enxerto 'Marubakaido' enraizadas *in vitro*

A sobrevivência das mudas, durante o processo de aclimatização em diferentes substratos, não sofreu influência dos tratamentos (Tabela 8.A), havendo um decréscimo quadrático no número de plantas vivas em função do tempo devido ao estresse sofrido com a transferência das mudas do laboratório para a casa de vegetação (Figura 2.13).

Entre 7 e 21 dias de aclimatização, a sobrevivência caiu abruptamente até cerca de 80%, tendendo à estabilização a partir dos 28 dias. Esta tendência está de acordo com o que é citado por Marin e Gella (1988), que observaram que esta queda drástica ocorre em torno dos 14 dias após o início da aclimatização e mencionaram que este fenômeno deve-se à inanição das plantas causada pela baixa eficiência na troca do metabolismo heterotrófico/mixotrófico (com dependência total ou parcial de uma fonte externa de carbono) para o metabolismo heterotrófico do carbono (com dependência total da fotossíntese).

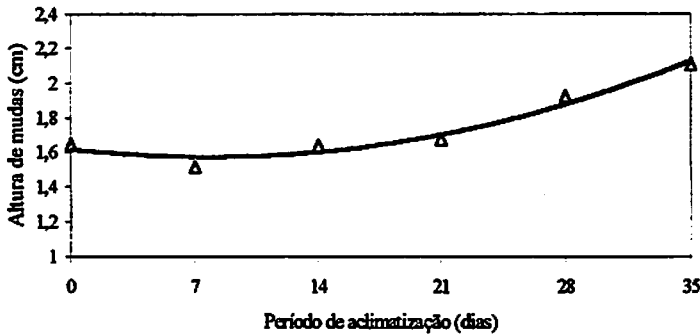


Equação:

$$Y = 101,59 - 0,8881 x - 0,0078 x^2 \quad r^2 = 0,9571$$

FIGURA 2.13. Evolução do percentual de mudas de macieira ‘Marubakaido’ sobreviventes em função do tempo de aclimatização. Lavras, UFLA, 1999.

A altura das mudas, durante os 35 dias de aclimatização, sofreu influência do tempo e dos substratos (Tabela 8.A). Na Figura 2.14, é mostrada a tendência da altura das mudas ao longo do período de aclimatização.



Equação:

$$Y = 1,6191 - 0,0116 x + 0,0007 x^2 \quad r^2 = 0,9655$$

FIGURA 2.14. Efeito do tempo no crescimento em altura de mudas de macieira ‘Marubakaido’ durante a aclimatização. Médias de cinco substratos. Lavras, UFLA, 1999.

Verificou-se que a interação tempo x substrato não foi significativa, havendo ajuste a uma equação de segundo grau, independente do substrato em que as mudas foram aclimatizadas (Tabela 8.A).

Após a aclimatização (período de 35 dias), conforme demonstrado na Tabela 2.8, observou-se que a altura e a matéria seca da parte aérea das mudas não foram afetadas pelos tratamentos, mas somente as variáveis relativas ao sistema radicular (número de raízes primárias e matéria seca da raiz) (Tabela 9.A).

TABELA 2.8. Efeito do substrato sobre a altura, número de raízes primárias e matéria seca (MS) da parte aérea e das raízes aos 35 dias de aclimatização de mudas do porta-enxerto 'Marubakaido'. Lavras, UFLA, 1999.

Substrato	Altura (cm)	Núm. raízes primárias	MS da Parte Aérea (g/muda)	MS das Raízes (g/muda)
Plantmax	2,13 a	13,10 a	0,0525 a	0,021 a
Vermiculita	2,23 a	9,48 b	0,0427 a	0,014 b
Comp.Org.+ Areia	2,23 a	11,28 ab	0,0409 a	0,018 ab
Comp.Org.+Solo+Areia	1,93 a	12,45 ab	0,0384 a	0,017 ab
Solo + Areia	1,98 a	13,73 a	0,0425 a	0,017 ab

Médias seguidas de mesma letra, dentro de cada porta-enxerto, não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Hartmann, Kester e Davies (1990) mencionam que os principais efeitos dos substratos são manifestados sobre as raízes, podendo acarretar algumas influências sobre o crescimento da parte aérea. No caso deste experimento, é provável que o tempo de aclimatização não tenha sido suficiente para que o efeito sobre as raízes afetasse a parte aérea em função dos tratamentos.

Quanto ao número de raízes primárias, somente houve diferença significativa dos tratamentos Plantmax e Solo+Areia em relação à vermiculita. Quando foi utilizada a mistura Solo+Areia, o número de raízes primárias apresentou incremento de 48,4% em relação ao valor inicial antes da aclimatização (9,25 raízes primárias/muda), ao passo que, com a vermiculita, este incremento foi de apenas 2,5%. A vermiculita apresenta baixa agregação com as raízes, o que afetou negativamente o crescimento das mudas tanto da parte aérea quanto das raízes.

Para a matéria seca das raízes, houve diferença significativa apenas entre os substratos Plantmax e Vermiculita. O substrato exerce grande influência na arquitetura do sistema radicular, sendo de grande importância a sua aeração e aderência às raízes. Segundo Gislerod (1982) e Hartmann, Kester e Davies (1990), o substrato deve ter boa capacidade de retenção de água, volume ótimo de espaços porosos preenchidos por gases e adequada taxa de difusão de oxigênio necessário à respiração das raízes. O solo contribuiu com uma boa agregação às raízes e retenção de água, ao passo que a areia apresenta excelente drenagem, sendo utilizada com frequência como condicionador físico do substrato. Segundo Hartmann, Kester e Davies (1990), o crescimento das raízes pode ser prejudicado pela deficiência de oxigênio no substrato, podendo resultar na morte do sistema radicular.

De modo geral, o Plantmax foi o substrato que proporcionou os melhores resultados, seguido da mistura de solo + areia embora para algumas variáveis não tenha havido diferença significativa entre os substratos. O bom desempenho deste substrato comercial pode ser atribuído à boa agregação com as raízes, formando torrões, à disponibilidade de nutrientes e à adequada drenagem sem que houvesse compactação. A superioridade do Plantmax como substrato também foi comprovada por Carvalho et al. (1997), em trabalho com cafeeiro. Scheffer (1993), entretanto, avaliando a influência do substrato na

fisiologia de plantas de morango micropropagadas durante a adaptação pré-campo, obteve melhor resultado para matéria seca da folha e matéria seca da raiz com o uso do substrato “Composto” em relação ao substrato “Comercial”. Normah, Nor-Azza e Aliudin (1995), trabalhando com a aclimatização de mangostão, observaram percentuais de sobrevivência entre 92 a 98%, sendo as maiores alturas de plantas obtidas com areia+solo e areia+solo+material orgânico. Com este último substrato, foi obtida a maior sobrevivência.

Considerações gerais

O meio de sustentação durante o cultivo *in vitro* desempenha papel importante no enraizamento. Esta afirmação é ratificada pelos resultados obtidos nos experimentos deste trabalho, nas etapas de indução do enraizamento, desenvolvimento das raízes adventícias e aclimatização das mudas. Quando o substrato influenciou o enraizamento *in vitro*, observou-se que as características das raízes adventícias também tiveram efeito sobre o crescimento das mudas durante a aclimatização, o que demonstra a importância da condição da muda ao deixar o cultivo *in vitro*. O ágar provoca redução da disponibilidade de oxigênio e do enraizamento (Moncousin, 1991) e sua substituição por outros materiais, como o Plantmax e a vermiculita, mostrou-se promissora, especialmente para o desenvolvimento das raízes adventícias. Além da redução do custo, podem ser apontadas como vantagens adicionais do uso de substratos alternativos ao ágar: a) maior número de brotações por frasco; b) redução da quantidade de meio necessário a 1/3 ou menos; c) a composição do meio é simplificada; d) o trabalho é simplificado; e) dispensa o uso de técnicas de assepsia após o enraizamento; f) a aclimatização e o transplante são facilitados (Zimmerman e Fordham, 1985).

Porém, alguns ajustes desta metodologia deverão ser buscados, como forma de viabilizar o seu uso e obter maior enraizamento *in vitro* e melhor qualidade do sistema radicular, com influência sobre a aclimatização.

4 CONCLUSÕES

Para as condições em que os experimentos foram realizados, conclui-se que:

- a) o substrato afeta a indução, a formação e o crescimento das raízes adventícias e da parte aérea das mudas dos porta-enxertos de macieira 'Marubakaido' e 'M-26';
- b) os melhores resultados para o enraizamento *in vitro* de brotações de 'Marubakaido' são obtidos com o meio solidificado com ágar, com as proporções de 20% de vermiculita ou areia e com a vermiculita umedecida com meio líquido;
- c) a indução do enraizamento é mais eficiente no ágar, seguido do Plantmax, nos dois porta-enxertos estudados;
- d) o melhor desenvolvimento das raízes adventícias em brotações dos porta-enxertos 'Marubakaido' e 'M-26' é obtido com emprego do ágar, porém a maior sobrevivência é obtida com mudas enraizadas em meio solidificado com ágar e em Plantmax;
- e) o Plantmax proporciona as melhores condições de aclimatização de mudas do porta-enxerto 'Marubakaido' enraizadas "in vitro".

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDRUFEU, A. Rooting and acclimatization of *Pelargonium zonale* plantlets. *Acta Horticulturae*, Wageningen, v.212, p.361-366, 1987.
- APTER, R.C.; McWILLIAMS, E.L.; DAVIES JR, F.T. In vitro and ex vitro adventitious root formation in Asian Jasmine (*Trachelospermum asiaticum*). I. Comparative morphology. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v. 118, n.6, p.902-905, Nov. 1993
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998, p.87-132.
- CARVALHO, G. R. et al. Aclimatização de brotações de cafeeiro produzidas *in vitro*. II ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL (Gramado:1997) *Programas e Resumos...* Gramado, FAO-REDBIO/EMBRAPA/UFRGS, 1997, p.60.
- DRUART, P.; OPATRYN, Z.; DE KLERK, G.J. Optimization of culture media for in vitro rooting of *Malus domestica* Borkh. cv. Compact Spartan. *Biologia Plantarum*, [s.l.], v.39, n.1, p.67-77, 1997.
- GEORGE, E.F. *Plant propagation by tissue culture - Part 1: The technology*. 2nd ed. Edington: Exegetics, 1993. 786p.
- GISLEROD, H. R. Physical conditions of propagation media and their influence on the rootings of cuttings - I. Air content and oxygen diffusion at different moisture tensions. *Plant and Soil*, The Hague, v.69, p. 445-456, 1982.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998, p.183-260.

→ GROUT, B.; ASTON, M.J. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. *Horticultural Research*, [s.l.], n.17, p.107-112, 1977.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR, F. T. *Plant propagation: principles and practices* - 5. ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1990. 642p.

→ b HUTCHINSON, J.F. Factors affecting shoot proliferation and root initiation in organ cultures of the apple 'Northern Spy'. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.22,n.4, p. 347-358, 1984.

JONES, A.L.; ALDWINCKLE, H.S. *Compendium of apple and pear diseases*. St.Paul: APS Press, 1991. 100p.

→ LEITE, G.B. Efeito de reguladores de crescimento, substratos, sacarose e intensidade luminosa na micropropagação e pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Bartlett e do clone OH x F97. Pelotas: UFPEL, 1995, 50p. (Dissertação-Mestrado em Agronomia)

→ MACIEL, A.L. de R. et al. Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. M-7 utilizando concentrações do meio MS e diferentes substratos. II ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL (Gramado: 1997). Programa e Resumos... Gramado, FAO-REDBIO/EMBRAPA/UFRGS, p.14, 1997.

MARIN, J.A.; GELLA, R. Is desiccation the cause of the poor survival rate in the acclimatization of micropropagated *Prunus cerasus* L.? *Acta Horticulturae*, Wageningen, n.230, p.105-112, 1988.

MONCOUSIN, C. Rooting of *in vitro* cuttings. In: BAJAJ, Y.P.S. (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry. High Tech and Micropropagation I*. Berlin: Springer-Verlag, 1991, p.231-261.

NAVATEL, J.C.; BOURRAIN, L. Influence of the physical structure of the medium on *in vitro* rooting. *Advances in Horticultural Science*, Firenze, v.8, n.1, p.57-59, 1994.

→ NORMAH, M.N.; NOR-AZZA, A.B.; ALIUDIN, R. Factors affecting *in vitro* shoot proliferation and *ex vitro* establishment of mangosteen. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.43, n.3, p.291-294, Dec. 1995.

PIERIK, R.L.M. Handicaps for the large scale commercial application of micropropagation. *Acta Horticulturae*, Wageningen, n.230, p. 63-71, 1988.

→ PONCHIA, G.; GARDIMAN, M. The micropropagation and post-acclimation growth of *Prunus laurocerasus* L. cv. Otto Luyken: additional findings. *Advances in Horticultural Science*, Firenze, v.7, n.1, p. 11-14, 1993.

SCHEFFER, V. S. Influência da natureza do substrato na fisiologia de plantas de morango micropropagadas na fase de adaptação pré-campo. Piracicaba: ESALQ, 1993, 103p. (Tese- Mestrado em Agronomia)

SIMÕES, M.O.M. Ontogênese de gemas e raízes adventícias de *Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck cv. Pêra cultivadas *in vitro*. Viçosa: UFV, 1988, 56p. (Tese - Mestrado em Fisiologia Vegetal)

→ ZIMMERMAN, R.H. Micropropagation of fruit plants. *Acta Horticulturae*, Wageningen, n.120, p.217-222, 1981.


→ ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I. Simplified method for rooting apple cultivars *in vitro*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v. 110, n.1, p.34-38, 1985.

CAPÍTULO 3

SACAROSE NA MULTIPLICAÇÃO, ENRAIZAMENTO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE MUDAS MICROPROPAGADAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA 'MARUBAKAIDO'

Resumo: Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito da sacarose durante as fases de multiplicação, enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas micropropagadas do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido'. Para tanto, foram utilizadas brotações, previamente mantidas *in vitro* no Laboratório de Cultura de Tecidos da UFLA (Lavras, MG). O trabalho foi constituído de 2 experimentos, nos quais foram testados: a) influência do teor de sacarose na multiplicação, enraizamento e aclimatização de mudas e b) efeito de concentrações de sacarose sob condições de aumento das trocas gasosas. Após o enraizamento, as mudas foram aclimatizadas em casa de vegetação com nebulização intermitente. Com base nos resultados obtidos, pôde-se observar que a sacarose, nos meios de multiplicação e de enraizamento, afeta a morfogênese e o crescimento *in vitro*, bem como a sobrevivência e o crescimento durante a aclimatização. A concentração de 45 g.L⁻¹ de sacarose no meio de multiplicação permite a obtenção do maior rendimento de microestacas. Concentrações baixas de sacarose no meio de enraizamento (10-30 g.L⁻¹) proporcionam melhor formação de raízes *in vitro*, enquanto elevadas concentrações (45 a 60 g.L⁻¹) aumentam a sobrevivência e o crescimento durante a aclimatização. Em relação ao selamento convencional, o uso de algodão favorece o crescimento das mudas durante a aclimatização.

Palavras-chave: Rosaceae, *Malus*, cultura de tecidos, metabolismo do carbono



THE EFFECT OF SUCROSE ON MULTIPLICATION, *IN VITRO* ROOTING AND ACCLIMATIZATION OF MICROPROPAGATED 'MARUBAKAIDO' APPLE ROOTSTOCK PLANTLETS

Abstract: The objective of this work was to study the effect of sucrose during multiplication, *in vitro* rooting and acclimatization phases of micropropagated 'Marubakaido' apple rootstock plantlets. Shoots previously maintained *in vitro* at the Tissue Culture Laboratory of the UFLA (Lavras, MG, Brazil) were used. The work consisted of 2 experiments, on which were tested (a) the influence of sucrose levels on shoot multiplication, rooting and acclimatization and (b) the effect of sucrose concentrations under conditions of an increase gaseous change. After rooting, the plantlets were acclimatized in a greenhouse with an intermittent nebulization. Based on the results, it could be observed that the presence of sucrose on rooting and multiplication media affects *in vitro* rooting and morphogenesis, as well as survival and growth during acclimatization. The concentration of 45 g.L⁻¹ sucrose in the multiplication medium allows the obtention of the highest shoot yield. While high sucrose concentrations (45-60 g.L⁻¹) increased the survival and the growth during acclimatization, the use of low concentrations of sucrose (10-30 g.L⁻¹) in the rooting medium provided better formation of *in vitro* rooting. Compared to the conventional sealing, the use of cotton favored plantlets growth during acclimatization.

Key-words: Rosaceae, *Malus*, tissue culture, carbon metabolism

1 INTRODUÇÃO

Os carboidratos, adicionados ao meio de cultura, fornecem energia metabólica e esqueletos de carbono para a biossíntese de aminoácidos e proteínas, polissacarídeos estruturais e demais compostos orgânicos necessários ao crescimento das células (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1998). O teor de açúcar, geralmente sacarose, no meio de cultura, afeta o enraizamento, o crescimento *in vitro* e o mecanismo de nutrição do explante. De Riek et al. (1991), analisando a matéria seca de explantes de roseira *in vitro*, constataram que 74% do carbono

vieram da sacarose no meio de cultura, e 26%, da fotossíntese. Além disso, a concentração de CO₂ aumentou durante a noite e diminuiu durante o dia, o que indica que o CO₂ liberado através da respiração do carbono no meio de cultura é recapturado pela fotossíntese *in vitro*. Em alguns estudos, já foi observado que 75 a 85% do aumento da biomassa são devidos à incorporação de carbono da sacarose; além disso, 25-40% da sacarose são usadas para a respiração (De Riek, Piqueras e Debergh, 1997).

Porém, o açúcar no meio de cultura é um componente que eleva o custo de produção, tanto devido à perda de plantas por contaminação como por reduzir o pegamento na aclimatização. O açúcar mais utilizado como fonte de energia e carbono em meios de cultura de tecidos vegetais é a sacarose, devido ao baixo custo e à facilidade de obtenção. A concentração mais utilizada no preparo do meio é de 30 g.L⁻¹, mas modificações desta concentração convencional podem beneficiar o cultivo *in vitro* e a aclimatização. Debergh (1988) afirma que, para facilitar a passagem das plantas para o estado autográfico na aclimatização, pode-se reduzir ou eliminar a sacarose no meio de enraizamento. Cheng, Peterson e Mitchell (1992), estudando o enraizamento de explantes de eucalipto, observaram que concentrações de sacarose no meio de cultura entre 20 e 60 g.L⁻¹ favoreceram o enraizamento, enquanto concentrações de 40 a 60 g.L⁻¹ causaram a formação de calo, e entre 80 e 100 g.L⁻¹, inibiram o desenvolvimento dos explantes.

Meios de enraizamento mais diluídos e com menor concentração de sacarose, em relação ao meio padrão, foram adequados ao enraizamento de brotações de videira (Biasi, 1996). Para o enraizamento *in vitro* de explantes de macieira, são mencionadas, na literatura, concentrações de 10-20 g.L⁻¹ (Mattos, 1982 e Fortes, 1992) até 45 g.L⁻¹ (Corrêa, 1990), dependendo da cultivar e do meio de cultura.

Ao contrário do que ocorre em condições naturais, as plantas *in vitro* têm reduzida atividade fotossintética, caracterizando o metabolismo heterotrófico, ou seja, dependente dos açúcares adicionados ao meio de cultura como fonte externa de carbono. Embora o uso desta fonte de carbono e energia viabilize o cultivo *in vitro*, a ausência parcial ou total do metabolismo autotrófico nas plantas dificulta a aclimatização, pois, ao serem transferidas para casa de vegetação, as necessidades de carbono e energia deverão ser supridas somente através da fotossíntese (Pierik, 1988).

Porém, tem sido observado que as plantas *in vitro*, por apresentarem tecidos clorofilados, em geral realizam fotossíntese, mas em pequena intensidade, devido principalmente à inibição da atividade da enzima RubP-Carboxilase pela sacarose e ao baixo teor de CO₂ no interior dos recipientes de cultura (Kozai, Koyama e Watanabe, 1988 e Serret et al., 1997). Segundo Hayashi, Nakayama e Kozai (1988), as mudas no estágio de enraizamento têm habilidade fotossintética e crescem em meio livre de sacarose, desde que dadas as condições adequadas como aumento do intercâmbio de gases com a atmosfera externa, luz, temperatura e meio de cultura.

A modificação de algumas condições físicas que controlam a fotossíntese pode favorecer o desenvolvimento da autotrofia, antes da aclimatização, diminuindo ou dispensando a exigência de açúcar no meio como fonte de energia para o crescimento. Isto traz vantagens como a redução das perdas por contaminação por fungos e bactérias, permitindo que se utilizem grandes recipientes (Kozai, Koyama e Watanabe, 1988 e Hayashi, Nakayama e Kozai, 1988). Seko e Nishimura (1996) mencionam que as plantas *in vitro* em meio sem sacarose com uso de CO₂ e luz intensa têm habilidade fotossintética. Embora a sacarose seja essencial como fonte de energia para a formação de raízes adventícias (Fortes, 1992), a redução do seu teor no meio de cultura pode

favorecer o desenvolvimento de mixotrofia, mecanismo de nutrição do carbono intermediário entre a auto e a heterotrofia. Por outro lado, concentrações superiores podem condicionar a planta para a transferência para casa de vegetação, aumentando a quantidade de reservas nos tecidos, o que é importante para as etapas iniciais da aclimatização (Wainwright e Scrace, 1989). Em ambas as situações, a aclimatização e o crescimento das plantas são favorecidos. Resultados promissores neste sentido foram obtidos por Wardle, Dobbs e Short (1983), Fujiwara, Kozai e Watanabe (1988), Kozai, Kubota e Watanabe (1988) e De Riek, Piqueras e Debergh (1997).

Este trabalho teve por objetivo estudar o efeito da modificação de concentrações de sacarose na forma de açúcar comercial no meio de cultura e do aumento do intercâmbio de gases sobre a multiplicação, enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas micropropagadas dos porta-enxertos de macieira 'Marubakaido' e 'M-26'.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi constituído de dois experimentos. Para a multiplicação, foram utilizadas brotações axilares, obtidas *in vitro*, com cerca de 1 a 1,5 cm, sem meristema apical. Para o enraizamento, foram utilizadas brotações apicais, obtidas *in vitro*, com cerca de 2 a 3 cm de comprimento, retirando-se as folhas inferiores e mantendo-se o meristema apical e os 2 pares de folhas mais próximos do meristema. O protocolo geral das condições de cultivo *in vitro* está descrito no Capítulo 1.

Experimento 1 - Influência do teor de sacarose na multiplicação, enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de macieira 'Marubakaido'

Neste experimento, foram testadas diversas concentrações de sacarose no meio de cultura, nas fases de multiplicação e enraizamento *in vitro*, bem como seus efeitos na aclimatização. Na fase de multiplicação, foram utilizadas as concentrações de 30, 45 e 60 g.L⁻¹ na forma de açúcar comercial, e na fase de enraizamento *in vitro*, foram utilizadas as concentrações de 15, 30, 45 e 60 g.L⁻¹. Os tratamentos consistiram da combinação destas concentrações. Para a multiplicação, foi utilizado o meio MS com a concentração integral dos sais de MS, acrescido de vitaminas (1,5 mg.L⁻¹), glicina (2,0 mg.L⁻¹) e mio-inositol (100 mg.L⁻¹), além de 1,0 mg.L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) e 7 g.L⁻¹ de ágar. O período de multiplicação foi de 40 dias. Para o enraizamento, foi utilizado o meio MS, com a metade da concentração dos sais e demais componentes normais, substituindo o BAP pelo AIB (1,0 mg.L⁻¹) e utilizando-se brotações (microestacas) com comprimento médio de 2,07 cm e 3,89 folhas/brotação. O período de enraizamento *in vitro* foi de 49 dias. Após o enraizamento, as brotações enraizadas foram retiradas dos frascos, lavadas as raízes e transferidas para a aclimatização. Parte das brotações enraizadas (7 brotações/repetição) foi repicada para frascos contendo meio MS com a metade da concentração de sais, sem sacarose e sem fitorreguladores, para verificação do crescimento na ausência de sacarose. As mudas foram mantidas neste meio durante 12 dias. A aclimatização foi realizada em casa de vegetação, utilizando-se bandejas de Isopor, com 72 células de 50 cm³ cada. Para a multiplicação, foram utilizadas 5 brotações/frasco e, para o enraizamento, 7 brotações/frasco. O período de aclimatização foi de 61 dias.

Ao final do período de multiplicação, foram avaliados o rendimento e a matéria seca das brotações (ou microestacas). Durante o enraizamento, foram

avaliados, a cada 7 dias, o percentual de brotações enraizadas. No momento da transferência para a casa de vegetação, foram avaliados o percentual de brotações enraizadas, número de raízes primárias, número de folhas e altura da muda. Após a aclimatização, foram avaliados a sobrevivência das mudas, número de folhas, número de raízes primárias, altura da muda e matéria seca das raízes e da parte aérea.

Foi adotado o delineamento experimental inteiramente ao acaso, com 5 repetições de 5 explantes cada (multiplicação), 4 repetições de 10 explantes cada (enraizamento) e 3 repetições de 7 explantes cada (aclimatização). Para as variáveis avaliadas sequencialmente, foi adotado o esquema de parcelas subdivididas no tempo. Os dados de número de raízes primárias e matéria seca da parte aérea, determinados após a aclimatização, foram transformados segundo $\log(x+1)$ e \sqrt{x} , respectivamente. Os resultados foram comparados através da análise de regressão e do teste de Tukey a 5%.

Experimento 2 – Efeito de concentrações de sacarose e do selamento do recipiente de cultivo sobre o enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de macieira ‘Marubakaido’

Neste experimento, foram testadas concentrações de sacarose no meio e tipos de selamento do recipiente de cultura sobre o enraizamento *in vitro* e aclimatização das mudas.

O enraizamento ocorreu em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), com a metade da concentração de sais e acrescido de mio-inositol (100 mg.L⁻¹), vitaminas (1,5 mg.L⁻¹) e glicina (2,0 mg.L⁻¹). As brotações foram tratadas com AIB (200 mg.L⁻¹). A seguir, foram aplicados os tratamentos, que consistiram de quatro concentrações de sacarose (0, 10, 20 e 30 g.L⁻¹, na forma de açúcar comercial) e dois tipos de selamento (chumaço de algodão e tampa

plástica). As brotações foram colocadas em frascos de vidro (250 cm³ de capacidade), em número de 5 brotações/frasco, contendo meio de cultura idêntico ao anterior, porém sem AIB. Após a repicagem, os frascos foram mantidos em sala de crescimento durante 42 dias. No selamento com algodão, foi efetuada a reposição do meio de cultura a cada 14 dias, usando-se solução de água + ágar (3 g.L⁻¹). Após o enraizamento *in vitro*, foram avaliados o percentual de brotações enraizadas, altura e número de raízes primárias das mudas. A aclimatização foi realizada em casa de vegetação com nebulização intermitente e sombreamento parcial (Sombrite 50%), repicando-se as mudas enraizadas para copos plásticos (300 ml) de cor azul, sobre os quais foram colocados copos plásticos transparentes (400 ml) durante 10 dias, de modo a comporem estufins individuais. Foi repicada uma muda por recipiente. Após 42 dias, foram avaliados a sobrevivência, altura, número de raízes primárias, matéria seca da parte aérea e matéria seca das raízes.

Foi adotado o delineamento experimental inteiramente ao acaso, com 4 repetições de 12 explantes cada. Os dados de matéria seca das raízes foram transformados segundo a equação \sqrt{x} . Os resultados foram comparados pelo teste de Tukey (selamento) e através da análise de regressão (sacarose).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1 – Influência do teor de sacarose na multiplicação, enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de macieira ‘Marubakaido’

Avaliando-se o efeito da concentração de sacarose no meio de cultura de multiplicação aos 49 dias após o subcultivo, observou-se influência apenas sobre

a variável rendimento de microestacas (ou brotações), não havendo efeito dos tratamentos sobre a matéria seca das microestacas (Tabela 1.B - Anexo e Figura 3.1). Utilizando-se 45 g.L⁻¹ de sacarose durante a fase de multiplicação das brotações, é possível obter-se, em média, 4,71 microestacas a partir de uma brotação axilar colocada em meio para multiplicação, resultado superior em 89% à concentração convencionalmente utilizada (30 g.L⁻¹). Este resultado está de acordo com Flores et al. (1997), que obtiveram o maior comprimento das brotações utilizando 45 g.L⁻¹ de sacarose, o que proporcionou maior rendimento de microestacas. Este rendimento foi reduzido ao se aumentar a concentração de sacarose para 60 g.L⁻¹.

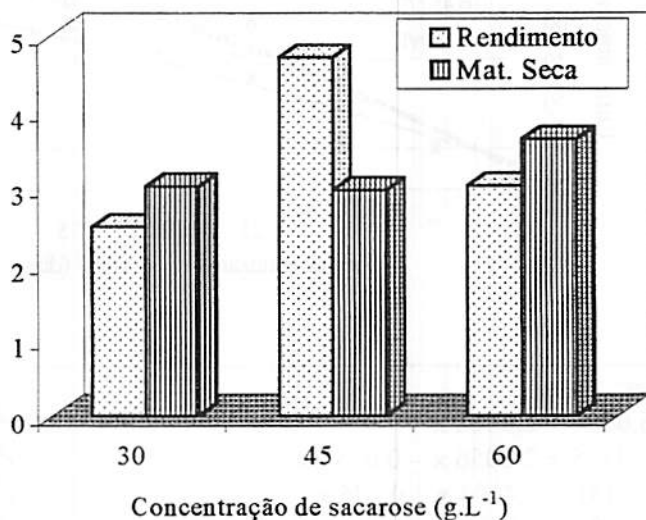
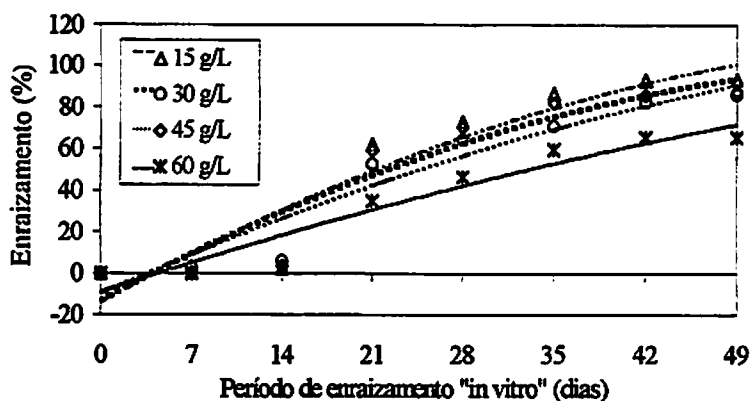


FIGURA 3.1. Rendimento (microestacas/brotação axilar) e matéria seca de microestacas (mg/microestaca) de macieira 'Marubakaido'. Lavras, UFLA, 1999.

Após serem colocadas para enraizar em meio de cultura adicionado de AIB, foi avaliado semanalmente o percentual de microestacas enraizadas. Para esta variável, foi significativa a interação tripla entre os fatores (sacarose na multiplicação x sacarose no enraizamento x tempo) (Tabela 2.B). Nas quatro concentrações de sacarose no meio de enraizamento, o percentual de microestacas enraizadas manteve-se baixo até os 14 dias após o subcultivo (Figura 3.2), aumentando consideravelmente aos 21 dias e com incrementos decrescentes a partir desta avaliação. Este comportamento proporcionou o ajuste a uma regressão quadrática.



Equações:

$$Y_{15} = -6,0694 + 2,3468 x \quad r^2 = 0,8756$$

$$Y_{30} = -9,9535 + 2,8056 x - 0,0154 x^2 \quad r^2 = 0,9211$$

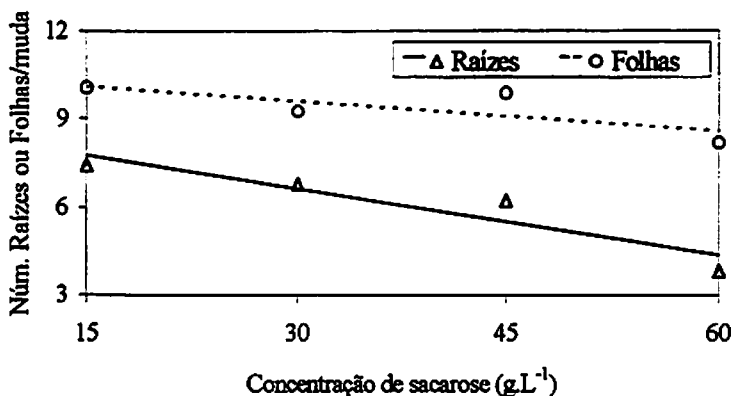
$$Y_{45} = -13,451 + 3,4104 x - 0,025 x^2 \quad r^2 = 0,8932$$

$$Y_{60} = -8,8605 + 2,0632 x - 0,0084 x^2 \quad r^2 = 0,9238$$

FIGURA 3.2. Evolução do percentual de microestacas de macieira 'Marubakaido' enraizadas *in vitro*. Lavras, UFLA, 1999.

Após o enraizamento *in vitro*, observou-se que a concentração de sacarose no meio de enraizamento afetou três das cinco variáveis analisadas (Tabela 3.B). Já a concentração de sacarose no meio de multiplicação teve pouca influência nesta fase, indicando que praticamente não há efeito residual deste fator após colocadas as microestacas no meio de enraizamento, exceto para o número de folhas.

O percentual final de enraizamento (aos 49 dias após o subcultivo), não foi afetado pelos tratamentos (Tabela 3.B), obtendo-se, em média, 84,26% de brotações enraizadas. A altura das mudas também não foi afetada pelos tratamentos (média de 2,24 cm). Porém, o número de raízes primárias e o número de folhas emitidas *in vitro* decresceram linearmente com o aumento da concentração de sacarose (Figura 3.3).

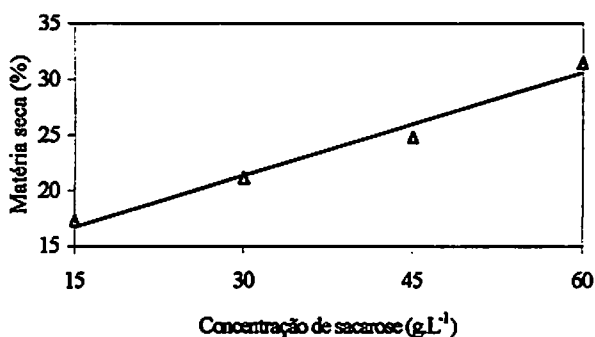


Equações:	
$Y_{\text{Raízes}} = 8,8789 - 0,0753 x$	$r^2 = 0,8709$
$Y_{\text{Folhas}} = 10,6090 - 0,337 x$	$r^2 = 0,5804$

FIGURA 3.3. Efeito da concentração de sacarose no meio de cultura de enraizamento sobre o número de raízes primárias e de folhas emitidas em microestacas de macieira ‘Marubakaido’. Médias de três concentrações de sacarose na fase de multiplicação. Lavras, UFLA, 1999.

Utilizando-se a concentração mínima de sacarose (15 g.L^{-1}) no meio de enraizamento, criaram-se as condições suficientes para obter bons resultados na produção de mudas *in vitro*, como também é mencionado por Mattos (1982) e Fortes (1992). O aumento da concentração de sacarose interferiu negativamente sobre estas variáveis, além de elevar o custo de preparo do meio de cultura. Hayashi, Nakayama e Kozai (1988) mencionam que os carboidratos afetam o estado hídrico dos explantes, pois têm influência sobre o seu potencial matricial, inclusive favorecendo a ocorrência de hiperhidricidade (vitrificação). Biasi (1996) observou benefícios da redução da concentração de sacarose de 3% para 1% na micropropagação de videira, sendo que, utilizando-se 3% de sacarose, as brotações enraizaram pouco e formaram raízes de baixa qualidade.

Aumentando-se o teor de sacarose no meio de enraizamento, o percentual de matéria seca das mudas aumentou linearmente (Figura 3.4), inversamente ao observado nas variáveis anteriores.



Equação:

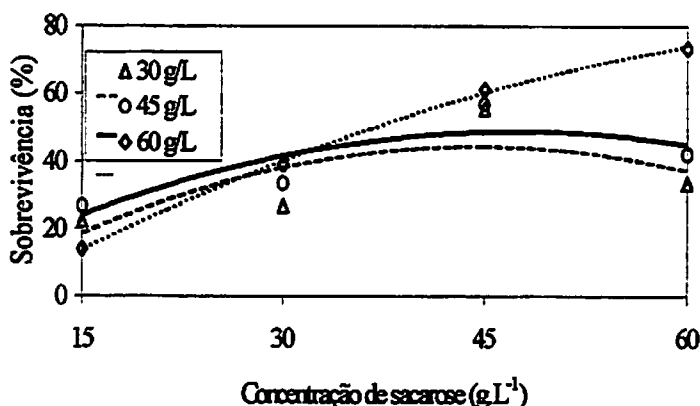
$$Y = 0,3087 + 12,074 x$$

$$r^2 = 0,9773$$

FIGURA 3.4. Efeito da concentração de sacarose no meio de cultura de enraizamento sobre o percentual de matéria seca em mudas micropropagadas de macieira 'Marubakaido'. Médias de três concentrações de sacarose na fase de multiplicação. Lavras, UFLA, 1999.

Considerando que a matéria seca é constituída principalmente pelos carboidratos insolúveis presentes na parede celular (celulose, hemicelulose e lignina), o aumento da disponibilidade de carbono facilmente assimilável, como a sacarose, aumentou a síntese destes compostos. Silva et al. (1993) estudaram estas frações, denominadas “sistema de proteção”, em mudas micropropagadas de amora-preta durante a aclimatização. Os autores observaram maiores teores de celulose e hemicelulose em mudas aclimatizadas, em consequência de sua adaptação ao ambiente da casa de vegetação. Teores reduzidos destes compostos foram associados com a elevada sensibilidade a estresses em mudas cultivadas *in vitro*. Dimassi-Theriou e Bossabalidis (1997) observaram que a adição de sacarose ao meio de cultura (20 g.L^{-1}) afetou negativamente o tamanho das células do mesófilo de kiwi sob concentração normal de Mg (35 g.L^{-1}) e positivamente sob alta concentração de Mg (105 g.L^{-1}). Além disso, observaram que a acumulação de açúcares totais foi favorecida em todos os tratamentos por luz normal e sacarose.

Isto se reflete sobre o comportamento durante a aclimatização. Com relação à variável sobrevivência após 61 dias de aclimatização, houve interação significativa entre os fatores sacarose na multiplicação e sacarose no enraizamento (Tabela 4.B), de modo que, utilizando-se as menores concentrações de sacarose na multiplicação, a sobrevivência apresentou tendência quadrática com o aumento das concentrações de sacarose no meio de enraizamento (Figura 3.5). De maneira geral, observaram-se benefícios do aumento da concentração de sacarose na sobrevivência das mudas, o que provavelmente é devido ao incremento dos componentes do sistema de proteção e à maior quantidade de substâncias de reserva (principalmente amido), que auxiliaram as plantas até o estabelecimento do sistema autotrófico de nutrição, durante a aclimatização.



Equações:	
$Y_{30} = -14,443 + 2,6370 x - 0,0296 x^2$	$r^2 = 0,5654$
$Y_{45} = -4,1658 + 2,2259 x - 0,0235 x^2$	$r^2 = 0,7063$
$Y_{60} = -19,309 + 2,4023 x - 0,0142 x^2$	$r^2 = 0,9987$

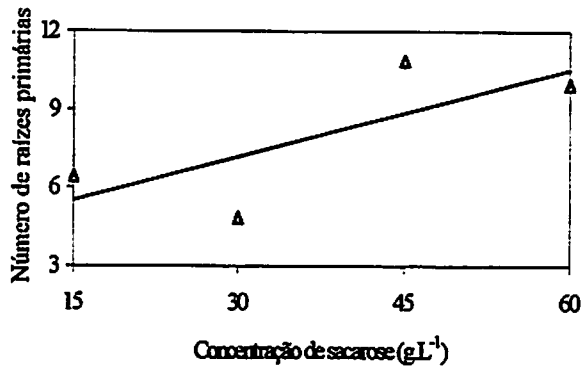
FIGURA 3.5. Efeito da concentração de sacarose no meio de cultura de enraizamento na sobrevivência de mudas após a aclimatização, em três concentrações de sacarose no meio de multiplicação. Lavras, UFLA, 1999.

Van Telgen, Van Mil e Kunneman (1992) observaram que houve aumento no enraizamento e na sobrevivência de mudas de macieira ‘M-9’ e ‘M-26’ ao se aumentar a concentração de sacarose de 20 para 30 g.L⁻¹ durante a fase de multiplicação. Este benefício, porém, é observado quando as microestacas são enraizadas em frascos “hermeticamente” fechados. Neste caso, a pouca disponibilidade de CO₂ na atmosfera interna do frasco inibe o desenvolvimento de um sistema autotrófico.

Entretanto, como é citado por Hayashi, Nakayama e Kozai (1988), as plantas no estágio de enraizamento têm habilidade fotossintética, pois possuem folhas clorofiladas e crescem em meio livre de açúcar, desde que sejam proporcionados o aumento da concentração de CO₂ no frasco e da intensidade

luminosa no ambiente de cultivo. Nestas condições, a sacarose tende a inibir a atividade da enzima Ribulose-1,5-Bifosfato Carboxilase Oxigenase (Rubisco) e, portanto, a eficiência fotossintética. No caso deste experimento, esta inibição provavelmente não surtiu efeito, pois o intercâmbio de gases entre a atmosfera do recipiente de cultivo e a da sala de crescimento é limitado pelo tipo de selamento.

Com o aumento da concentração de sacarose no meio de enraizamento, ocorreu incremento linear do número de raízes primárias, matéria seca da raiz e altura da muda após a aclimatização, devido ao benefício sobre o sistema de proteção, bem como à melhor condição das mudas antes da aclimatização. A matéria seca da parte aérea não foi afetada pelos tratamentos (Tabela 4.B). Observa-se que, utilizando as concentrações mais elevadas de sacarose no meio de enraizamento, é possível obter-se mais raízes primárias (Figura 3.6), matéria seca da raiz (Figura 3.7) e maior altura da muda (Figura 3.8). Porém, a altura da muda apresentou incremento significativo em função da sacarose no meio de enraizamento apenas quando utilizadas 60 g.L^{-1} no meio de enraizamento.

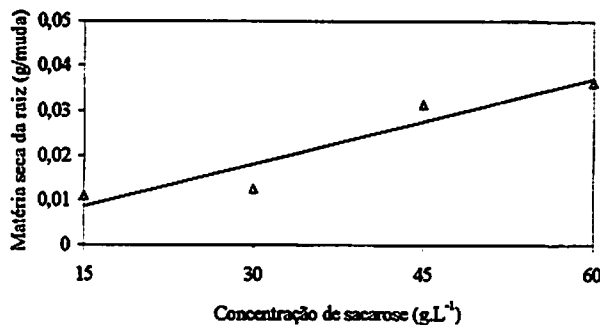


Equação:

$$Y = 3,8517 + 0,1114 x$$

$$r^2 = 0,5649$$

FIGURA 3.6. Efeito da concentração de sacarose no meio de cultura de enraizamento sobre o número de raízes primárias após a aclimatização de mudas micropropagadas de macieira 'Marubakaido'. Médias de três concentrações de sacarose na fase de multiplicação. Lavras, UFLA, 1999.

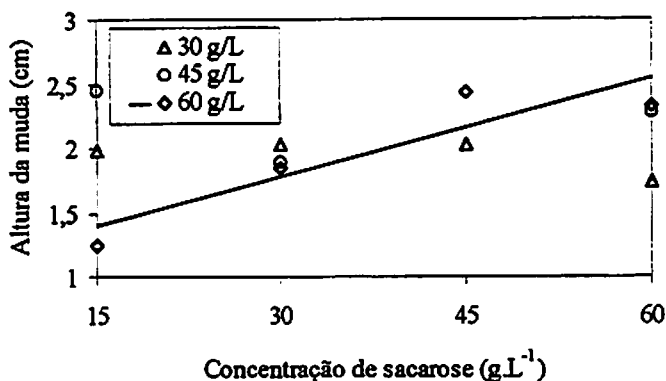


Equação:

$$Y = 0,0071 + 0,00047 x$$

$$r^2 = 0,6956$$

FIGURA 3.7. Efeito da concentração de sacarose no meio de cultura de enraizamento sobre a matéria seca da raiz após a aclimatização de mudas micropropagadas de macieira 'Marubakaido'. Médias de três concentrações de sacarose na fase de multiplicação. Lavras, UFLA, 1999.



Equação e Médias:
 Média₃₀ = 1,95 cm
 Média₄₅ = 2,46 cm
 $Y_{60} = 1,012 + 0,02538 x$ $r^2 = 0,8344$

FIGURA 3.8. Efeito da concentração de sacarose no meio de cultura de enraizamento sobre a altura de mudas micropropagadas de macieira 'Marubakaido' após a aclimatização. Lavras, UFLA, 1999.

Com base nestes resultados, observa-se que a sacarose *in vitro* afeta a sobrevivência e o crescimento das mudas. Concentrações mais elevadas de sacarose tendem a desfavorecer a morfogênese e o crescimento *in vitro*, porém possibilitam o armazenamento de reservas e a síntese dos componentes do sistema de proteção em maior intensidade, com reflexos positivos na aclimatização. O uso de concentrações elevadas de sacarose, após formadas as raízes, na fase imediatamente anterior à aclimatização poderia favorecer a aclimatização sem prejudicar a morfogênese *in vitro*. Além disso, a concentração de sacarose na multiplicação afetou a altura das mudas após a aclimatização, sendo que, com 45 g.L⁻¹, a altura foi significativamente superior à encontrada nas demais concentrações.

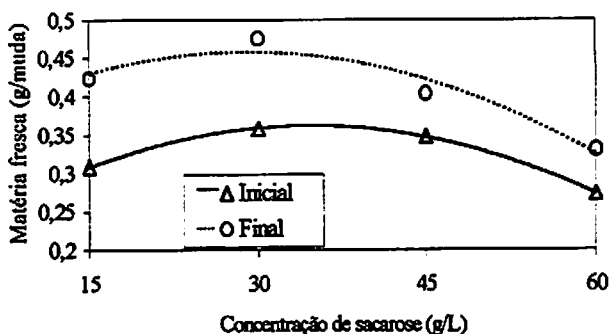
As mudas enraizadas, desenvolvidas sob efeito dos diferentes tratamentos, foram repicadas para meio sem sacarose, para avaliar o crescimento em termos de matéria fresca na ausência de fonte externa de energia, bem como analisar o possível efeito residual da sacarose nos meios de multiplicação e enraizamento. Houve efeito da sacarose na multiplicação e no enraizamento sobre a matéria fresca das mudas (Tabelas 5.B e 3.1).

TABELA 3.1. Matéria fresca de mudas de macieira 'Marubakaido' em função da concentração de sacarose no meio de multiplicação, aos 12 dias após o subcultivo em meio sem sacarose. Lavras, UFLA, 1999.

Concentração de sacarose (g.L ⁻¹)	Matéria fresca (mg/muda)
30	0,360 ab
45	0,401 a
60	0,335 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

A matéria fresca evoluiu, ao longo de 12 dias, de forma quadrática (Figura 3.9), em função da concentração de sacarose no meio de enraizamento, obtendo-se os pontos máximos com 30 g.L⁻¹, devido à condição inicial (antes da repicagem) favorecida por esta concentração. Porém, observa-se que os maiores incrementos (diferença entre a matéria fresca inicial e a final) foram observados nas concentrações de 15 e 30 g.L⁻¹, indicando que estas concentrações provavelmente não causaram forte inibição do aparato fotossintético. Com 15 e 30 g.L⁻¹, obtiveram-se incrementos maiores (37,2 e 32,6%, respectivamente) em relação a 45 e 60 g.L⁻¹ (16,1 e 21,2%, respectivamente).



Equações:

$$Y_{\text{Inicial}} = 0,1958 + 0,0096 x - 0,0001 x^2$$

$$r^2 = 0,9999$$

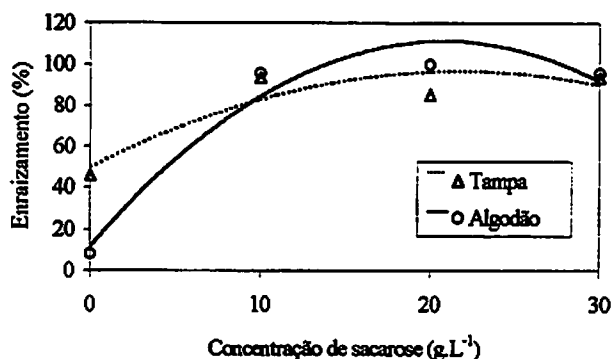
$$Y_{\text{Final}} = 0,3403 + 0,0081 x - 0,0001 x^2$$

$$r^2 = 0,9301$$

FIGURA 3.9. Efeito da concentração de sacarose no meio de cultura de enraizamento sobre a matéria fresca de mudas micropropagadas de macieira 'Marubakaido' cultivadas em meio sem sacarose durante 12 dias. Lavras, UFLA, 1999.

Experimento 2 - Efeito de concentrações de sacarose e do selamento do recipiente de cultivo sobre o enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de macieira 'Marubakaido'

Após 42 dias de enraizamento *in vitro*, foram avaliadas algumas variáveis referentes ao enraizamento e ao crescimento das mudas. O enraizamento foi significativamente afetado pela sacarose, sendo a interação entre selamento e sacarose significativa (Tabela 6.B). Em ambos os tipos de selamento, o percentual de enraizamento evoluiu de forma quadrática em resposta ao aumento da concentração de sacarose no meio de enraizamento (Figura 3.10), obtendo-se os maiores percentuais com 21,83% (tampa plástica) e 20,81% (algodão).



Equações:

$$Y_{\text{Tampa}} = 49,4782 + 4,3231 x - 0,0990 x^2 \quad r^2 = 0,8312$$

$$Y_{\text{Algodão}} = 12,0829 + 9,5418 x - 0,2292 x^2 \quad r^2 = 0,9526$$

FIGURA 3.10. Efeito da sacarose no meio de cultura de enraizamento sobre o percentual de brotações enraizadas de macieira 'Marubakaido'. Lavras, UFLA, 1999.

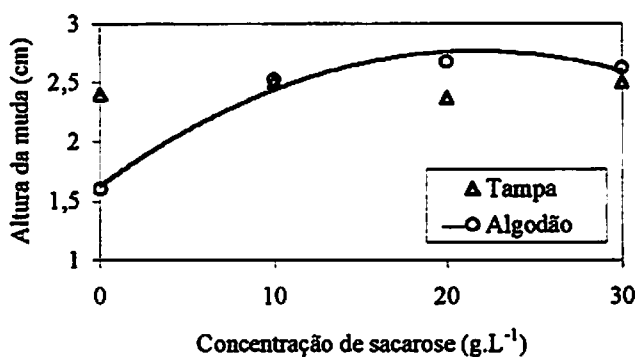
Observa-se que os percentuais de enraizamento foram muito baixos quando não utilizada a sacarose, mas diferiram pouco entre si nas concentrações de 10 a 30 g.L⁻¹. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), a presença de sacarose é fundamental para a morfogênese. Wainwright e Scrace (1989) observaram que, exceto na ausência de sacarose, o aumento dos teores deste componente não afetou o enraizamento *in vitro* nem o estabelecimento na aclimatização de *Potentilla fruticosa* e *Ficus lyrata*.

Simmonds (1983) obteve aumento significativo no enraizamento de macieira 'M-26' de 30 para 90% ao reduzir a concentração de sacarose de 30 para 10 g.L⁻¹. Embora este resultado não tenha sido observado no presente trabalho, foi possível obterem-se bons resultados com 10 g.L⁻¹ de sacarose, o que se traduz em economia no preparo do meio de cultura. Corrêa (1990) observou

que a sacarose foi essencial para o enraizamento de porta-enxertos de macieira, sendo recomendados 15 g.L⁻¹ para 'M 7' e 45 g.L⁻¹ para 'MI 793'.

A altura da muda teve comportamento semelhante ao enraizamento (Figura 3.11), sendo significativa a regressão apenas quando utilizado o algodão.

Comportamento semelhante foi observado com o número de raízes primárias após o enraizamento *in vitro*, embora sem interação entre os fatores selamento e sacarose (Tabela 6.B e Figura 3.12).



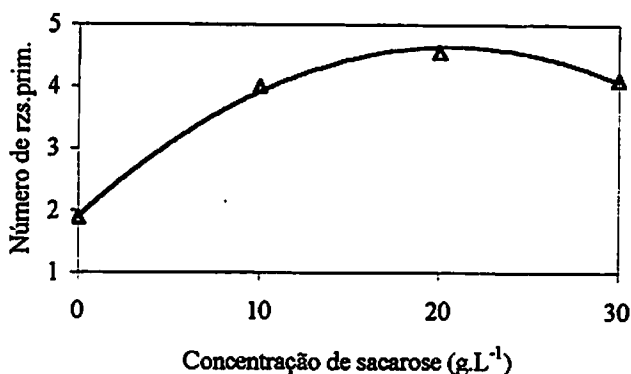
Equação e Média:

Média_{Tampa} = 2,44 cm

$Y_{\text{Algodão}} = 1,629 + 0,1054 x - 0,0024 x^2$

$r^2 = 0,9786$

FIGURA 3.11. Efeito da sacarose no meio de cultura de enraizamento e do selamento sobre a altura de mudas de macieira 'Marubakaido'. Lavras, UFLA, 1999.



Equação:

$$Y = 1,906 + 0,2660 x - 0,00645 x^2$$

$$r^2 = 0,9966$$

FIGURA 3.12. Efeito da sacarose no meio de cultura de enraizamento sobre o número de raízes primárias em mudas de macieira 'Marubakaido' enraizadas *in vitro*. Médias das duas condições de selamento. Lavras, UFLA, 1999.

Semelhante ao percentual de enraizamento, houve evolução quadrática com o incremento dos teores de sacarose e valores relativamente estáveis entre 10 e 30 g.L⁻¹. Leite (1995) observou prejuízos na qualidade das raízes em brotações de pereira ao serem diminuídas as concentrações de sacarose no meio de cultura, embora isto não tenha comprometido demasiadamente o percentual de enraizamento.

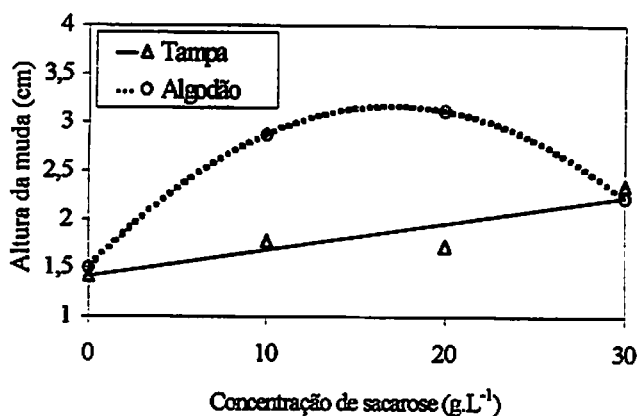
Além do pouco efeito sobre a morfogênese e o crescimento, a redução da sacarose no meio de cultura até 10 g.L⁻¹ pode auxiliar no condicionamento das brotações visando a autotrofia antes do transplante (Campos e Pais, 1990 e Gribaudo e Fronda, 1993), embora, como citam Wainwright e Scrace (1989), a importância deste condicionamento seja secundária. Segundo Grout e Millan (1985) e Wainwright e Scrace (1989), mantendo-se explantes sob elevadas

concentrações de sacarose, promove-se maior reserva de carboidratos nas folhas, que atuam como fonte de energia para as mudas durante a aclimatização. Conforme foi mencionado por George (1993), as folhas formadas *in vitro* podem atuar como órgãos de armazenagem nos primeiros estágios da aclimatização, visto que, nos primeiros dias, a respiração noturna é elevada e, somente cerca de 14 dias após o início da aclimatização, passa a ocorrer um balanço positivo de carbono. Segundo Deng e Donnelly (1993), a sacarose no meio de cultura promoveu o crescimento de explantes de framboesa, mas diminuiu a atividade fotossintética e o endurecimento *in vitro*, de modo que o CO₂ *in vitro* e a ausência de sacarose no meio de cultura beneficiaram o desempenho das mudas durante a aclimatização.

Após 42 dias de aclimatização, foram avaliados a sobrevivência e o crescimento das mudas na casa de vegetação.

A sobrevivência não foi afetada pelos tratamentos (Tabela 7.B), apresentando, em média, 40,5%. Este valor pode ser considerado baixo, em comparação aos resultados obtidos nos demais experimentos. Isto pode ser atribuído à utilização do estufim de copos plásticos e à mudança de casa de vegetação, criando condições de temperatura e umidade do ar e do substrato desfavoráveis à sobrevivência das mudas.

Já a altura das mudas foi afetada pelos fatores isolados e a interação selamento x sacarose foi significativa (Tabela 7.B e Figura 3.13). Houve ajuste a uma regressão linear quando as brotações foram enraizadas em frascos selados com tampa (selamento convencional), enquanto que, utilizando-se o algodão, a altura aumentou até 17,1 g.L⁻¹, diminuindo a partir desta concentração.



Equações:

$$Y_{\text{Tampa}} = 1,410 + 0,0273x$$

$$r^2 = 0,8288$$

$$Y_{\text{Algodão}} = 1,498 + 0,195x - 0,0057x^2$$

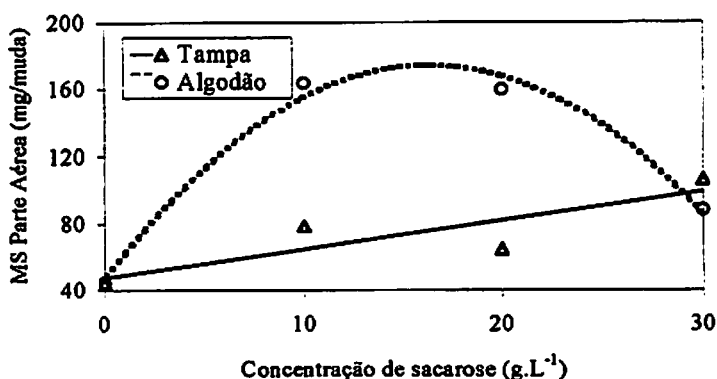
$$r^2 = 0,9990$$

FIGURA 3.13. Efeito da sacarose no meio de cultura e do selamento durante o enraizamento sobre a altura de mudas de macieira 'Marubakaido' após a aclimatização. Lavras, UFLA, 1999.

Com a utilização do algodão para o fechamento dos frascos, foi incrementado o intercâmbio de gases entre o recipiente de cultivo e o meio externo, fato que poderia ter ativado o aparato fotossintético e complementando o fornecimento de carbono para a morfogênese fornecido pela sacarose, de modo a favorecer o crescimento em altura. Porém, acima desta concentração, é provável que houvesse a inibição total ou parcial de enzimas envolvidas com o metabolismo do carbono, causando menor atividade fotossintética e, portanto, menor crescimento. Já quando o selamento foi feito com tampas plásticas, devido ao baixo teor de CO₂ no interior do frasco de cultura, quanto maior o teor de sacarose, maior foi o crescimento das mudas. Este comportamento foi semelhante ao observado com a altura após o enraizamento *in vitro*, especialmente quando utilizado o selamento com algodão.

Com a matéria seca da parte aérea, foi constatado efeito semelhante ao observado com a altura das mudas (Figura 3.14). Por serem variáveis associadas entre si, pode-se atribuir os resultados às mesmas causas apontadas para a altura das mudas.

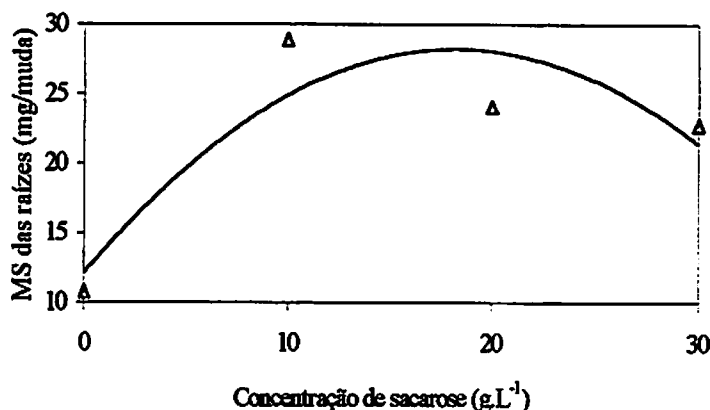
Somente houve efeito do selamento sobre o número de raízes primárias. As mudas enraizadas em frascos selados com tampa plástica apresentaram número significativamente maior de raízes primárias (8,22 raízes/muda) em relação às mudas enraizadas em frascos selados com algodão. Provavelmente, a perda de água no meio de enraizamento em frascos selados com algodão contribuiu para a menor formação de raízes adventícias.



Equações:	
$Y_{Tampa} = 47,554 + 1,717x$	$r^2 = 0,7279$
$Y_{Algodão} = 47,262 + 15,521x - 0,475x^2$	$r^2 = 0,9847$

FIGURA 3.14. Efeito da sacarose no meio de cultura e do selamento durante o enraizamento sobre a matéria seca (MS) da parte aérea de mudas de macieira 'Marubakaido' após a aclimatização. Lavras, UFLA, 1999.

A matéria seca das raízes somente foi afetada pelos fatores isolados, sendo significativamente superior quando utilizado o algodão para o selamento dos frascos, em relação ao uso da tampa plástica (26,40 e 16,86 mg/muda, respectivamente). Considerando a média dos dois tipos de selamento, o maior peso da matéria seca das raízes ocorreu com a concentração de 18,4 g.L⁻¹ de sacarose (Figura 3.15). Com base nestes resultados, pode-se afirmar que, quando utilizado o algodão, as mudas desenvolveram-se em ambiente com maior intensidade de trocas gasosas, favorecendo a fotossíntese e o crescimento durante a aclimatização, o que indica esta técnica como promissora para obtenção de melhores resultados quando da transferência das mudas para casa de vegetação.



Equação:

$$Y = 12,123 + 1,765 x - 0,048 x^2$$

$$r^2 = 0,8026$$

FIGURA 3.15. Efeito da sacarose no meio de cultura durante o enraizamento sobre a matéria seca das raízes de mudas de macieira 'Marubakaido' após a aclimatização. Média de duas condições de selamento. Lavras, UFLA, 1999.

Observa-se que, embora o número de raízes primárias não tenha sido afetado pela sacarose, houve efeito sobre a matéria seca das raízes, o que indica resposta sobre o crescimento em extensão ou ramificação das raízes nas diferentes concentrações de sacarose. Este efeito, por sua vez, está associado ao crescimento em altura e matéria seca da parte aérea, como já foi mencionado.

Uma das limitações ao uso do selamento com algodão é a desidratação do meio e, por consequência, das mudas dentro dos frascos de cultura. Isto acarreta a necessidade de monitoramento da perda de peso do conjunto frasco + muda + meio de cultura. No caso do presente trabalho, estabeleceu-se a partir de ensaios anteriores, o nível de 8% de perda de peso para reposição do meio (água+ágar 3,0 g.L⁻¹, sem nutrientes ou fitorreguladores), o que correspondeu a intervalos de 14 dias entre reposições. É possível que fossem obtidos melhores resultados com o selamento com algodão adotando-se intervalos menores entre reposições. Porém, isto acarreta aumento de mão-de-obra e do risco de contaminação. Uma alternativa para se obter o principal benefício do selamento com algodão consiste no uso desta técnica apenas na fase final do enraizamento “in vitro” (1 a 2 semanas), caracterizando uma forma de pré-aclimatização, como será discutido no próximo capítulo.

Considerações gerais



Embora o açúcar não seja o componente de custo mais elevado no preparo do meio de cultura, a redução da sua concentração pode ser economicamente interessante, especialmente em sistemas de produção comercial de mudas. Nos dois experimentos, foi possível verificar que a redução do teor de sacarose de 30 para 10-20 g.L⁻¹ em geral beneficia o enraizamento “in vitro” e outras variáveis relacionadas. Apesar disso, teores mais elevados de sacarose no

meio de enraizamento criam condições mais favoráveis à aclimatização das mudas. Dessa forma, ao preparar a muda para a aclimatização, pode-se usar elevadas concentrações de sacarose que, sem prejudicar o enraizamento das mudas, aumentam o acúmulo de matéria seca e de carboidratos facilmente assimiláveis, como o amido, que serão úteis como substâncias de reserva, principalmente nas etapas iniciais após a repicagem das mudas para a casa de vegetação. De igual modo, o selamento com algodão pode ser utilizado nas fases finais do enraizamento “*in vitro*”, pois permite que haja aumento do intercâmbio de gases, principalmente O₂, CO₂ e vapor d’água, entre a atmosfera do recipiente de cultivo e a da sala de crescimento. Grattapaglia e Machado (1998) mencionaram que, embora as tampas que vedam totalmente o frasco de cultura sejam úteis para prevenir contaminações, não permitem que ocorram trocas gasosas adequadas. Dessa forma, há redução da umidade relativa do ar, favorecendo o funcionamento estomático e a síntese de ceras epicuticulares, bem como o aumento da atividade fotossintética, ainda durante o cultivo *in vitro*. É importante ressaltar que se o selamento com algodão for feito antecipadamente, há intensa perda de água do meio de cultura, inviabilizando a sobrevivência dos explantes ou requerendo a reposição periódica do meio de cultura.

4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nos experimentos, conclui-se que:

- a) a sacarose nos meios de multiplicação e de enraizamento afeta a morfogênese e o crescimento “*in vitro*”, bem como a sobrevivência e o crescimento durante a aclimatização de mudas do porta-enxerto ‘Marubakaido’;

- b) a concentração de 45 g.L⁻¹ no meio de multiplicação permite a obtenção do maior rendimento de microestacas do porta-enxerto 'Marubakaido';
- c) concentrações mais baixas (10 a 30 g.L⁻¹) de sacarose no meio de enraizamento proporcionam melhor formação de raízes "in vitro" e elevadas concentrações (45 a 60 g.L⁻¹) aumentam a sobrevivência e o crescimento durante a aclimatização.
- d) em relação ao selamento convencional, o uso de algodão favorece o crescimento das mudas durante a aclimatização.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIASI, L.A. Avaliação do desenvolvimento inicial de porta-enxertos e de mudas de videira obtidos através de diferentes métodos de propagação. Piracicaba, ESALQ, 1996, 177p. (Tese - Doutorado em Agronomia)
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.) Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998, p.87-132
- CAMPOS, P.S.; PAIS, M.S. Mass propagation of the dwarf rose cultivar "Rosamini". *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.43, n.4, p.321-330, 1990.
- CHENG, B.; PETERSON, C.M.; MITCHELL, R.J. The role of sucrose, auxin and explant source on in vitro rooting of seedling explants of *Eucalyptus sideroxylon*. *Plant Science*, Limerick, v.87, n.2, p.207-214, 1992.
- CORRÊA, D. de M. Enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira (*Malus domestica*, Borkh.). Lavras: ESAL, 1990, 50p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia)

- DEBERGH, P.C. Control of *in vitro* plant propagation. In: I SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGIA DE PLANTAS (Piracicaba:1988) Anais... Piracicaba, CEBTEC-FEALQ-USP, p.13-19, 1988.
- DENG, R.; DONNELLY, D.J. *In vitro* hardening of red raspberry by CO₂ enrichment and reduced medium sucrose concentration. *HortScience*, Alexandria, v.28, n.10, p.1048-1051, 1993.
- DE RIEK, J. et al. Carbon metabolism in micropropagation systems: the importance of photosynthesis in heterotrophic systems. 5th FORUM FOR APPLIED BIOTECHNOLOGY, Abstracts..., Gent, p.1437-1444, 1991. (Resumo em CAB Abstracts 1993-94)
- DE RIEK, J.; PIQUERAS, A.; DEBERGH, P.C. Sucrose uptake and metabolism in a double layer system for micropropagation of *Rosa multiflora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.47, n.3, p.269-278, Jan. 1997.
- DIMASSI-THERIOU, K.; BOSABALIDIS, A.M. Effects of light, magnesium and sucrose on leaf anatomy, photosynthesis, starch and total sugar accumulation, in kiwifruit cultivates *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.47, n.2, p.127-134, Jan.1997.
- FLORES, R.; LESSA, A.O.; PETERS, J.A.; FORTES, G.R.de L. Avaliação do efeito da sacarose e benomyl na multiplicação *in vitro* de *Malus prunifolia*. II ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL (Gramado: 1997). Programa e Resumos... Gramado, FAO-REDBIO/EMBRAPA/UFRGS, p.150, 1997.
- FORTES, G.R. de L. Calogênese e organogênese *in vitro* de macieira (*Malus* spp.) afetadas por fatores físicos, químicos e biológicos. Viçosa: UFV, 1992, 163p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia)
- FUJIWARA, K.; KOZAI, T.; WATANABE, I. Development of a photoautotrophic tissue culture system for shoots and/or plantlets at rooting and acclimatization stages. *Acta Horticulturae*, Wageningen, n.230, p.153-158, 1988.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998, p.183-260.

GRIBAUDO, I.; FRONDA, A. L'ambientamento delle piante frutticole micropropagate. *Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura*, Bologna, v.51, n.1, p.75-80, 1993.

GROUT, B.W.; MILLAN, S. Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. *Annals of Botany*, Montreal, v.55, n.2, p.129-154, 1985.

HAYASHI, M.; NAKAYAMA, M.; KOZAI, T. An application of the acclimatization unit for growth of carnation explants, and for rooting and acclimatization of the plantlets. *Acta Horticulturae*, Wageningen, n.230, p.189-194, 1988.

KOZAI, T.; KOYAMA, Y.; WATANABE, I. Multiplication of potato plantlets *in vitro* with sugar free medium under high photosynthetic photon flux. *Acta Horticulturae*, Wageningen, n.230, p.121-127, 1988.

KOZAI, T.; KUBOTA, C.; WATANABE, I. Effects of basal medium composition on the growth of carnation plantlets *in vitro* auto- and mixotrophic tissue culture. *Acta Horticulturae*, Wageningen, n.230, p.159-166, 1988.

LEITE, G.B. Efeito de reguladores de crescimento, substratos, sacarose e intensidade luminosa na micropropagação e pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Bartlett e do clone OH x F97. Pelotas: UFPEL, 1995, 50p. (Dissertação-Mestrado em Agronomia)

MATTOS, E.B. de. Enraizamento *in vitro* de brotações de macieira (*Malus domestica*, Bork), cvs. Golden Delicious e Gala e porta-enxerto MM-106. Pelotas, UFPEL, 1982, 45p. (Dissertação - Mestrado em Ciências Agrárias)

PIERIK, R.L.M. Handicaps for the large scale commercial application of micropropagation. *Acta Horticulturae*, Wageningen, n.230, p. 63-71, 1988.

- SEKO, Y.; NISHIMURA, M. Effect of CO₂ and light on survival and growth of rice regenerants grown *in vitro* on sugar-free medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.46, n.3, p.257-264, Sep. 1996.
- SERRET, M.D. et al. The effect of different closure types, light and sucrose concentrations on Carbon isotope composition and growth of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation and subsequent acclimation *ex vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.47, n.3, p.217-230, Jan. 1997.
- SILVA, A.T. da. et al. Multiplicação vegetativa da 'amoreira-preta' (*Rubus idaeus* L.). II. Análise dos componentes do sistema de proteção. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 15, n.2, p.9-13, 1993.
- SIMMONDS, J. Direct rooting of micropropagated M-26 apple rootstock. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.21, n.3, p.233-242, 1983.
- VAN TELGEN, H.J.; VAN MIL, A.; KUNNEMAN, B. Effect of propagation and rooting conditions on acclimatization of micropropagated plants. **Acta Botanica Neerlandica**, Amsterdam, v.41, n.4, p.453-459, 1992.
- WAINWRIGHT, H.; SCRACE, J. Influence of *in vitro* preconditioning with carbohydrates during the rooting of microcuttings or *in vivo* establishment. **Scientia Horticulturae**, Wageningen, v.38, n.3-4, p. 261-267, 1989.
- WARDLE, K.; DOBBS, E.B.; SHORT, K.C. *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.108, n.3, p.386-389, 1983.

CAPÍTULO 4

PRÉ-ACLIAMATIZAÇÃO DE MUDAS MICROPROPAGADAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA 'MARUBAKAIDO'

Resumo: Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de técnicas de pré-aclimatização na sobrevivência e crescimento inicial de mudas micropropagadas de macieira 'Marubakaido' durante a aclimatização. O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da UFLA (Lavras, MG) Foram utilizadas brotações previamente mantidas *in vitro*, as quais foram enraizadas em meio de cultura com os sais de MS, acrescido de glicina, vitaminas e mio-inositol. Foram testados os seguintes métodos de pré-aclimatização, em quatro experimentos: poda de raízes, abertura antecipada dos frascos, selamento dos frascos com algodão, manutenção das mudas nos frascos em casa de vegetação, manutenção das mudas sob baixa temperatura (5°C) e tratamento com ácido giberélico (GA₃). Após os tratamentos de pré-aclimatização, as mudas foram transferidas para casa de vegetação com nebulização intermitente. As avaliações foram realizadas antes e após a pré-aclimatização, bem como ao final do período de aclimatização. A poda de raízes não prejudicou o crescimento das mudas e facilitou a repicagem para o substrato de aclimatização. A abertura antecipada dos frascos não proporcionou ganhos em sobrevivência ou crescimento das mudas após estas serem aclimatizadas. O selamento dos frascos com algodão e a manutenção das mudas nos frascos em casa de vegetação prejudicaram a sobrevivência e o crescimento das mudas. A manutenção das mudas sob baixa temperatura proporcionou bons resultados, especialmente a partir de 96 unidades de frio (4 dias). A aplicação de GA₃ em concentrações de 28-33 mg.L⁻¹ favoreceu o crescimento das mudas, especialmente por aumentar o comprimento dos internódios.

Palavras-chave: *Malus*, Rosaceae, Cultura de Tecidos, Aclimatização, Ácido Giberélico, Endurecimento

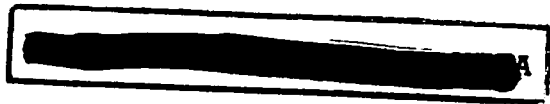
PRE-ACCLIMATIZATION OF MICROPROPAGATED 'MARUBAKAIDO' APPLE ROOTSTOCK PLANTLETS

Abstract: The objective of the present work was to evaluate the effect of pre-acclimatization techniques on survival and initial growth of micropropagated 'Marubakaido' apple rootstock plantlets during acclimatization. The work was carried out at the Tissue Culture Laboratory of the UFLA (Lavras, MG, Brazil). *In vitro* shoots rooted in MS culture medium supplemented with glycine, vitamins and myo-inositol were used. The following pre-acclimatization methods: pruning of adventitious roots, pre-opening of the culture recipients, recipients sealed with cotton, plantlets maintained inside recipients in a greenhouse, plantlets maintained under low temperature (5°C) and treatment with gibberellic acid (GA₃) were tested in four experiments. After pre-acclimatization treatments, rooted plantlets were transferred to greenhouse with intermittent nebulization. The evaluations were performed prior and after pre-acclimatization, as well as at the end of the acclimatization period. Pruning of adventitious roots had no effect on plantlets growth and facilitated the transference to the acclimatization substrate. Pre-opening of the culture recipients did not provide an increase of plantlets survival or growth after acclimatization. Recipient sealing with cotton and plantlet maintenance in greenhouse harmed both plantlet survival and growth. Plantlets maintained under low temperature provided good results, especially starting from 96 cold units (4 days). Use of GA₃ with concentrations of 28-33 mg.L⁻¹ favored plantlet growth by increasing the length of their internodes.

Key words: *Malus*, Rosaceae, Tissue Culture, Acclimatization, Gibberellic Acid, Hardening

1 INTRODUÇÃO

Para tornar a micropropagação eficiente na produção de mudas em sistemas comerciais, é necessária a definição de um protocolo que inclua a fase de aclimatização que, com frequência, limita a aplicação desta técnica.



Conforme Howard e Oehl (1981), para a efetiva exploração das técnicas de micropropagação, os problemas associados com a transferência para o ambiente natural devem ser superados, bem como deve ser obtido crescimento rápido, similar ao de plantas propagadas por métodos convencionais.

A pré-aclimatização, ou endurecimento, consiste de técnicas que permitam tornar o ambiente *in vitro* semelhante ao ambiente natural, bem como manusear a muda para favorecer a sua sobrevivência e crescimento (George, 1993). A pré-aclimatização é, portanto, um instrumento que pode ser utilizado para aperfeiçoar os protocolos de micropropagação e, por consequência, aumentar o rendimento na produção de mudas.

Em diversos estudos, têm sido abordada a pré-aclimatização de mudas. Deng e Donnelly (1993) e Dami e Hughes (1997) citam, como métodos de pré-aclimatização, o aumento do intercâmbio de gases entre o recipiente e o meio externo pelo afrouxamento ou retirada das tampas dos recipientes de cultivo, o incremento da concentração de CO₂ no recipiente, o aumento da luminosidade e o uso de retardantes do crescimento. Smith et al. (1992) citam três procedimentos para o endurecimento de plantas durante o estágio de enraizamento, os quais favorecem ou até evitam a necessidade de aclimatização: a) proteção das raízes em “plugs” de celulose; b) uso de retardantes de crescimento e c) uso de recipientes com baixa umidade relativa do ar. O tempo ideal para a pré-aclimatização é de 4 a 5 dias, podendo ir até 6 a 9 dias, e apresenta como vantagens a economia de trabalho, tempo e espaço, quando comparada aos métodos convencionais (George, 1993).

Quanto à redução da umidade do ar, Brainerd e Fuchigami (1981) observaram que as folhas de plantas de macieira ‘Mac-9’ cultivadas *in vitro* podem ser aclimatizadas sob baixa umidade relativa do ar (30-40% por 4 a 5 dias) e que esta forma de pré-aclimatização favorece o desenvolvimento de

[REDACTED]

rápida resposta estomática. A alta umidade nos frascos de cultura é um dos principais fatores que contribuem para a pouca formação de ceras epicuticulares na superfície das folhas (Grout e Aston, 1977) e pode ser induzida em folhas *in vitro* reduzindo-se a umidade relativa durante a formação de folhas (Sutter e Langhans, 1982 e Wardle, Dobbs e Short, 1983). Segundo Broome e Zimmerman (1984), a remoção da tampa dos tubos auxilia as trocas gasosas e pode favorecer a sobrevivência *ex vitro* quando as plantas são transferidas para ambiente com baixa umidade e substrato poroso. Jones et al. (1985) colocaram brotações de macieira no meio de enraizamento durante 4 semanas, sendo que os frascos foram destampados 3 dias antes da transferência para a casa de vegetação. Quando bem enraizadas, as mudas foram transferidas para casa de vegetação, obtendo-se mais de 80% de sobrevivência.

No que se refere à poda de raízes, possivelmente as raízes adventícias emitidas *in vitro* são de pouca função na absorção de água e nutrientes. Conforme foi mencionado por George (1993), as conexões vasculares entre as raízes e as brotações podem ser inadequadas quando da transferência para a casa de vegetação, causando baixo fluxo de água e nutrientes no sentido ascendente, e de carboidratos para as raízes, no sentido descendente. Assim, é possível que, podendo-se as mesmas no momento da repicagem, novas raízes mais eficientes sejam emitidas. A poda das raízes mais longas, segundo Grattapaglia e Machado (1998), facilita a repicagem para o substrato e a lavagem das raízes para retirada do meio de cultura.

A aplicação de giberelinas, associada ou não ao uso de baixas temperaturas quando da aclimatização, foi testada por Howard e Oehl (1981) em *Prunus insittia*, por Druart e Gruselle (1986) em *P. domestica* e por Ponchia e Gardiman (1993) em *P. laurocerasus*, obtendo-se aumento da

sobrevivência e do crescimento, devido à quebra da dormência inicial das gemas em mudas micropropagadas e ao aumento do crescimento dos internódios (Mohr e Schopfer, 1995). Isutsa, Pritts e Mudge (1998) obtiveram efeito favorável à aclimatização de mudas de porta-enxertos de macieira ao utilizarem o tratamento com frio (3,3°C durante 4 semanas) e o ácido giberélico. Estes autores mencionam que a dormência das gemas após o enraizamento de brotações ocorre com frequência na aclimatização das mudas.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de técnicas de pré-aclimatização, visando o aumento da sobrevivência e do crescimento inicial durante a aclimatização de mudas do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' produzidas *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo geral das condições de cultivo *in vitro* utilizado nos experimentos está descrito no Capítulo 1. Este trabalho foi constituído de quatro experimentos, quais sejam:

Experimento 1 - Pré-aclimatização e poda de raízes na aclimatização de mudas micropropagadas de macieira 'Marubakaido'

Neste experimento, foram testados quatro períodos de pré-aclimatização (abertura antecipada dos frascos, antes da transferência das mudas para a casa de vegetação), combinados ou não com a poda de raízes.

Para tanto, foram utilizadas brotações apicais, com ápice meristemático, com 2-3 cm de comprimento, 4-5 gemas e um par de folhas

apicais. Como meio de cultura para o enraizamento *in vitro*, foi utilizado o meio MS acrescido de vitaminas ($1,5 \text{ mg.L}^{-1}$), glicina ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$), mio-inositol (100 mg.L^{-1}), ágar (7 g.L^{-1}), sacarose (30 g.L^{-1}) e AIB ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$). Os explantes foram mantidos neste meio por 47 dias para que se formasse um grande volume de raízes adventícias. A seguir, todos os frascos foram destampados e mantidos na sala de crescimento por períodos de 0, 24, 48 e 72 horas, sendo que, após cada período, foi feita a poda das raízes em metade das plantas. A poda das raízes consistiu na retirada, com tesoura, de cerca de 50% do volume de raízes, após lavagem do sistema radicular com água destilada. Após a poda, as mudas foram repicadas para substrato comercial (Plantmax) + vermiculita (1:1 v/v) acondicionado em bandejas de Isopor com 72 células (120 cm^3) e aclimatizadas em casa de vegetação com nebulização intermitente durante 42 dias.

No momento da repicagem, foram avaliados a altura, o número de raízes primárias e secundárias e o comprimento das raízes das mudas, a partir de uma amostra de 5 mudas por tratamento.

Após a aclimatização, foram avaliadas a altura, percentagem de sobrevivência, comprimento das raízes primárias, número de raízes primárias, número de raízes secundárias e matéria seca da parte aérea e das raízes das mudas.

Foi adotado o delineamento experimental inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 4×2 , com 4 repetições de 6 mudas cada. Os dados de número de raízes secundárias foram transformados segundo a equação $\log(x+1)$. Após análise da variância, os tratamentos foram comparados através do teste de Tukey (fator poda de raízes) e da análise de regressão (fator período de pré-aclimatização).

Experimento 2 - Uso do ácido giberélico e do frio na quebra de dormência de gemas durante a aclimatização de mudas de macieira 'Marubakaido'

Foram avaliados, neste experimento, os efeitos de quatro concentrações de ácido giberélico (GA_3), combinados ou não com a permanência em frio antes da aclimatização. Brotações apicais, com 2 pares de folhas e meristema apical e com 2-3 cm de comprimento, foram repicadas para meio de cultura com metade da concentração dos sais de MS, acrescido de vitaminas ($1,5 \text{ mg.L}^{-1}$), glicina ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$), mio-inositol (100 mg.L^{-1}), ágar (7 g.L^{-1}), sacarose (30 g.L^{-1}) e AIB ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$). Foram repicadas 7 brotações por frasco de 250 cm^3 , as quais foram colocadas em sala de crescimento durante 45 dias. Após o período de enraizamento, metade dos frascos foram colocados em câmara do tipo BOD, com temperatura de 5°C e fotoperíodo de 16 horas durante 5 dias, correspondendo a 120 unidades de frio (Escobar, 1988). O restante dos frascos foi levado diretamente para aclimatização em casa de vegetação com sistema de nebulização intermitente, sendo retiradas as mudas e lavadas as raízes com água destilada, avaliando-se a seguir a altura, área foliar, matéria seca da parte aérea, número de raízes primárias e matéria seca das raízes das mudas, a partir de uma amostra de 2 mudas por repetição. A área foliar foi determinada pelo método das fotocópias (Benincasa, 1988). Após, as mudas foram tratadas com GA_3 , nas concentrações de 0, 20, 40 e 60 mg.L^{-1} . Este tratamento foi efetuado apenas na parte aérea, através da imersão na solução do fitorregulador durante 2 minutos. Para melhor eficiência do tratamento, o excesso de umidade da parte aérea das mudas foi previamente retirado com papel toalha. Após o período de frio, as mudas foram manuseadas da mesma forma que as mudas sem frio e, então, tratadas com GA_3 . A repicagem das mudas foi feita em substrato comercial (Plantmax) acondicionado em bandejas de Isopor com 72 células de 50 cm^3 cada.

O período de aclimatização foi de 42 dias. Após a aclimatização, foram avaliadas as seguintes variáveis: altura, sobrevivência, área foliar, percentual de mudas com mais de um internódio, comprimento médio dos internódios, matéria seca da parte aérea, número de raízes primárias e matéria seca das raízes das mudas, sendo a área foliar determinada pelo método das fotocópias.

Foi adotado o delineamento experimental inteiramente ao acaso, com 4 repetições e 8 plantas por repetição, em esquema fatorial 2 x 4. O efeito do frio foi estudado através do Teste de Tukey e o efeito das concentrações de ácido giberélico, através de análise de regressão.

Experimento 3 - Formas de pré-aclimatização de mudas de macieira 'Marubakaido' no final do período de enraizamento *in vitro*

Neste experimento, foram avaliadas 4 formas de pré-aclimatização das mudas durante a fase final de enraizamento *in vitro* das brotações. Brotações apicais, com meristema e 2 a 3 pares de folhas apicais, foram tratadas durante 15 segundos com AIB (200 mg.L^{-1}) e após, colocadas em meio de cultura com metade da concentração dos sais de MS e acrescido de vitaminas ($1,5 \text{ mg.L}^{-1}$), glicina ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$) mio-inositol (100 mg.L^{-1}), ágar (7 g.L^{-1}) e sacarose (30 g.L^{-1}), em frasco com 30 ml de meio de cultura. Após 25 dias em sala de crescimento, as brotações em enraizamento, sem serem retiradas dos frascos, foram submetidas aos seguintes tratamentos de pré-aclimatização: a) manutenção em câmara tipo BOD (5°C e fotoperíodo de 16 horas); b) cobertura dos frascos com algodão hidrófilo, mantidos em sala de crescimento; c) manutenção dos frascos intactos, em casa de vegetação, a pleno sol, e d) manutenção dos frascos em sala de crescimento (testemunha). O período de pré-aclimatização foi de 10 dias. Após, as mudas foram retiradas dos frascos, lavando-se as raízes com água destilada para retirar o excesso de meio de cultura. Após a pré-aclimatização, foram

avaliados o percentual de sobrevivência, a altura e a área foliar das mudas. A seguir, as mudas foram repicadas para bandejas de Isopor com 72 células de 120 cm³ cada, contendo substrato comercial (Plantmax). Após 28 dias de aclimatização, foram avaliadas as seguintes variáveis: altura, sobrevivência, área foliar, número de raízes primárias e matéria seca da parte aérea e das raízes. A área foliar foi determinada através do método das fotocópias.

Foi adotado o delineamento experimental inteiramente ao acaso, com 5 repetições e 8 plantas por repetição. Foi efetuada a transformação dos dados das variáveis área foliar [$\log(x+1)$], matéria seca da parte aérea e matéria seca das raízes (\sqrt{x}), avaliadas após a aclimatização. O efeito dos tratamentos foi estudado através do Teste de Tukey.

Experimento 4 – Efeito da permanência sob baixa temperatura na aclimatização de mudas micropropagadas de macieira ‘Marubakaido’

Foram testados, neste experimento, 5 períodos de permanência em frio, previamente à aclimatização, de mudas enraizadas *in vitro* do porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido’. Brotações apicais, com 2 pares de folhas, com meristema apical e 2-3 cm de comprimento foram repicadas para meio de cultura com metade da concentração dos sais de MS, acrescido de vitaminas (1,5 mg.L⁻¹), glicina (2,0 mg.L⁻¹), mio-inositol (100 mg.L⁻¹), ágar (7 g.L⁻¹), sacarose (30 g.L⁻¹) e AIB (1,0 mg.L⁻¹) durante 5 dias.

Após, as brotações foram transferidas para meio de desenvolvimento das raízes, semelhante ao anterior, porém sem AIB. Após o enraizamento (51 dias), as mudas, dentro dos frascos, foram submetidas aos tratamentos, que consistiram nos seguintes períodos de permanência em frio, correspondentes a unidades de frio (Escobar, 1988): 0 dias (0 unidades de frio ou UF), 2 dias (48 UF), 4 dias (96 UF), 6 dias (144 UF) e 8 dias (192 UF). O tratamento com frio foi efetuado

em câmara do tipo BOD, com temperatura de 5°C e fotoperíodo de 16 horas. Após a permanência sob baixa temperatura, as mudas foram retiradas dos frascos, sendo as raízes lavadas para retirar o meio de cultura aderido a elas. As mudas foram, então, levadas para casa de vegetação com nebulização intermitente, e repicadas para copos plásticos de cor azul (300 ml), sobre os quais foram colocados copos plásticos transparentes (400 ml) durante 10 dias, de modo a constituírem estufins individuais. Em cada copo, foi repicada uma muda.

As mudas foram mantidas em aclimatização durante 56 dias, quando foram avaliadas as seguintes variáveis: sobrevivência, altura, área foliar, matéria seca da parte aérea e das raízes das mudas. A área foliar foi determinada pelo método das fotocópias.

Foi adotado o delineamento experimental inteiramente ao acaso, com 4 repetições e 10 mudas por repetição. O efeito dos tratamentos foi estudado através da análise de regressão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1 – Pré-aclimatização e poda de raízes na aclimatização de mudas micropropagadas de macieira ‘Marubakaido’

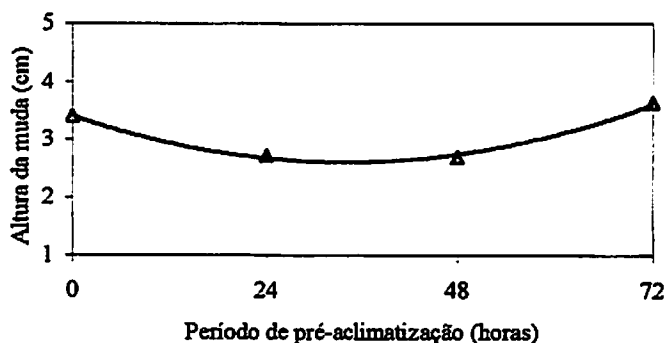
Na Tabela 4.1, são apresentados os valores de altura, número de raízes primárias, número de raízes secundárias e comprimento das raízes das mudas no momento da transferência para a casa de vegetação, logo após a poda do sistema radicular, obtidos com base em uma amostra de 5 mudas por tratamento. Como esta poda afetou principalmente as raízes mais longas, somente foi afetado o comprimento da maior raiz, sem efeito sobre as demais variáveis. Desse modo,

diferenças de valores nos tratamentos com e sem poda de raízes podem ser atribuídos à amostragem.

TABELA 4.1. Altura, número de raízes primárias e secundárias e comprimento das raízes em mudas de macieira 'Marubakaido' enraizadas *in vitro* e submetidas à poda do sistema radicular. Valores obtidos na transferência para a casa de vegetação. Lavras, UFLA, 1999.

Poda das raízes	Altura da muda (cm)	Número de rzs. primárias	Número de rzs. secundárias	Comprimento das raízes (cm)
Sem	1,63	5,48	19,30	4,17
Com	1,60	6,55	18,06	1,34

A altura das mudas após a aclimatização foi afetada de forma negativa apenas pelo período de pré-aclimatização (Tabela 1.C - Anexo). Houve ajuste dos dados à regressão quadrática (Figura 4.1), obtendo-se os maiores valores de altura das mudas com 0 e 72 horas de pré-aclimatização e o menor, com 34,28 horas.



Equação:

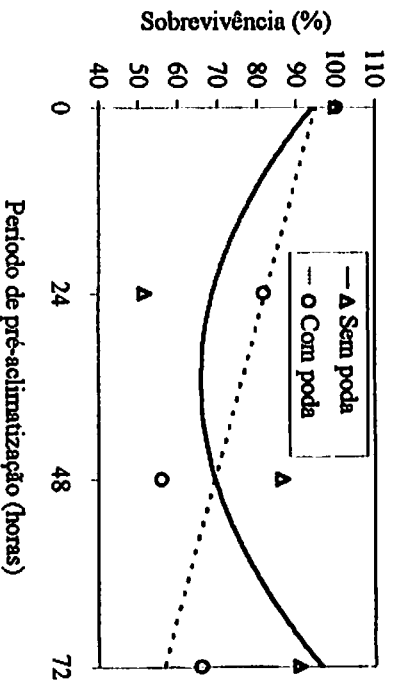
$$Y = 3,409 - 0,048x + 0,0007x^2$$

$$r^2 = 0,9924$$

FIGURA 4.1. Efeito do período de pré-aclimatização sobre a altura das mudas de macieira 'Marubakaido' após 42 dias de aclimatização. Lavras, UFLA, 1999.

Este comportamento pode estar relacionado ao fato de que, com 24 e 48 horas após a abertura dos frascos, houve intenso dessecamento das folhas e do ápice das brotações, com reflexos diretos sobre a altura final das mudas. Não havendo a pré-aclimatização (0 horas), não houve dessecamento e esta altura foi mais elevada. Com 72 horas, é possível que a muda estivesse mais habituada a um déficit hídrico moderado devido à redução da umidade relativa do ar e à desidratação parcial do meio de cultura, permitindo que a altura final da muda, após a aclimatização, fosse equivalente ao do tratamento testemunha (0 horas). Warldle, Dobbs e Short (1983), visando diminuir o dessecamento do meio de cultura em recipientes de cultivo *in vitro*, colocaram uma camada de lanolina sobre o meio. Isto, porém, aumenta a mão-de-obra, o risco de contaminação e o custo de manejo da cultura. Brainerd e Fuchigami (1981), trabalhando com aclimatização de mudas de macieira, observaram que as células foram injuriadas com 50% de perda de água, o que ocorreu de 15 a 30 minutos após a excisão das folhas retiradas de plantas *in vitro*. Sciutti e Morini (1993) expuseram explantes de *Prunus cerasifera* mantidos *in vitro* a valores de umidade relativa do ar de 70 a 100% durante a proliferação e enraizamento. A redução da umidade relativa do ar causou diminuição gradual no número de brotações e na matéria seca das mesmas, enquanto o teor de clorofila e os valores de diversos parâmetros anatômicos foliares foram favorecidos. O enraizamento e o crescimento das brotações enraizadas tiveram decréscimo significativo, mas a sobrevivência durante a aclimatização foi incrementada.

Com relação à sobrevivência das mudas, houve interação significativa entre os fatores estudados (Tabela 1.C). Quando não efetuada a poda, houve ajuste a uma regressão quadrática (Figura 4.2), estando os pontos máximos localizados nos períodos extremos de duração da pré-aclimatização, afetada de modo semelhante ao observado com a altura das mudas.



Equações:
 $Y_{sem} = 94,292 - 1,609 x + 0,0228 x^2$
 $Y_{com} = 95,084 - 0,535 x$

$r^2 = 0,5150$
 $r^2 = 0,7366$

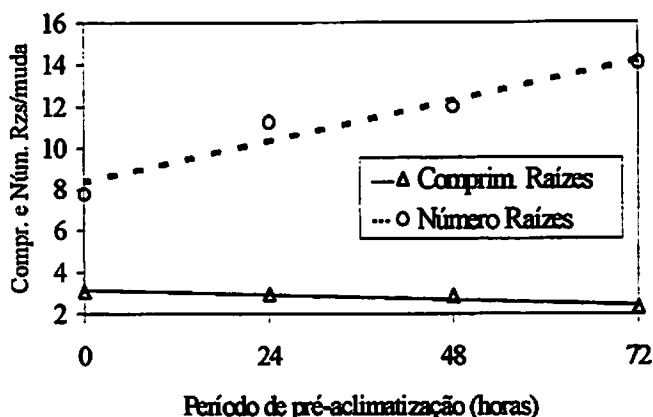
FIGURA 4.2. Efeito do período de pré-aclimatização sobre o percentual de mudas sobreviventes de macieira 'Marubakaido' após 42 dias de aclimatização. Lavras, UFPA, 1999.

Assim, o dessecação das folhas pode ter afetado negativamente a sobrevivência, contrastando com o que foi observado por Sciutti e Morini (1993). Esta diferença pode ser devida à desidratação do meio de cultura e à redução brusca e intensa da umidade relativa do ar, embora, como é mencionado por Deng e Donnelly (1993), as mudas endurecidas pela redução da umidade relativa do ar sobrevivam mais e tolerem melhor as condições ambientais externas.

Entretanto, quando efetuada a poda, foi significativo o ajuste a uma tendência linear decrescente com o aumento do período de pré-aclimatização. É provável que, com a poda das raízes, fosse diminuída a superfície de absorção de água, o que, combinado com o dessecação da parte aérea provocado pela pré-aclimatização nos períodos de 24 horas ou mais, fosse causado um estresse, reduzindo a sobrevivência das mudas, conforme mencionado por Grattapaglia e

Machado (1998). Segundo Marin e Gella (1988), as raízes, por serem fontes de citocininas e por absorverem água e nutrientes, desempenham papel muito importante na aclimatização.

O comprimento das raízes foi afetado tanto pela poda quanto pela pré-aclimatização, sendo a interação entre os fatores não-significativa (Tabela 1.C). Em média, as mudas cujas raízes haviam sido inicialmente podadas apresentaram raízes com 2,02 cm de comprimento, ao passo que as mudas com raízes não-podadas apresentaram valores de 3,60 cm (com diferença significativa pelo Teste de Tukey ao nível de 5%). Em relação aos valores iniciais, observa-se que o incremento diferiu conforme o tratamento. Quando efetuada a poda das raízes, o comprimento ao longo do período de aclimatização foi reduzido em 13,7%, ao passo que, não sendo podadas, as raízes tiveram aumento médio de 50,7%. Isto ocorreu porque quando as mudas não têm as raízes podadas, é frequente a quebra das mesmas devido à sua fragilidade e ao seu grande comprimento. Quando é feita a poda das raízes, entretanto, há recuperação do volume radicular, acarretando aumento do comprimento médio. Em função disto, é possível afirmar que a poda facilita a repicagem das mudas, além de possibilitar a emissão de um sistema radicular renovado e, possivelmente, mais ativo para a absorção de água e nutrientes do que o sistema radicular emitido *in vitro*. Com o aumento do tempo de pré-aclimatização, houve decréscimo linear do comprimento das raízes (Figura 4.3), causado possivelmente pelo estresse devido ao dessecação do meio de cultura. Como é apresentado na mesma Figura, este mesmo estresse fez com que, provavelmente, fossem induzidas mais raízes primárias com o aumento do tempo de pré-aclimatização. O número de raízes primárias foi afetado apenas por este fator. O número de raízes secundárias não foi afetado pelos tratamentos, apresentando média de 48,62 raízes secundárias/muda.



Equações:

$$Y_{\text{Comprimento}} = 3,161 - 0,010 x$$

$$r^2 = 0,8123$$

$$Y_{\text{Número de Raízes}} = 8,344 + 0,081 x$$

$$r^2 = 0,9381$$

FIGURA 4.3. Efeito do período de pré-aclimatização sobre o comprimento médio e número de raízes de mudas de macieira 'Marubakaido' após 42 dias de aclimatização. Lavras, UFLA, 1999.

Em relação à avaliação realizada no momento da transferência para a casa de vegetação, houve um incremento médio de 129,44% no número de raízes secundárias, superior ao incremento no número de raízes primárias (87,37%), caracterizando o padrão de ramificação radicular mais intenso do que a emissão de novas raízes.

A matéria seca da parte aérea e a matéria seca das raízes, diferentemente da altura das mudas, não diferiram significativamente em função dos tratamentos (Tabela 2.C).

Observou-se, ainda, que as raízes podadas manifestaram, como resposta à poda, em proporções equivalentes entre si, os seguintes padrões de ramificação radicular: a) emissão de raízes secundárias, a partir do ápice da raiz primária podada; b) continuação do crescimento, como raiz primária, após a poda, sem

que se pudesse distinguir a região do corte e c) emissão de novas raízes primárias a partir da base da muda. Em uma mesma muda, foi possível distinguir os diferentes padrões de crescimento.

Em função dos resultados obtidos, verifica-se que a pré-aclimatização, através da retirada das tampas dos frascos antes da aclimatização, não foi eficiente para aumentar a sobrevivência e o crescimento inicial das mudas. Porém, a poda de raízes, além de não prejudicar o crescimento das mudas, facilita a repicagem e permite o aumento do comprimento médio das raízes, o que pode favorecer o crescimento e estabelecimento posterior das mudas. Grattapaglia e Machado (1998) mencionam que o sistema radicular bem ramificado, embora aparentemente melhor, dificulta o transplante. Dami e Hughes (1997), através do uso de PEG 8000 (polietilenoglicol) a 2% (p/v) ao meio de enraizamento de brotações de videira, induziram o estresse hídrico controlado *in vitro*, como forma de pré-aclimatização. Após este tratamento, as folhas de plantas tratadas apresentaram maior deposição de cera epicuticular, além de serem observadas diferenças na configuração celular da epiderme entre os tratamentos. Tais alterações, morfológicas e fisiológicas, foram associadas com aumento da sobrevivência *ex vitro* após 4 semanas em casa de vegetação.

Experimento 2 - Uso do ácido giberélico e do frio na quebra de dormência inicial durante a aclimatização de mudas de macieira 'Marubakaido'

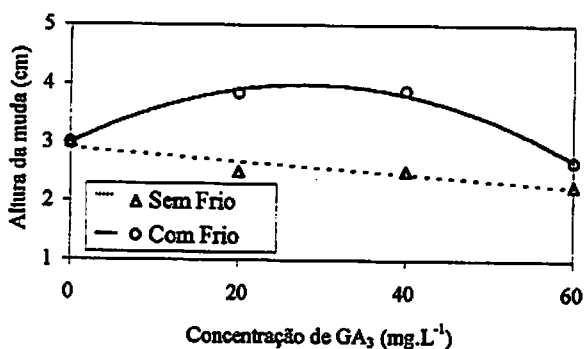
Na Tabela 4.2, são apresentados os valores iniciais, medidos nas plantas ao serem retiradas do cultivo *in vitro*.

TABELA 4.2. Valores iniciais de parâmetros do crescimento de mudas de macieira 'Marubakaido' quando da sua retirada do cultivo *in vitro*. Lavras, UFLA, 1999.

Parâmetro	Unidade	Valor médio
Altura da muda	cm	3,14
Área foliar	cm ² /muda	30,61
Matéria seca da parte aérea	g/muda	0,022
Número de raízes primárias	raízes/muda	9,39
Matéria seca das raízes	g/muda	0,021

Após 42 dias de aclimatização, foi efetuada a avaliação final do experimento.

Com relação à altura das mudas, houve efeito dos fatores e a interação foi significativa (Tabela 3.C), o que pode ser atribuído ao efeito fisiológico da giberelina, que provoca aumento do alongamento dos internódios (Davies, 1987 e Mohr e Schopfer, 1995). Porém, sem frio, a altura diminuiu linearmente com o aumento da concentração do ácido giberélico (Figura 4.4), embora esta diminuição tenha sido pouco marcante, indicando pequena resposta ao fitorregulador na ausência de frio. As baixas temperaturas aumentaram a biossíntese de giberelinas nas gemas (George, 1993) e isto favoreceu a resposta ao aumento das concentrações do GA₃. Druart e Gruselle (1986) mencionam que a quebra da dormência das gemas de *Prunus domestica* pode ser obtida apenas com uso do frio (3 semanas a 2°C), embora Rugini (1986) tenha obtido esta quebra da dormência somente pulverizando GA₃ (300 mg.L⁻¹) em mudas de oliveira. Kanavagh et al. (1993), aplicando o GA₃ por pulverização (100 mg.L⁻¹) em mudas de cerejeira durante a aclimatização, obtiveram efeito positivo do GA₃ e do frio na quebra da dormência e no alongamento dos internódios.



Equações:

$$Y_{\text{Sem frio}} = 2,894 - 0,0109 x$$

$$r^2 = 0,8435$$

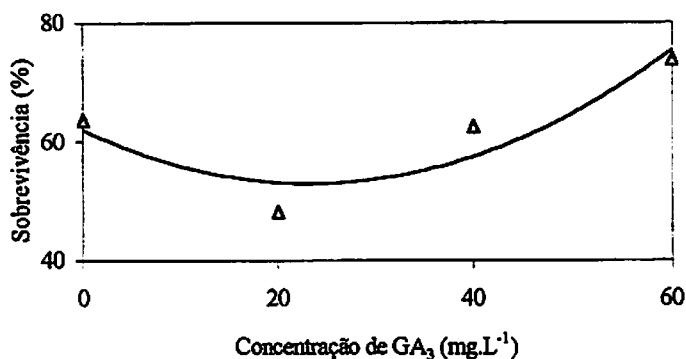
$$Y_{\text{Com frio}} = 2,985 + 0,0717 x - 0,0013 x^2$$

$$r^2 = 0,9912$$

FIGURA 4.4. Efeito da concentração de ácido giberélico (GA₃) sobre a altura de mudas de macieira 'Marubakaido' após 42 dias de aclimatização. Lavras, UFLA, 1999.

Já utilizando o frio, a regressão foi quadrática, estando o valor máximo para esta variável em 28,24 mg.L⁻¹. Como os fitorreguladores atuam em concentrações muito baixas, é provável que a concentração de 60 mg.L⁻¹ estivesse acima da ideal para as plantas, nesta condição de aplicação. Conforme é mencionado por Pasqual et al. (1997), os melhores resultados *in vitro* são obtidos com uso de 0,1 a 2,0 mg.L⁻¹. Como a aplicação, neste caso, foi efetuada *ex vitro*, a concentração ideal é superior às utilizadas no presente experimento.

A sobrevivência das mudas após a aclimatização foi afetada pelo frio e pelo GA₃ (Tabela 3.C e Figura 4.5). A permanência das mudas sob baixa temperatura durante 5 dias proporcionou sobrevivência média de 77,9%, ao passo que, sem este tratamento, a sobrevivência foi de 46,13%, sendo estes percentuais diferentes entre si (Teste de Tukey a 5%). Houve regressão quadrática em função dos níveis de GA₃, sendo o menor valor observado com 22,89 mg.L⁻¹.



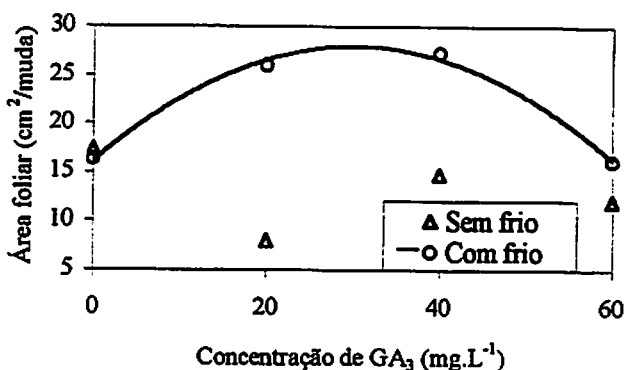
Equação:

$$Y = 62,041 - 0,778 x + 0,017 x^2$$

$$r^2 = 0,8357$$

FIGURA 4.5. Efeito da concentração de ácido giberélico (GA₃) no percentual de mudas sobreviventes de macieira 'Marubakaido' após 42 dias de aclimatização. Média de duas condições de temperatura para pré-aclimatização. Lavras, UFLA, 1999.

Com relação à área foliar, houve interação significativa entre os fatores estudados (Tabela 3.C). As mudas transferidas diretamente para a casa de vegetação apresentaram área foliar média de 13,03 cm²/muda, sem efeito significativo do GA₃. Já com as mudas pré-aclimatizadas, houve regressão quadrática significativa (Figura 4.6), estando o valor máximo na concentração de 30,3 mg.L⁻¹ de GA₃. As mesmas causas apontadas para o comportamento da altura da muda podem explicar a tendência observada com a área foliar, pois são variáveis afetadas pelos mesmos fatores. Como o frio atua na quebra da dormência das gemas (Rugini, 1986 e Mohr e Schopfer, 1995), isto facilitou a brotação e, por consequência, aumentou a área foliar.



Equação:

Média Sem Frio = 13,02 cm²/muda

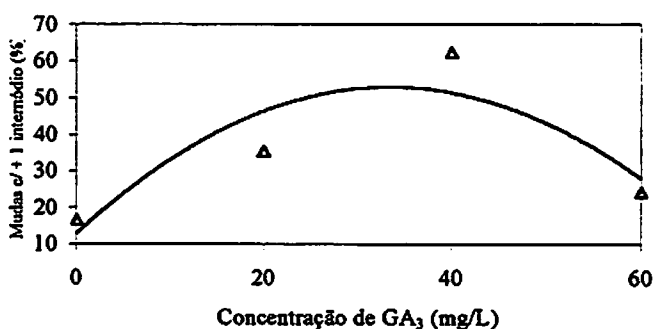
$Y_{\text{Com frio}} = 16,084 + 0,788 x + 0,013 x^2$

$r^2 = 0,9930$

FIGURA 4.6. Efeito da concentração de ácido giberélico (GA₃) sobre a área foliar de mudas de macieira 'Marubakaido' após 42 dias de aclimatização. Lavras, UFLA, 1999.

Howard e Oehl (1981) observaram que mudas de *Prunus insititia* produzidas *in vitro* tiveram o crescimento estimulado após o armazenamento das mesmas por 2 meses a 0°C antes da transferência ou após serem tratadas com 200 mg.L⁻¹ de ácido giberélico. No presente experimento, entretanto, houve efeito complementar entre o frio e o GA₃, provavelmente porque a concentração empregada do fitorregulador foi inferior à utilizada por esses autores, indicando que a biossíntese de giberelinas nas gemas, favorecida pelas baixas temperaturas (Mohr e Schopfer, 1995), contribuiu para que os níveis endógenos alcançassem valores próximos da concentração ideal. Kanavagh et al. (1993) observaram que, mesmo com a aplicação de solventes orgânicos, o tratamento com GA₃ não substituiu completamente o frio na aclimatização de mudas de cerejeira micropropagadas.

Somente quando utilizado o frio, o percentual de mudas com mais de um internódio foi afetado pela concentração de GA₃ (Tabela 3.C). Houve uma regressão quadrática para os níveis de GA₃ (Figura 4.7), sendo o maior valor encontrado quando utilizada a concentração de 33,47 mg.L⁻¹, o que está de acordo com o observado na altura e com a área foliar, pois as causas que afetam estas variáveis são semelhantes. O mesmo comportamento foi observado com o comprimento médio dos internódios (Tabela 4.C e Figura 4.8), obtendo-se o máximo comprimento com 33 mg.L. Um dos principais efeitos fisiológicos das giberelinas é o aumento do crescimento e, portanto, da distância dos internódios (Davies, 1987 e Mohr e Schopfer, 1995), e esta influência foi constatada no presente trabalho. Em geral, as mudas durante a aclimatização apresentaram-se sem internódios perceptíveis, sendo comum o aspecto de “roseta”. Esta condição, com frequência, permanece nas mudas após a aclimatização, prejudicando o crescimento e a obtenção de uma muda de boa qualidade.

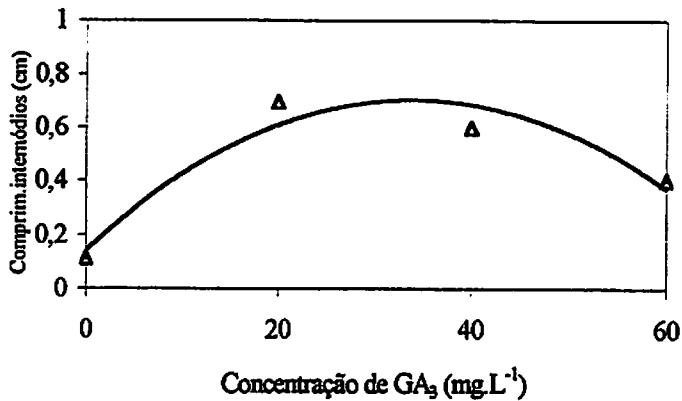


Equação:

$$Y = 13,006 + 2,390 x - 0,0357 x^2$$

$$r^2 = 0,7780$$

FIGURA 4.7. Efeito da concentração de ácido giberélico (GA₃) sobre o percentual de mudas pré-aclimatizadas de macieira ‘Marubakaido’ com mais de um internódio após 42 dias de aclimatização. Lavras, UFLA, 1999.



Equação:

$$Y = 0,143 + 0,033 x - 0,0005 x^2$$

$$r^2 = 0,9132$$

FIGURA 4.8. Efeito da concentração de ácido giberélico (GA₃) sobre o comprimento médio dos internódios de mudas pré-aclimatizadas de macieira 'Marubakaido' após 42 dias de aclimatização. Lavras, UFLA, 1999.

Howard e Oehl (1981) observaram que mudas de *Prunus insititia* submetidas ao frio e não tratadas com GA₃ apresentavam maior formação de ramos laterais. Este resultado não foi observado no presente experimento, em quaisquer tratamentos. A formação de um único ramo por planta é desejável, especialmente em se tratando de porta-enxertos. Os resultados obtidos neste trabalho são ratificados por Ponchia e Gardiman (1993), os quais observaram que, após o início da aclimatização, a pulverização das folhas de *Prunus laurocerasus* com GA₃ (145 μM) e a fertirrigação com nitrogênio foi útil para o aumento do crescimento inicial.

A matéria seca da parte aérea foi afetada apenas pelo tratamento com frio (Tabela 4.C), o que pode ser explicado, assim como para a área foliar, pelo aumento da brotação e, por consequência, da matéria seca da planta. As mudas

que permaneceram sob frio apresentaram, após a aclimatização, em média, 0,0888 g de matéria seca/muda, enquanto as transferidas diretamente da sala de crescimento para a casa de vegetação apresentaram 0,0654 g/muda (médias diferentes entre si pelo Teste de Tukey a 5%). Isto representa um incremento de 303,64% no acúmulo de matéria seca em mudas pré-aclimatizadas e de 197,27% em mudas sem pré-aclimatização. O ácido giberélico não teve efeito sobre esta variável, indicando que, embora afete o crescimento, este fitorregulador pode não acarretar incremento direto da acumulação de matéria seca, pois seu efeito fisiológico relaciona-se com o alongamento celular, ocasionado principalmente pelo aumento da vacuolização e do teor relativo de água. Este resultado está de acordo com o obtido por Isutsa, Pritts e Mudge (1998), que avaliaram o efeito do frio e do ácido giberélico sobre a quebra da dormência após o enraizamento de brotações de macieira. Segundo os autores, o tratamento com frio proporcionou aumento da acumulação de matéria seca, mas o efeito do tratamento com GA₃ foi de curta duração.

Com relação às variáveis relacionadas ao sistema radicular, não houve efeito dos fatores estudados (Tabela 4.C), sendo a média geral, após a aclimatização, de 12,6 raízes/muda (número de raízes primárias) e de 0,028 g/muda (matéria seca das raízes). É de se esperar pouco efeito do GA₃ e do frio sobre o crescimento de raízes, pois ambos atuam principalmente sobre o crescimento da parte aérea, o que pode explicar os resultados obtidos. Kanavagh et al. (1993) observaram que o ácido giberélico retardou o crescimento das raízes em concentrações superiores a 200 mg.L⁻¹.

É de interesse prático o aumento do tamanho da muda proveniente da cultura de tecidos, pois devido ao seu porte restrito, o manuseio torna-se mais difícil e o tempo para a produção comercial da muda é prolongado. O uso do GA₃ favorece o crescimento da muda em concentrações entre 28 a 33 mg.L⁻¹ desde que

combinado com a manutenção das mudas sob baixa temperatura (5°C durante 120 horas).

Experimento 3 – Formas de pré-aclimatização de mudas de macieira ‘Marubakaido’ durante o enraizamento *in vitro*

Para verificar o efeito dos tratamentos durante a pré-aclimatização, foi realizada a avaliação ao final deste período. A sobrevivência durante a pré-aclimatização foi afetada pelos tratamentos (Tabelas 5.C e 4.3). A permanência das mudas em casa de vegetação causou a morte de quase 23% das mudas, enquanto, nos demais tratamentos, 100% das mudas sobreviveram. Isto provavelmente é devido à elevada insolação, que causou estresse sobre as mudas, mesmo que elas fossem mantidas nos frascos fechados.

TABELA 4.3. Sobrevivência, altura, área foliar e número de raízes primárias de mudas de macieira ‘Marubakaido’ em quatro métodos de pré-aclimatização. Avaliação ao final de 10 dias de pré-aclimatização. Lavras, UFLA, 1999.

Tratamento	Sobrevivência (%)	Altura da muda (cm)	Área foliar (cm ² /muda)	Núm. Rzs. Primárias (rzs./muda)
Testemunha	100,00 a	2,32 a	7,52 a	5,94 a
Frio (BOD 5°C/10 dias)	100,00 a	2,05 ab	7,30 a	5,31 a
Selamento com algodão	100,00 a	1,72 bc	5,78 ab	5,95 a
Permanência em casa de vegetação	77,62 b	1,45 c	3,98 b	6,08 a

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Conforme é citado por George (1993), a diferença da intensidade de luz entre os ambientes *in vitro* e *ex vitro* acarreta danos às mudas e pode dificultar a

aclimatização. Em função disso, é requerido, nos estágios iniciais após a transferência, a permanência da muda sob sombreamento parcial, de modo que a intensidade luminosa na casa de vegetação seja reduzida em 50-90%, para propiciar luminosidade semelhante ou pouco superior à encontrada na sala de crescimento.

Com relação à altura das mudas, com a testemunha e com o tratamento com frio foram obtidos valores estatisticamente iguais, e com o selamento com algodão e a permanência em casa de vegetação, a altura das mudas ao final do período de pré-aclimatização foi inferior à dos demais tratamentos. Apesar da baixa temperatura na BOD, não houve diferença do crescimento em altura em relação à testemunha, podendo-se afirmar que este método de pré-aclimatização não acarreta prejuízo ao crescimento em extensão da muda. Com o algodão, impôs-se um estresse às plantas devido à redução da umidade relativa do ar no interior do recipiente, enquanto que, com a pré-aclimatização em casa de vegetação foi induzido o estresse pela excessiva luminosidade, comparativamente à encontrada no interior da sala de crescimento. De acordo com Dami e Hughes (1997), quando as mudas *in vitro* são submetidas a um estresse controlado, há benefícios sobre a aclimatização. Entretanto, no presente experimento, o estresse causado prejudicou a sobrevivência das mudas por ser muito intenso. No cultivo *in vitro* de *Delphinium* sp., a abertura de pequenos orifícios (78,5 mm²) nos frascos de cultura aumentou a perda de água, mas permitiu que a umidade relativa do ar fosse mantida superior a 95%, devido ao aumento no fluxo de vapor d'água, bem como aumentou o crescimento das mudas (Murphy et al., 1998). É provável que, reduzindo-se a área de perda de vapor d'água, o estresse fosse menor e os resultados, mais satisfatórios.

Relacionado ao comportamento das duas variáveis anteriores, a área foliar das mudas não diferiu significativamente entre a testemunha, frio e

selamento com algodão, mas foi estatisticamente inferior quando mantidas as mudas em casa de vegetação.

O número de raízes primárias não diferiu entre os tratamentos, devido ao fato de que os métodos de pré-aclimatização testados afetaram principalmente a parte aérea, sem influência sobre o sistema radicular previamente emitido das mudas.

A sobrevivência das mudas após a acclimatização não diferiu estatisticamente entre os tratamentos testemunha, frio e selamento com algodão, embora com a testemunha tenham sido obtidos valores pouco superiores aos demais tratamentos (Tabelas 6.C e 4.4).

TABELA 4.4. Sobrevivência, altura, área foliar e matéria seca (MS) da parte aérea de mudas de macieira 'Marubakaido' em quatro métodos de pré-acclimatização. Avaliação ao final da acclimatização. Lavras, UFLA, 1999.

Tratamento	Sobrevivência (%)	Altura da muda (cm)	Área foliar (cm ² /muda)	MS da parte aérea (g/muda)
Testemunha	81,91 a	2,91 a	11,20 a	0,0516 a
Frio (BOD 5°C/10 dias)	76,19 a	2,83 a	11,01 a	0,0507 a
Selamento com algodão	71,43 a	2,71 a	11,78 a	0,0530 a
Perm. casa de vegetação	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Mantendo-se as mudas em casa de vegetação, houve a morte da totalidade das mesmas. Provavelmente, o estresse pela luz causou a morte do restante das mudas pré-acclimatizadas em casa de vegetação, pois parte destas mudas (23%) já havia sido perdida durante o tratamento. Houve, também, pouco

efeito da redução da umidade relativa no tratamento 'selamento com algodão'. Sutter e Langhans (1982) mencionam que, com frequência, as quantidades de cera produzidas durante o endurecimento são pouco expressivas, de modo que as folhas são menos protegidas do que as folhas desenvolvidas no ambiente externo.

O efeito do tratamento de pré-aclimatização sobre a altura das mudas manteve-se após 42 dias de acclimatização, não sendo observadas diferenças entre a testemunha, frio e selamento com algodão (Tabela 6.C), as quais diferiram apenas da permanência em casa de vegetação, cuja altura foi nula, pois 100% das mudas morreram durante a acclimatização. Entretanto, conforme menciona Cuzzuol (1993), a vedação com chumaço de algodão reduz a umidade relativa do ar interna e contorna a morfogênese anormal dos explantes. Segundo o mesmo autor, a baixa umidade e a maior troca gasosa, permitidas pelo sistema de vedação com chumaços de algodão, tiveram grande contribuição na satisfatória taxa de sobrevivência durante a fase de acclimatização de mudas de cravo. O mesmo resultado foi observado com a área foliar e a matéria seca da parte aérea (Tabelas 7.C e 4.4), bem como com o número de raízes primárias e a matéria seca das raízes (Tabela 4.5).

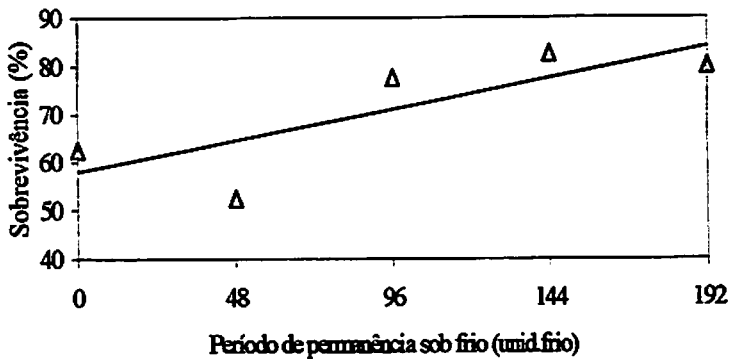
TABELA 4.5. Número de raízes primárias e matéria seca das raízes de mudas de macieira 'Marubakaido' em quatro métodos de pré-aclimatização. Avaliação ao final da aclimatização. Lavras, UFLA, 1999.

Tratamento	Número de raízes primárias (raízes/muda)	Matéria seca das raízes (g/muda)
Testemunha	10,54 a	0,0174 a
Frio (BOD 5°C/10 dias)	10,24 a	0,0163 a
Selamento com algodão	9,10 a	0,0147 a
Permanência em casa de vegetação	0,00 b	0,00 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Experimento 4 – Efeito da permanência sob baixa temperatura na aclimatização de mudas micropropagadas de macieira 'Marubakaido'

Ao final do período de 42 dias de aclimatização, a sobrevivência das mudas foi afetada pelo período de manutenção das mudas sob baixa temperatura em BOD (Tabela 8.C). Houve ajuste, embora baixo, a uma regressão linear, com tendência de aumento da sobrevivência em função do tempo de tratamento (Figura 4.9), especialmente a partir de 96 unidades de frio (4 dias em BOD a 5°C). O frio é citado como forma de endurecimento das mudas, além de auxiliar na quebra da dormência das gemas, fazendo com que haja aumento da brotação e da síntese de hormônios, dentre as quais as giberelinas (Howard e Oehl, 1981; Druart e Gruselle, 1986 e Davies, 1987).



Equação:

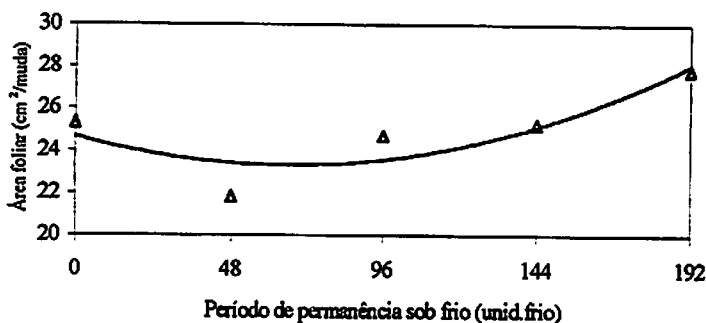
$$Y = 58,000 + 0,135 x$$

$$r^2 = 0,6306$$

FIGURA 4.9. Efeito do período de permanência em BOD (5°C) sobre o percentual de mudas micropropagadas de macieira 'Marubakaido' sobreviventes após 42 dias de aclimatização. Lavras, UFLA, 1999.

A altura inicial das mudas, avaliada após a retirada da BOD, apresentou valor médio de 1,48 cm e não variou em função do período de manutenção das mudas sob baixa temperatura. A temperatura de 5°C, embora não acarrete paralisação total da atividade metabólica das mudas, reduz significativamente o seu crescimento. Não houve efeito dos tratamentos sobre a altura final das mudas (média de 2,17 cm), indicando que o tempo de permanência sob baixa temperatura, embora favoreça a sobrevivência, não acarretou aumento do crescimento em extensão das mudas.

Entretanto, a área foliar (Figura 4.10) e a matéria seca da parte aérea (Figura 4.11) foram favorecidas pelo tratamento de pré-aclimatização.

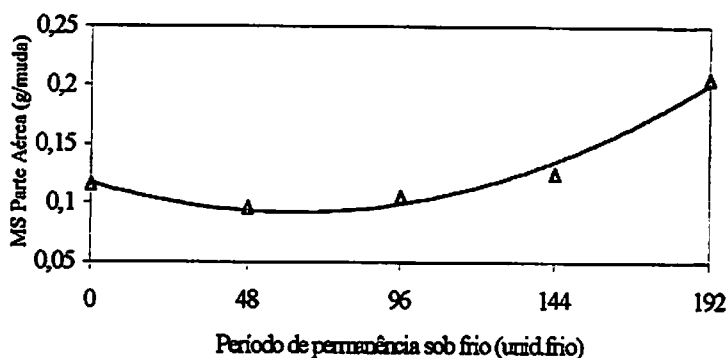


Equação:

$$Y = 24,678 - 0,041 x + 0,00031 x^2$$

$$r^2 = 0,7698$$

FIGURA 4.10. Efeito do período de permanência sob frio em BOD sobre a área foliar de mudas micropropagadas de macieira 'Marubakaido' após 42 dias de aclimatização. Lavras, UFLA, 1999.



Equação:

$$Y = 0,1172 - 0,0008 x + 0,000007 x^2$$

$$r^2 = 0,9785$$

FIGURA 4.11. Efeito do período de permanência sob frio em BOD sobre a matéria seca da parte aérea de mudas micropropagadas de macieira 'Marubakaido' após 42 dias de aclimatização. Lavras, UFLA, 1999.

Em ambas as variáveis, houve ajuste a regressões quadráticas, com o menor valor em 66,13 e 57,14 unidades de frio, respectivamente, aumentando a partir destes valores. As baixas temperaturas atuaram na quebra de dormência das gemas nas mudas (Druart e Gruselle, 1986), favorecendo a sua brotação e, por consequência, estimulando a emissão de folhas e a acumulação de matéria seca na parte aérea das mudas. A matéria seca das raízes não foi afetada pelo tempo de permanência em BOD (média de 0,04 g/muda), pois a baixa temperatura atua principalmente no crescimento da parte aérea.

Considerações gerais

A pré-aclimatização, testada neste trabalho, afeta a condição em que a muda deixa o ambiente *in vitro* e, conseqüentemente, a sobrevivência e o crescimento da mesma durante a aclimatização. Embora acarrete o aumento do período total necessário à produção da muda (entre 2 a 10 dias, para as técnicas testadas no presente trabalho), estas técnicas podem ser usadas como preparatórias ou complementares aos demais cuidados que devem ser dispensados às mudas em aclimatização.

A poda de raízes, embora não favoreça o crescimento, não o prejudica e, ainda, facilita a repicagem no substrato. Já a abertura dos frascos aumenta o dessecamento das folhas e prejudica a sobrevivência e o crescimento das mudas durante a aclimatização. Apesar da exposição do meio de cultura ao ambiente externo, não houve aumento significativo da contaminação, pois a quantidade de sacarose no meio de cultura já está bastante reduzida. A diminuição da intensidade do estresse e, portanto, do dessecamento das folhas, poderia ser obtida com uso de uma película pouco permeável ao vapor d'água, a qual diminuiria a umidade relativa interna e aumentaria a deposição de ceras na

epiderme das folhas, bem como incrementaria a resposta estomática. O selamento com algodão causa este mesmo tipo de estresse, embora não exponha diretamente as mudas à condição atmosférica externa. O mesmo ocorre com a exposição à luz, devido à diferença entre os ambientes. Dentre as técnicas testadas, as mais promissoras são o frio e o GA₃. Estes dois fatores de pré-aclimatização, para maior eficiência da sua utilização, devem ser combinados. Períodos mais prolongados de frio, bem como outras formas de aplicação do GA₃, em relação aos testados no presente trabalho, podem proporcionar resultados ainda superiores aos obtidos.

4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nos experimentos, conclui-se que:

- a) a pré-aclimatização afeta a sobrevivência e o crescimento das mudas de macieira 'Marubakaido' durante a aclimatização;
- b) a poda de raízes não prejudica o crescimento das mudas e facilita a operação de repicagem para o substrato de aclimatização;
- c) a abertura antecipada dos frascos desfavorece a sobrevivência e o crescimento das mudas durante a aclimatização;
- d) o selamento dos frascos com algodão e a manutenção das mudas nos frascos em casa de vegetação durante a pré-aclimatização prejudicam a sobrevivência e o crescimento das mudas;

- e) a manutenção das mudas sob baixa temperatura proporciona bons resultados, especialmente a partir de 96 unidades de frio (4 dias);
- f) a aplicação de GA₃ (28-33 mg.L⁻¹) em mudas mantidas durante 5 dias a 5°C favorece a sobrevivência e o crescimento das mudas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENINCASA, M.M.P. *Análise de crescimento de plantas*. Jaboticabal: FUNEP, 1988. 42p.
- BRAINERD, K.E.; FUCHIGAMI, L.H. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v. 106, n.4, p.515-518, 1981.
- BROOME, O.C.; ZIMMERMAN, R.H. Culture of shoots meristems: fruit plants *in vitro*: VASIL, I.K. (ed.) *Cell culture and somatic cell genetics of plants - Laboratory procedures and their applications*, v.1. Orlando: Academic Press, 1984, p.111-122.
- CUZZUOL, G.R.F. *Parâmetros bioquímicos e fisiológicos da vitrificação e do desenvolvimento do cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro**. Piracicaba: ESALQ, 1993, 89p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas)
- DAVIES, P.J. *Plant hormones and their role in plant growth and development*. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. 681p.
- DAMI, I.; HUGHES, H.G. Effects of PEG-induced water stress on *in vitro* of 'Valiant' grape. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.47, n.2, p.97-101, 1997.

- DENG, R.; DONNELLY, D.J. In vitro hardening of red raspberry by CO₂ enrichment and reduced medium sucrose concentration. **HortScience**, Alexandria, v.28, n.10, p.1048-1051, 1993.
- DRUART, P.; GRUSELLE, R. Plum (*Prunus domestica*). In: BAJAJ, Y.P.S. (ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry - High Tech and Micropropagation I - Trees 1**. Berlin: Springer-Verlag, 1986, p.130-154.
- ESCOBAR, R.F. **Planificación y diseño de plantaciones frutales**. Madrid: Mundi-Prensa, 1988. 205p.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture – Part 1: The technology**. 2nd ed. Edington: Exegetics, 1993. 786p.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998, p.183-260.
- GROUT, B.; ASTON, M.J. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. **Horticultural Research**, [s.l.], n.17, p.107-112, 1977.
- HOWARD, B.H.; OEHL, V.H. Improved establishment of *in vitro* propagated plum micropropagules following treatment with GA₃ or prior chilling. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.56, n.1, p.1-7, 1981.
- ISUTSA, D.K.; PRITTS, M.P.; MUDGE, K.W. A protocol for rooting and growing apple rootstock microshoots. **Fruits Varieties Journal**, Ithaca, v.52, n.2, p.107-116, 1998.
- JONES, O.P. et al. Propagation *in vitro* of some dwarf apple rootstock trees. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.60, n.2, p.141-144, 1985.
- KAVANAGH, K.L. et al. The effects of GA₃ and organic solvents on acclimatization of tissue culture propagated black cherry (*Prunus serotina* Ehrh.) plantlets. **Forest Science**, [s.l.], v.39, n.4, p.644-654, 1993.

- MARIN, J.A.; GELLA, R. Is desiccation the cause of the poor survival rate in the acclimatization of micropropagated *Prunus cerasus* L.? *Acta Horticulturae*, Wageningen, n.230, p.105-112, 1988.
- MOHR, H.; SCHOPFER, P. *Plant Physiology*. Berlin: Springer-Verlag, 1995. 629p.
- MURPHY, K.P. et al. Ventilation of culture vessels. I. Increased growth in vitro and survival ex vitro of *Delphinium*. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, Ashford, v.73, n.6, p.725-729, 1998.
- PASQUAL, M. et al. *Meios de Cultura*. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997, 127p. (Apostila)
- PONCHIA, G.; GARDIMAN, M. The micropropagation and post-acclimation growth of *Prunus laurocerasus* L. cv. Otto Luyken: additional findings. *Advances in Horticultural Science*, Firenze, v.7, n.1, p. 11-14, 1993.
- RUGINI, E. Olive (*Olea europaea* L.). In: BAJAJ, Y.P.S. (ed.) *Biotechnology in agriculture and forestry - High Tech and Micropropagation I - Trees 1*. Berlin: Springer-Verlag, 1986, p.253-267.
- SCIUTTI, R.; MORINI, S. Effect of relative humidity *in vitro* culture on some growth characteristics of a plum rootstock during shoot proliferation and rooting and on plantlet survival. *Advances in Horticultural Science*, Firenze, v.7, n.4, p.153-156, 1993.
- SMITH, E.F. et al. Paclobutrazol and reduced humidity improve resistance to wilting of micropropagated grapevine. *HortScience*, Alexandria, v.27, n.2, p.111-113, Feb. 1992.
- SUTTER, E.; LANGHANS, R.W. Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot-tip culture. *Canadian Journal of Botany*, Montreal, v.60, n.3, p.2896-2902, 1982.
- WARDLE, K.; DOBBS, E.B.; SHORT, K.C. In vitro acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v.108, n.3, p.386-389, 1983.

CAPÍTULO 5

FATORES QUE AFETAM O ENRAIZAMENTO *EX VITRO* DE BROTAÇÕES MICROPROPAGADAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA 'MARUBAKAIDO'

Resumo: Este experimento teve como objetivo avaliar o efeito de alguns fatores envolvidos no enraizamento *ex vitro* de brotações do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' obtidas por micropropagação. O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos e na casa de vegetação do Pomar da Universidade Federal de Lavras (Lavras, MG). Para tanto, foram utilizadas brotações apicais, multiplicadas em meio MS, com 1 a 2 pares de folhas. O trabalho foi constituído de três experimentos, nos quais foram testados o efeito do ácido indolbutírico (AIB), do substrato, do lesionamento na base das brotações e de tratamentos para o pré-condicionamento das brotações com ágar, cálcio e zinco no meio de cultura. Tratando-se as brotações com AIB durante 16 horas, observaram-se os melhores resultados com cerca de 36 mg.L⁻¹ de AIB no enraizamento em bandejas de espuma fenólica (70,5 % de brotações enraizadas). Quando tratadas durante 15 segundos, os melhores resultados foram obtidos com 134,67 mg.L⁻¹ de AIB, em Plantmax (65,5 %) e com 300 mg.L⁻¹, em Espuma Fenólica (72,4 %). O lesionamento provocou decréscimo no enraizamento das brotações em função do aumento da concentração de AIB. O aumento da concentração de ágar no meio de cultura de pré-condicionamento teve pouco efeito sobre o enraizamento das brotações, porém o número de raízes primárias foi superior quando utilizados 10,2 g.L⁻¹ de ágar. O aumento do teor de cálcio no meio de pré-condicionamento favoreceu o enraizamento das brotações, porém reduziu a sobrevivência das mudas em relação ao aumento no teor de zinco. Com 605 mg.L⁻¹ de cálcio, obteve-se o maior número de raízes primárias. O zinco praticamente não afetou as variáveis analisadas.

Palavras-chave: *Malus*, Rosaceae, propagação, microestacas, cultura de tecidos

FACTORS AFFECTING *EX VITRO* ROOTING OF MICROPROPAGATED 'MARUBAKAIDO' APPLE ROOTSTOCK SHOOTS

Abstract: The objective of this experiment was to evaluate the effect of some factors involved in the *ex vitro* rooting of 'Marubakaido' apple rootstock shoots obtained through *in vitro* micropropagation. The work was carried out at the Tissue Culture Laboratory and greenhouse of the Experimental Orchard of the Federal University of Lavras (Lavras, MG, Brazil). Apical shoots multiplied in MS medium with 1-2 leaf pairs were used. The work consisted of three experiments on which the effect of indolebutyric acid (IBA), substrate, wounding in the shoot base and treatment of pre-conditioning shoots with ágar, calcium and zinc in the culture medium were tested. The best results of shoots treated with IBA for 16 hours were observed using 36 mg.L⁻¹ IBA during rooting in phenolic foam trays (70.5% of rooted shoots). When shoots were treated for 15 seconds, the best results were obtained using 134.67 mg.L⁻¹ IBA in Plantmax (65.5%) or 300 mg.L⁻¹ IBA in phenolic foam trays (72.4%). Wounding caused a decrease in shoot rooting with the increase of IBA concentration. The increase of agar concentration in the pre-conditioning culture medium had little effect on shoot rooting, but the number of primary adventitious roots was superior when 10.2 g.L⁻¹ ágar was used. The increase of calcium concentration in medium of pre-conditioning increased shoot rooting but decreased plantlets survival, in relation to the increase of zinc concentration. Largest number of primary adventitious roots were obtained using 605 mg.L⁻¹ calcium. There was no effect of zinc in any of the analysed variables.

Key words: *Malus*, Rosaceae, propagation, microcuttings, tissue culture

1 INTRODUÇÃO

O enraizamento de brotações micropropagadas pode ocorrer tanto *in vitro* quanto *ex vitro*. Embora convencionalmente seja utilizado o enraizamento *in vitro*, o enraizamento de brotações ou microestacas *ex vitro* vem ganhando espaço. Nesta técnica, brotações produzidas *in vitro* são excisadas e, após serem

tratadas com fitorreguladores (fase opcional), são levadas para enraizar em ambiente não-asséptico, com elevada umidade relativa do ar e baixa luminosidade. Esta modalidade de enraizamento proporciona vantagens, tais como: redução no tempo total para produção da muda pela eliminação da fase específica de enraizamento *in vitro*; realização simultânea das fases de enraizamento e aclimatização; emissão de raízes funcionais favorecendo a sobrevivência e o crescimento da muda, e diminuição do custo total de produção da muda (Gray e Klein, 1987; Avanzatto, Cherubini e Jaque, 1993; Gribaudo e Fronda, 1993 e George, 1993).

Apesar disso, o enraizamento *ex vitro* também apresenta desvantagens: limitação do uso comercial em espécies de difícil enraizamento; requer cuidados especiais quanto ao ambiente de enraizamento, devido à elevada sensibilidade das brotações, e aumento do tempo necessário para a produção de mudas no caso de espécies que requerem uma fase de “endurecimento” antes de serem levadas para o campo (Cuzzuol, 1993; George 1993 e Yeo e Reed, 1995).

Diversos fatores afetam o enraizamento *ex vitro* de brotações e a definição das condições mais adequadas para a formação de raízes e estabelecimento das mudas pode tornar viável esta técnica na propagação comercial.

Devido à dificuldade de formação de raízes adventícias, é frequente o uso de auxinas para a indução do enraizamento *ex vitro*. As formas mais comuns de aplicação destes fitorreguladores consistem: a) na imersão das brotações em solução de auxina (concentrada ou diluída) antes do plantio; b) na saturação do substrato de enraizamento com uma solução de auxina e c) no pré-tratamento das brotações *in vitro* com auxinas, de modo que, tão logo ocorra a indução do enraizamento, estas possam ser transferidas para o substrato *ex vitro*.

O lesionamento na base das brotações, por aumentar a exposição do câmbio, tende a favorecer a sensibilidade dos tecidos à auxina, bem como auxiliar na emissão de raízes adventícias. O substrato de enraizamento afeta tanto o percentual de brotações enraizadas quanto a qualidade do sistema radicular adventício e, portanto, pode influenciar a sobrevivência e o crescimento das mudas na aclimatização. Gribaudo e Fronda (1993) mencionam que a escolha do substrato é importante, sendo os seus principais requisitos o adequado suporte físico e nutricional, pH adequado à espécie e semelhante ao ambiente *in vitro*, porosidade adequada e facilidade de elaboração. Diversos materiais podem ser usados com esta finalidade, dentre os quais a areia, vermiculita, substratos comerciais e bandejas de espuma fenólica (Webster e Jones, 1989; George, 1993 e Biasi, 1996).

O endurecimento ou pré-condicionamento das brotações pode ser necessário para aumentar a resistência dos tecidos até que ocorra o enraizamento. Conforme constatado por Cuzzuol (1993), o material mantido *in vitro* deve adquirir características morfológicas apropriadas para suportar as condições *ex vitro* e apresentar bom desempenho durante a aclimatização. O aumento da concentração de ágar, por limitar o crescimento das brotações, pode favorecer o endurecimento. A elevação dos teores de cálcio e zinco pode ser útil, por aumentar a resistência da parede celular ou por ativar a síntese de triptofano e, por consequência, de auxina endógena, respectivamente (Pasqual et al., 1997).

Na literatura, são mencionados diversos exemplos de enraizamento *ex vitro* de brotações obtidas por micropropagação. Pasqual e Lopes (1991), trabalhando com enraizamento *ex vitro* em *Pyrus calleryana*, observaram que a imersão da base das brotações em AIB (ácido indolbutírico) por 24 horas proporcionou o maior número de folhas, e após 45 dias, as plantas mais vigorosas foram obtidas nas concentrações de 30 e 50 mg/litro de AIB, associadas aos

tempos de 25 e 20 horas de imersão. Mansani, Voltolini e Pedrotti (1997) trabalharam com os porta-enxertos de macieira 'M7', 'M9' e 'Marubakaido', induzindo o enraizamento *ex vitro* após o tratamento com AIB a 500 ppm durante 5 segundos, em três ambientes: caixa plástica com tampa de vidro, mini-túnel com lâmina de água e mini-túnel com nebulização intermitente. Avanzatto, Cherubini e Jaque (1993) avaliaram o enraizamento *ex vitro* de três porta-enxertos de macieira, visando a adaptação e o enraizamento simultâneos com baixo custo.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a influência do ácido indolbutírico (AIB), substrato, lesionamento e tratamentos de pré-condicionamento no enraizamento *ex vitro* de brotações do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido'.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo geral das condições de cultivo *in vitro* utilizado nos experimentos está descrito no Capítulo 1. Este trabalho foi constituído de três experimentos, quais sejam:

Experimento 1 - Influência do AIB no enraizamento *ex vitro* de brotações do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' em bandejas de espuma fenólica

Neste experimento, foram testadas 5 concentrações de AIB (0, 20, 40, 60 e 80 mg.L⁻¹, em tratamento por imersão do terço basal das brotações durante 16 horas em ambiente escuro) no enraizamento *ex vitro* de brotações de macieira 'Marubakaido'. Foram utilizadas brotações apicais com 2 pares de folhas, pré-

condicionadas durante 29 dias em meio MS (3/4 da concentração de NH_4NO_3 , sem fitorreguladores, solidificado com ágar $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ e demais componentes nas concentrações normais). Como substrato, foram utilizadas bandejas de espuma fenólica, com células de $2 \times 2 \text{ cm}$ e espessura de 2 cm , previamente lavadas durante 30 minutos sob água corrente e umedecidas com solução contendo os sais de MS na sua concentração integral. O ambiente para enraizamento foi a casa de vegetação, dotada de sistema de nebulização intermitente e com sombreamento através de dupla camada de tela (Sombrite 50%).

Após o preparo das microestacas, estas foram colocadas na espuma, à metade do seu comprimento. Durante as duas primeiras semanas após a implantação, foi aplicada às bandejas uma solução contendo os sais de MS diluídos a 50%, a cada 4 dias, com volume aproximado de 5 ml/célula . Após 22 dias, foram avaliados o enraizamento e a altura das mudas. As mudas enraizadas foram, então, repicadas para bandejas de Isopor, com 72 células de 120 cm^3 cada, sendo utilizado como substrato uma mistura de solo (latossolo vermelho) + composto orgânico (produzido à base de esterco bovino e restos culturais de gramíneas) na proporção de 1:1 v/v. As mudas permaneceram nesta condição durante 60 dias, quando foi realizada a avaliação final. Nesta avaliação, foram determinadas as seguintes variáveis: sobrevivência, altura das mudas, número de raízes primárias, área foliar e matéria seca da parte aérea e das raízes. A área foliar foi estimada a partir da relação entre a matéria seca de uma amostra e a área foliar determinada pelo método das fotocópias nesta amostra (Benincasa, 1988).

O delineamento utilizado foi o inteiramente ao acaso, com 3 repetições e 8 brotações por repetição, sendo que os tratamentos foram comparados através de análise de regressão linear. Os dados de enraizamento e sobrevivência foram transformados segundo a equação $\arcsen \sqrt{x/100}$.

Experimento 2 - Efeito do substrato, AIB e lesionamento no enraizamento *ex vitro* de brotações do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido'

Neste experimento, foram testadas quatro concentrações de AIB (0, 100, 200 e 300 mg.L⁻¹, imergindo as brotações durante 15 segundos), dois substratos (Plantmax e bandejas de espuma fenólica) e com ou sem lesionamento da base da brotação (cortes verticais laterais de aproximadamente 5 mm de extensão). Para tanto, foram utilizadas brotações apicais, com 2-3 cm de comprimento, com meristema apical e com 1 par de folhas no ápice, as quais haviam sido pré-condicionadas, para endurecimento, em meio MS, na concentração integral de sais e demais componentes normais, durante 23 dias. A seguir, parte das brotações foi lesionada e após, todas foram tratadas com AIB. Metade do total das brotações foi colocada para enraizar em Plantmax, acondicionado em bandejas de Isopor com 128 células de 35 cm³ cada, e metade, colocada para enraizar em bandejas de espuma fenólica, com células de 2 x 2 cm e espessura de 2 cm, previamente lavadas com água corrente durante 30 minutos. Em ambos os substratos, as brotações foram plantadas a cerca de metade do seu comprimento no substrato ou na bandeja de espuma. O ambiente de enraizamento foi a casa de vegetação dotada de sistema de nebulização intermitente e coberta com dupla tela de sombreamento (Sombrite 50%). O período de enraizamento foi de 42 dias e, durante este período (42 dias), foram feitas aplicações semanais de meio MS diluído a 50%. Após este período, foram avaliados o percentual de enraizamento, a altura e a área foliar das mudas. As mudas enraizadas foram, então, repicadas para substrato (solo + areia 1:1 v/v, acrescido de 300 g de superfosfato simples/m³ da mistura), onde foram mantidas durante 60 dias, quando foram avaliados o percentual de sobrevivência, altura e área foliar das mudas. A área foliar foi determinada através do método das fotocópias.

Foi adotado o delineamento experimental inteiramente ao acaso, com 3 repetições de 8 explantes cada, em esquema fatorial $4 \times 2 \times 2$. Após a análise estatística, os resultados foram estudados através de análise de regressão para o fator AIB e do teste de Tukey a 5% para os fatores substrato e lesionamento.

Experimento 3 - Efeito do ágar, cálcio e zinco no pré-condicionamento visando o enraizamento *ex vitro* de brotações de macieira 'Marubakaido'

Foram testadas, neste experimento, diferentes concentrações de ágar, cálcio e zinco, acrescidos ao meio de cultura durante o pré-condicionamento de brotações de macieira 'Marubakaido' destinadas ao enraizamento *ex vitro*. Para o pré-condicionamento, brotações apicais, com 1-2 pares de folhas e 2-3 cm de comprimento, foram colocadas em meio MS com a concentração integral dos sais e dos demais componentes e isento de fitorreguladores. O pré-condicionamento foi efetuado em frascos com capacidade de 250 cm³, colocando-se 6 brotações/frasco, durante 25 dias.

Os tratamentos consistiram na modificação, em relação ao meio MS-padrão, das concentrações de ágar, cálcio e zinco no meio de cultura de pré-condicionamento e foram divididos em duas etapas.

Na primeira etapa, foram testadas quatro concentrações de ágar (7 g.L⁻¹ ou 100%, 8,75 g.L⁻¹ ou 125%, 10,5 g.L⁻¹ ou 150% e 12,25 g.L⁻¹ ou 175%) no pré-condicionamento de brotações desenvolvidas em duas concentrações de sacarose na fase de multiplicação (30 e 60 g.L⁻¹). A fase de multiplicação teve a duração de 60 dias.

Na segunda etapa, foram testadas quatro concentrações de cálcio, na forma de CaCl₂.H₂O (440 mg.L⁻¹ ou 100%, 550 mg.L⁻¹ ou 125%, 660 mg.L⁻¹ ou 150% e 770 mg.L⁻¹ ou 175%) e quatro concentrações de zinco na forma de ZnSO₄.7H₂O (8,6 mg.L⁻¹ ou 100%, 10,75 mg.L⁻¹ ou 125%, 12,9 mg.L⁻¹ ou 150%

e $15,05 \text{ mg.L}^{-1}$ ou 175%), provenientes de brotações multiplicadas em meio com 30 g.L^{-1} de sacarose.

Após o pré-condicionamento, as brotações foram retiradas dos frascos, tratadas com AIB (60 mg.L^{-1}) durante 16 horas e colocadas para enraizar em bandejas de espuma fenólica, com células de $2 \times 2 \text{ cm}$ e espessura de 2 cm , previamente lavadas com água corrente durante 30 minutos e umedecidas com meio MS, na metade da concentração dos sais, em casa de vegetação com sistema de nebulização intermitente, sob dupla camada de tela de sombreamento (Sombrite 50%).

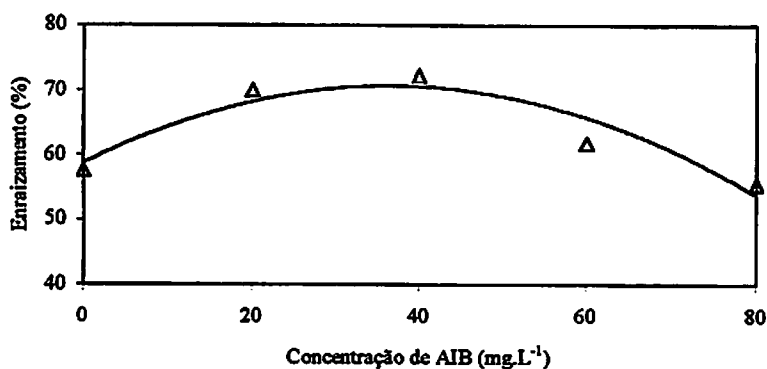
Após 21 dias, foram avaliados o enraizamento e a altura das brotações enraizadas. As microestacas enraizadas foram transferidas para substrato composto de solo+composto orgânico+areia (2:1:1 v/v), em bandejas de Isopor com 72 células, em casa de vegetação e a pleno sol, durante 70 dias. Após este período, foram avaliadas as seguintes variáveis: sobrevivência, altura, número de raízes primárias e área foliar pelo método das fotocópias (Benincasa, 1988).

Foi adotado o delineamento experimental inteiramente ao acaso, com 4 repetições e 12 microestacas por repetição, em esquema fatorial 2×4 , em ambas as etapas. Os resultados foram estudados através da análise de regressão para os níveis de ágar, cálcio e zinco e pelo teste de Tukey a 5%, para os níveis de sacarose (primeira etapa) e de nutriente (segunda etapa).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1 - Influência do ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento *ex vitro* de brotações do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' em bandejas de espuma fenólica

Houve efeito do ácido indolbutírico, nas concentrações utilizadas, sobre o enraizamento (Tabela 1.D - Anexo e Figura 5.1). Com a concentração de 36,17 mg.L⁻¹, foi obtido o maior percentual de brotações enraizadas (70,55%), sendo os menores valores obtidos com 0 e 80 mg.L⁻¹, caracterizando, respectivamente, a deficiência e o excesso do fitorregulador, os quais desfavorecem o enraizamento, de acordo com a tendência observada por Leite (1995), no enraizamento de brotações de pereira.



Equação:

$$Y = 58,775 + 0,651 x - 0,009 x^2$$

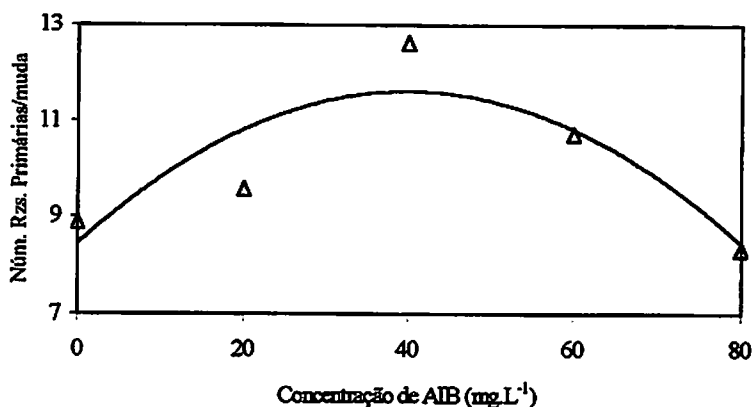
$$r^2 = 0,8823$$

FIGURA 5.1. Efeito do ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento *ex vitro* de brotações de macieira 'Marubakaido' em bandejas de espuma fenólica. Lavras, UFLA, 1999.

Observa-se que, mesmo sem a utilização do fitorregulador, obteve-se 57,62% de brotações enraizadas, o que pode ser considerado um bom enraizamento, como também foi mencionado por Zanol (1996), que atestou a relativa facilidade de enraizamento de 'Marubakaido'. Porém, com o uso de 36,17 mg.L⁻¹ de AIB, este percentual aumentou em 22,4%. O balanço favorável às auxinas tende a incrementar o enraizamento, bem como outras características do sistema radicular adventício. Webster e Jones (1989), trabalhando com enraizamento de brotações do porta-enxerto 'M 9', conseguiram em média 45% de enraizamento *in vitro*, utilizando brotações mantidas em meio MS acrescido de 3 mg.L⁻¹ de AIB durante 4 dias, sendo após transferidas para outro meio para crescimento das raízes. Porém, os mesmos autores obtiveram média de 83% de enraizamento *ex vitro* com brotações tratadas com AIB em pó (0,2%) + Captan, utilizando bandejas com areia esterilizada. Yepes e Aldwinckle (1994), trabalhando com diversos genótipos de macieira, obtiveram efeito do AIB no enraizamento "in vitro" das brotações, sendo que as melhores concentrações variaram entre 0,1 a 1,0 mg.L⁻¹, dependendo do genótipo.

A altura das mudas não foi afetada pelas concentrações de AIB, apresentando, em média, 1,32 cm (Tabela 1.D) . Em geral, o efeito esperado da auxina é o aumento do percentual de enraizamento e a melhoria da condição do sistema radicular, os quais, posteriormente, tendem a afetar o crescimento da parte aérea da muda. Como o tempo para enraizamento foi curto (22 dias) e o enraizamento se deu em espuma fenólica, com poucos nutrientes disponíveis, este efeito não se manifestou.

De todas as variáveis analisadas ao final dos 70 dias após a repicagem, somente o número de raízes primárias foi afetado pelas concentrações de AIB (Tabela 2.D), sendo os maiores valores observados na concentração de 47 mg.L⁻¹ (Figura 5.2).



Equação:

$$Y = 8,440 + 0,188 x - 0,0020 x^2$$

$$r^2 = 0,7613$$

FIGURA 5.2. Efeito do ácido indolbutírico (AIB) no número de raízes primárias em mudas enraizadas *ex vitro* de macieira 'Marubakaido' em bandejas de espuma fenólica, aos 60 dias após a repicagem. Lavras, UFLA, 1999.

Devido à dificuldade em se avaliar o número de raízes emitidas das brotações enraizadas em espuma fenólica, sem danificá-las, somente após 60 dias da repicagem pôde-se fazer esta avaliação. Considerando-se haver pequena emissão de novas raízes primárias após a repicagem, pode-se afirmar que há estreita relação entre o número inicial de raízes primárias e o número observado após 60 dias. Neste sentido, observa-se que o AIB afetou não somente o percentual de brotações enraizadas, como também o número de raízes por muda. Pedrotti e Voltolini (1997), trabalhando com brotações dos porta-enxertos 'Marubakaido' e 'M-9', observaram que o aumento na concentração de AIB proporcionou acréscimo linear no número de raízes emitidas. Os autores recomendaram o uso de 1500 mg.L⁻¹ (durante 10 segundos) por proporcionar maior número de raízes, com reflexos diretos na sobrevivência das mesmas.

O maior número de raízes primárias em alguns tratamentos, entretanto, não correspondeu a um aumento na altura ou na matéria seca das mudas, provavelmente porque o tempo de crescimento das mudas foi insuficiente para serem observadas respostas nestas variáveis. Em períodos mais prolongados, é possível que este efeito fosse manifestado mais claramente. É importante considerar-se, ainda, que mesmo aos 60 dias após a repicagem das mudas, o fragmento de espuma fenólica aderido às raízes continuava quase intacto, o que pode ter limitado o desenvolvimento das mudas. Passados 60 dias da retirada das brotações enraizadas das bandejas de espuma fenólica, observou-se que a sobrevivência, altura, área foliar e matéria seca da parte aérea e das raízes das mudas não foram afetadas pelo AIB. Embora observe-se certa elevação dos valores de algumas destas variáveis nas concentrações de 40 e 60 mg.L⁻¹, não houve ajuste a uma regressão significativa (Tabela 5.1).

TABELA 5.1. Sobrevivência, altura, área foliar e matéria seca (MS) da parte aérea e das raízes em mudas enraizadas *ex vitro* de macieira 'Marubakaido' em bandejas de espuma fenólica, aos 60 dias após a repicagem. Lavras, UFLA, 1999.

Concentração de AIB (mg.L ⁻¹)	Sobrevivência (%)	Altura da muda (cm)	Área foliar (cm ² /muda)	MS P. Aérea (g/muda)	MS Raízes (g/muda)
0	95,85	3,27	26,99	0,13	0,10
20	90,27	2,70	21,82	0,10	0,08
40	93,89	2,98	32,40	0,15	0,13
60	93,47	2,81	31,75	0,15	0,13
80	86,26	3,40	29,25	0,13	0,11
Média	91,95	3,03	28,44	0,13	0,11

Houve taxa média de sobrevivência das mudas de 91,95%, concordando com Simmonds (1983), que obteve 92% de enraizamento e 83% de estabelecimento. Esses resultados, entretanto, são inferiores aos obtidos por Mansani, Voltolini e Pedrotti (1997), em trabalhos com macieira. Webster e Jones (1989) obtiveram 83% de enraizamento *in vitro* em areia esterilizada após tratarem as brotações do porta-enxerto 'M-9' com AIB a 0,2% + Captan.

A altura das mudas, assim como na avaliação após o enraizamento, não foi significativamente afetada pelos tratamentos (Tabela 1.D), após 60 dias em substrato comercial, havendo incremento médio de 129,55 % em relação ao valor inicial.

A média da área foliar foi de 28,44 cm²/muda. Embora não tenha sido constatado efeito do tratamento com AIB, há relação com os resultados obtidos por Pasqual e Lopes (1991) que, trabalhando com enraizamento *ex vitro* de brotações de *Pyrus calleryana*, observaram que a imersão da base dessas brotações em AIB por 24 horas proporcionou maior número de folhas. Após 45 dias, os autores observaram que as mudas mais vigorosas foram obtidas com as concentrações de 30 e 50 mg.L⁻¹ de AIB, com 25 e 20 horas de imersão na solução do fitorregulador, respectivamente.

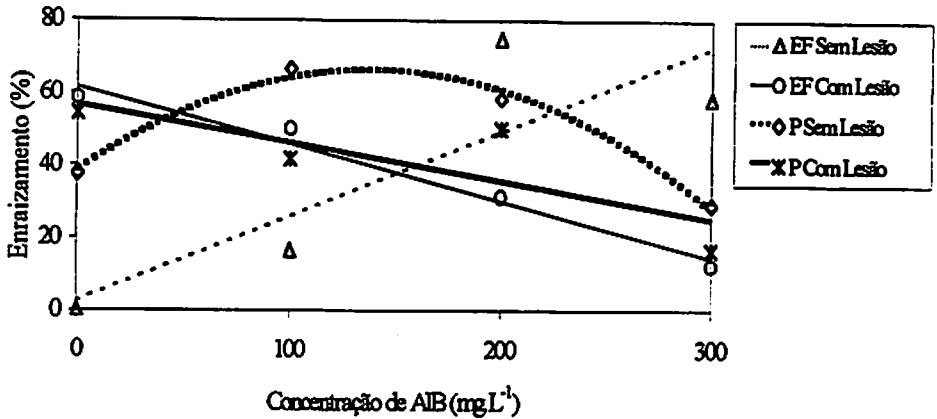
A matéria seca da parte aérea e a das raízes não variaram com os tratamentos (Tabela 2.D), diferindo do resultado obtido por Anjos Sobrinho et al. (1997) que, estudando o enraizamento *ex vitro* de microestacas de kiwi, obtiveram o maior valor de matéria seca das raízes com 30,58 mg.L⁻¹ de AIB, durante 24 horas e para matéria seca da parte aérea, com 26,79 mg.L⁻¹ de AIB, também durante 24 horas.

De modo geral, conforme os resultados obtidos no experimento, o uso do AIB no enraizamento *ex vitro* afeta apenas o enraizamento e o número de raízes primárias, sendo possível, em 82 dias, obter-se mudas com 3,03 cm de altura e

percentagem de enraizamento de 70,55% utilizando-se 36,17 mg.L⁻¹ de AIB. Embora para o enraizamento *ex vitro* não seja necessária a fase de enraizamento das brotações no laboratório, é requerida uma fase de pré-condicionamento (endurecimento) das brotações, para aumento dos componentes do sistema de proteção. Dessa forma, há aumento no tempo necessário para a formação das mudas.

Experimento 2 - Efeito do substrato, AIB e lesionamento no enraizamento *ex vitro* de brotações do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido'

O enraizamento foi afetado pelos três fatores estudados, sendo significativa a interação Substrato x AIB x Lesionamento (Tabela 3.D). O percentual de brotações enraizadas aumentou linearmente de 2,5 até 72,4% com o aumento das concentrações de AIB quando não efetuado o lesionamento e quando utilizada a espuma fenólica como substrato para o enraizamento (Figura 5.3). Porém, quando efetuado o lesionamento na base das brotações, o enraizamento caiu linearmente de 61,46 (0 mg.L⁻¹) para 14,66% (300 mg.L⁻¹). É possível que, devido ao lesionamento, tenha havido competição por auxina pelos dois processos induzidos, o enraizamento e a cicatrização da lesão, causando a redução do enraizamento, uma vez que há consumo de auxina em ambos os processos. Outro fator que pode ter contribuído para este resultado é a presença de substâncias tóxicas na espuma, principalmente formaldeído, resultantes do processo de fabricação da bandeja de espuma fenólica, o que exige a lavagem em água corrente para lixiviação destes compostos, segundo a recomendação do fabricante, e que ainda constitui limitação ao uso destes materiais (Grattapaglia e Machado, 1998).



Equações:

$$Y_{\text{Esp.Fen. Sem Lesão}} = 2,500 + 0,233 x \quad r^2 = 0,7396$$

$$Y_{\text{Esp.Fen. Com Lesão}} = 61,458 - 0,156 x \quad r^2 = 0,9740$$

$$Y_{\text{Plantmax Sem lesão}} = 38,333 + 0,404 x - 0,0015 x^2 \quad r^2 = 0,9849$$

$$Y_{\text{Plantmax Com Lesão}} = 56,250 - 0,104 x \quad r^2 = 0,6410$$

FIGURA 5.3. Efeito da concentração de ácido indolbutírico (AIB), substrato e lesionamento no enraizamento *ex vitro* de brotações de macieira 'Marubakaido'. Lavras, UFLA, 1999.

Mesmo com 30 minutos de lavagem, é provável que parte destes compostos tenha permanecido no interior da espuma, causando danos ao tecido, principalmente quando realizado o lesionamento, que aumentou a exposição do câmbio a estas substâncias. Quando efetuada a lesão, expõe-se o câmbio e aumenta-se a superfície para regeneração das raízes. Mesmo que a microestaca seja constituída de tecido pouco lignificado, as diferenças entre o enraizamento de brotações lesionadas (61,46%) e não-lesionadas (2,5%) na concentração "zero" de AIB caracterizam o efeito intrínseco do lesionamento. Puente e Marin (1992) obtiveram aumento do enraizamento de brotações de macieira 'Jork 9' ao

efetuarem o lesionamento de 2 mm na base, além de aumentar a região da brotação em que foram emitidas as raízes.

Sendo empregado o Plantmax como substrato, houve ajuste dos dados à tendência quadrática, quando não utilizado o lesionamento, e linear decrescente, quando as brotações foram lesionadas. Provavelmente, o efeito negativo do lesionamento em relação às concentrações de AIB, deve-se à competição por auxina entre o enraizamento e a cicatrização da lesão. A presença de sais no substrato, o aumento da respiração, a perda de água e a sensibilidade dos tecidos ao AIB, em função do corte na região basal da brotação, podem ter contribuído para este resultado.

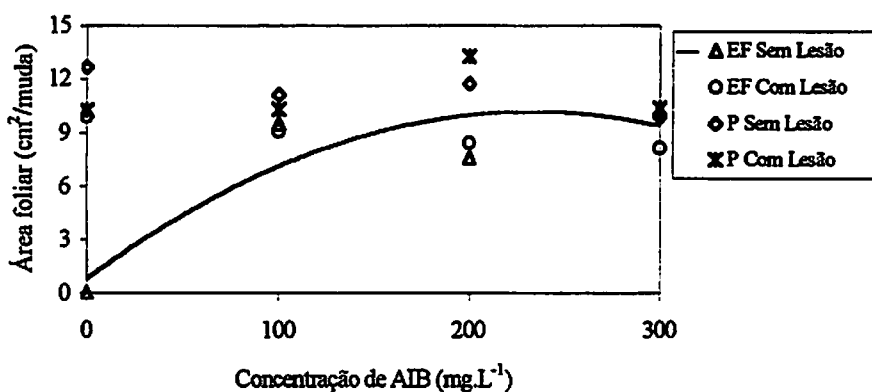
Os maiores percentuais de brotações enraizadas foram obtidos com 300 mg.L⁻¹ de AIB, quando utilizada a espuma fenólica, e com 134,67 mg.L⁻¹, quando utilizado o Plantmax como substrato, evidenciando a necessidade de maior concentração do fitorregulador quando usada a bandeja de espuma fenólica.

A altura das mudas, logo após o seu enraizamento, foi afetada apenas pelo substrato (Tabela 3.D), sendo que, com o Plantmax, obteve-se altura média significativamente superior à obtida com a espuma fenólica (1,52 e 0,62 cm, respectivamente). O Plantmax apresenta características que favorecem o crescimento das mudas após a emissão das raízes adventícias: as propriedades físicas (porosidade, textura, drenagem e baixa compactação) e as propriedades químicas (presença de nutrientes e pH adequado ao desenvolvimento da muda). Trabalhando com enraizamento *ex vitro* de macieira 'MM 106', Avanzatto e Cherubini (1993) testaram diversos substratos e observaram relação inversa entre a capacidade de retenção de água do substrato e a sua capacidade em promover o desenvolvimento das raízes.

Por outro lado, estas condições favoráveis não são encontradas nas bandejas de espuma fenólica, além da possível presença de resíduos de

substâncias tóxicas. Em vista destes resultados, pode-se afirmar que a espuma fenólica, para que possa ser utilizada com eficiência, deve ser bem lavada, por tempo superior a 30 minutos sob água corrente. Além disso, torna-se necessário que as brotações enraizadas em espuma fenólica, tão logo enraizem, sejam repicadas para outro substrato, de modo que não haja prejuízo ao crescimento das mudas.

A área foliar após o enraizamento foi afetada pelos fatores estudados, sendo a interação tripla (AIB x Substrato x Lesionamento) significativa (Tabela 3.D). Na Figura 5.4, são apresentados os valores obtidos nos diferentes tratamentos. Apenas quando utilizada a bandeja de espuma fenólica e sem o lesionamento houve ajuste a uma regressão quadrática, devido ao valor “zero” obtido na concentração 0 mg.L⁻¹.



Equação e Médias:

$$Y_{\text{Esp. Fen. sem Lesão}} = 12,4956 + 0,085x + 0,00022 x^2 \quad r^2 = 0,9525$$

$$\text{Média}_{\text{Esp.Fen. Com Lesão}} = 8,89 \text{ cm}^2/\text{muda}$$

$$\text{Média}_{\text{Plantmax Sem lesão}} = 11,35 \text{ cm}^2/\text{muda}$$

$$\text{Média}_{\text{Plantmax Com Lesão}} = 11,05 \text{ cm}^2/\text{muda}$$

FIGURA 5.4. Efeito da concentração de ácido indolbutírico (AIB), substrato e lesionamento sobre a área foliar de mudas de macieira 'Marubakaido' enraizadas *ex vitro*. Lavras, UFLA, 1999.

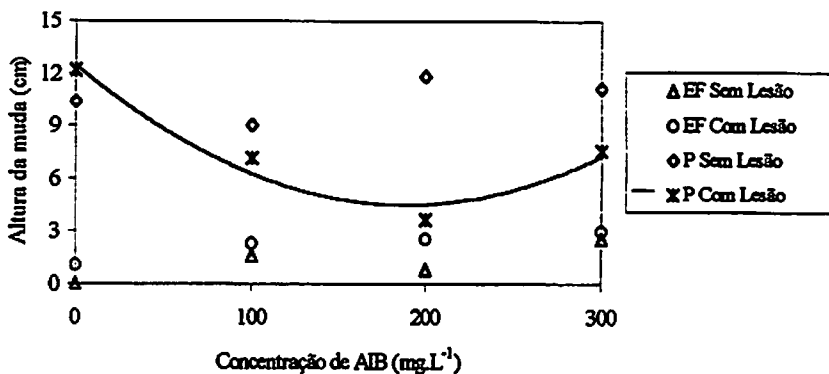
Na Tabela 5.2, é apresentado o efeito do substrato e do lesionamento sobre a área foliar. Somente houve efeito do lesionamento quando utilizada a bandeja de espuma fenólica, obtendo-se o maior valor de área foliar quando lesionadas as brotações. Isto pode ser atribuído ao provável aumento no número de raízes primárias, em mudas lesionadas, na espuma fenólica (não avaliado quando da repicagem), com reflexos sobre o crescimento da muda e a emissão de folhas. Este efeito, porém, não se manifestou no Plantmax. Em ambas as condições de lesionamento, houve diferença na área foliar entre mudas enraizadas em bandejas de espuma fenólica ou em Plantmax. Assim como mencionado para a altura, o Plantmax proporciona melhores condições para o crescimento da muda do que a espuma fenólica, favorecendo o desenvolvimento de maior área foliar.

TABELA 5.2. Área foliar de mudas de macieira ‘Marubakaido’ após o enraizamento *ex vitro* em função do substrato e do lesionamento na base das brotações. Lavras, UFLA, 1999.

Tratamentos	Espuma Fenólica	Plantmax
Sem lesionamento	6,83 Bb	11,34 Aa
Com lesionamento	8,89 Ab	11,05 Aa

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5%.

Houve interação significativa entre os três fatores para a variável altura da muda aos 60 dias após a repicagem (Tabela 4.D). Porém, apenas com o uso de Plantmax e lesionamento houve ajuste a uma regressão quadrática significativa (Figura 5.5).



Equação e Médias:

Média EF Sem Lesão = 1,24 cm

Média EF Com Lesão = 2,23 cm

Média Plantmax Sem Lesão = 10,62 cm

$Y_{\text{Plantmax com lesão}} = 12,4956 + 0,085x + 0,00022 x^2$ $r^2 = 0,9525$

FIGURA 5.5. Efeito da concentração de ácido indolbutírico (AIB), substrato e lesionamento sobre a altura de mudas de macieira ‘Marubakaido’ enraizadas *ex vitro*, aos 60 dias após a repicagem. Lavras, UFLA, 1999.

Conforme é demonstrado na Tabela 5.3, somente houve efeito do lesionamento quando utilizado o Plantmax.

TABELA 5.3. Altura de mudas (cm) de macieira ‘Marubakaido’, aos 60 dias após a repicagem, provenientes do enraizamento *ex vitro* em função do substrato e do lesionamento na base das brotações. Lavras, UFLA, 1999.

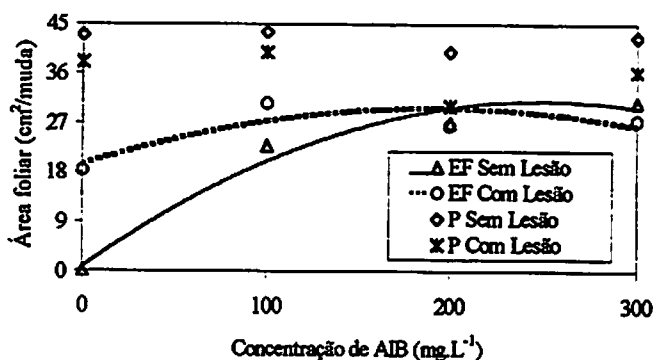
Tratamentos	Espuma Fenólica	Plantmax
Sem lesionamento	1,24 Ab	10,62 Aa
Com lesionamento	2,24 Ab	7,66 Ba

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5%.

As mudas enraizadas em espuma fenólica apresentaram altura significativamente inferior àquelas enraizadas em Plantmax, manifestando novamente o efeito que já havia sido observado logo após o enraizamento sobre a altura das mudas. Além disso, este efeito pode ser atribuído ao fato de que, após o enraizamento, as mudas são repicadas com um fragmento da espuma, o que dificulta o seu desenvolvimento inicial.

Os tratamentos não influenciaram a sobrevivência das mudas enraizadas aos 60 dias após a repicagem (Tabela 4.D), obtendo-se média superior a 96% de sobrevivência, o que está de acordo com a média obtida em trabalhos de enraizamento *ex vitro* de brotações de macieira (Welander, 1983; Simmonds, 1983; Jones et al., 1985 e Mansani, Voltolini e Pedrotti, 1997).

A área foliar das mudas, aos 60 dias após a repicagem, foi afetada pelos fatores estudados (Tabela 4.D), sendo os resultados apresentados na Figura 5.6 e na Tabela 5.4. Somente quando utilizada a espuma fenólica, houve efeito do AIB, sendo que, em ambas as situações de lesionamento, houve ajuste a uma regressão quadrática. Sem o lesionamento, a maior área foliar foi obtida com 240 mg.L⁻¹ de AIB. Com lesionamento, o maior valor foi obtido com 183,33 mg.L⁻¹. A área foliar, em ambos os substratos, foi maior quando utilizado o lesionamento, de modo semelhante ao que foi observado logo após a retirada das mudas do substrato. Além disso, somente quando efetuado o lesionamento, houve efeito do substrato, sendo a área foliar significativamente superior quando utilizado o Plantmax.



Equações e Médias:

$$Y_{\text{Esp. Fen. Sem Lesão}} = 0,908 + 0,240 x + 0,0005 x^2 \quad r^2 = 0,9713$$

$$Y_{\text{Esp. Fen. Com Lesão}} = 19,497 + 0,110 x + 0,0003 x^2 \quad r^2 = 0,7053$$

$$\text{Média Plantmax Sem Lesão} = 42,26 \text{ cm}^2/\text{muda}$$

$$\text{Média Plantmax Com Lesão} = 36,05 \text{ cm}^2/\text{muda}$$

FIGURA 5.6. Efeito da concentração de ácido indolbutírico (AIB), substrato e lesionamento sobre a área foliar de mudas de macieira 'Marubakaido' enraizadas *ex vitro*, aos 60 dias após a repicagem. Lavras, UFLA, 1999.

TABELA 5.4. Área foliar (cm²) de mudas de macieira 'Marubakaido' provenientes do enraizamento *ex vitro* em função do substrato e do lesionamento na base das brotações. Lavras, UFLA, 1999.

Tratamentos	Espuma Fenólica	Plantmax
Sem lesionamento	20,17 Bb	42,26 Aa
Com lesionamento	25,83 Ab	36,05 Ba

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem significativamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5%.

Experimento 3 - Efeito do ágar, cálcio e zinco no pré-condicionamento visando o enraizamento *ex vitro* de brotações de macieira 'Marubakaido'

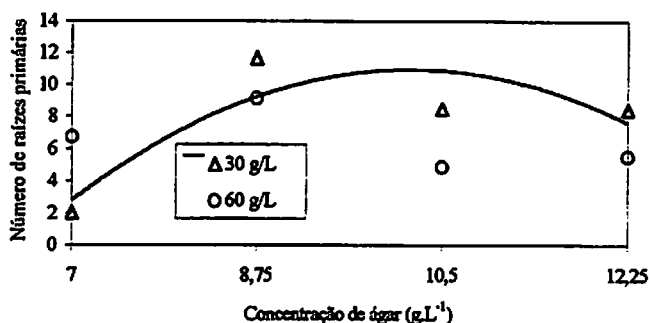
Após 21 dias em casa de vegetação, o percentual de brotações enraizadas foi afetado apenas pela sacarose, sem efeito das concentrações de ágar (Tabela 5.D). É provável que a multiplicação em meio com 60 g.L⁻¹ tenha aumentado a percentagem de matéria seca em relação ao meio com 30 g.L⁻¹. Com isso, a resistência à desidratação foi maior, o que contribuiu para o melhor resultado no enraizamento, mesmo após passados 29 dias de pré-condicionamento. Conforme constatado em experimentos anteriores, a percentagem de matéria seca nas brotações multiplicadas em meio de cultura com 60 g.L⁻¹ de sacarose foi superior à obtida com 30 g.L⁻¹. A fração matéria seca é representada especialmente por carboidratos não-solúveis, como a celulose, hemicelulose e lignina, compostos que se acumulam na parede celular. Silva et al. (1993) observaram relação entre os componentes do sistema de proteção (celulose, hemicelulose e lignina) com a resistência de mudas micropropagadas na aclimatização.

Associado a este resultado, a sacarose a 60 g.L⁻¹ proporcionou maior crescimento em altura, obtendo-se, com esta concentração, altura média de 0,75 cm, enquanto que usando-se 30 g.L⁻¹, obtiveram-se mudas com altura de 0,61 cm. Aos 70 dias após a repicagem das mudas, porém, este efeito não se manifestou, evidenciando a uniformização desta variável durante a aclimatização. Também a sobrevivência e a área foliar aos 70 dias não foram afetadas pelos fatores estudados.

O número de raízes primárias foi afetado pelas concentrações de ágar e foi significativa a interação entre os fatores (Tabela 6.D). Com 30 g.L⁻¹, houve ajuste a uma regressão quadrática, estando o maior valor em torno de 10,2 g.L⁻¹, 45% a mais do que a concentração convencional de ágar. Utilizando-se 60 g.L⁻¹,

não houve efeito das concentrações de ágar no pré-condicionamento sobre o número de raízes primárias. Embora avaliada aos 70 dias, pode-se afirmar que esse efeito já havia se manifestado quando do enraizamento, prolongando-se mesmo após a repicagem das mudas (Figura 5.7). Segundo Wardle, Dobbs e Short (1983), o endurecimento durante o estágio III da micropropagação depende, entre outros fatores, da redução das concentrações de nutrientes no meio de cultura, os quais podem ser afetados pela concentração de ágar, uma vez que, quanto maior a concentração de ágar, menor a disponibilidade dos demais componentes do meio ao explante. Porém, como citam os mesmos autores, este tratamento pode não favorecer a aclimatização das mudas.

As médias de peso da matéria fresca e matéria seca, bem como o percentual de matéria seca das brotações em função das concentrações de cálcio e de zinco no pré-condicionamento, são apresentadas na Tabela 5.5.



Equação e Média:

$$Y_{30 \text{ g/L}} = -71,742 + 16,206 x - 0,7939 x^2$$

$$r^2 = 0,7427$$

Média $_{60 \text{ g/L}} = 6,57$ raízes primárias/muda

FIGURA 5.7. Efeito da sacarose na multiplicação e da concentração de ágar no pré-condicionamento sobre o número de raízes primárias em brotações de macieira 'Marubakaido' enraizadas *ex vitro*. Lavras, UFPA, 1999.

Embora não tenha sido efetuada a análise estatística destes valores, observa-se que, principalmente com o aumento das concentrações de zinco, houve elevação do percentual de matéria seca das brotações, em relação à testemunha (concentração convencional), o que pode ser atribuído à maior síntese de triptofano e, por consequência, de auxina, favorecendo a divisão celular e a acumulação de matéria seca (Pasqual et al., 1997). Visualmente, entretanto, não foram observadas alterações marcantes no crescimento das brotações, bem como sintomas de excesso de cálcio ou zinco nas mesmas.

Sobre a variável enraizamento, somente houve efeito do fator nutriente (Tabela 7.D). Brotações pré-condicionadas em meio adicionado de teores de cálcio maiores que o convencional enraizaram mais (32,85%) em relação ao tratamento com zinco (20,88%), médias significativamente diferentes entre si pelo Teste de Tukey a 5%. Uma das maiores limitações ao enraizamento *in vitro* é a pouca resistência física das brotações e a desidratação excessiva das mesmas (George, 1993). O cálcio, pelo seu efeito de aumento da resistência da parede celular, pode ter contribuído para este resultado. Sha, McCown e Peterson (1985) observaram que o aumento na concentração de cálcio no meio de cultura de 0,3 para 30 mM acarretou aumento no teor no tecido de batata, embora isto não tenha ocorrido de forma proporcional. Druart, Opatny e De Klerk (1997) observaram que o cálcio no meio de cultura estimulou a iniciação radicular, a emergência e o crescimento das raízes de explantes de macieira. Embora saiba-se que o zinco é um elemento constituinte da molécula do aminoácido triptofano, precursor da auxina, nas concentrações utilizadas não houve resposta à aplicação do nutriente. Isto pode ter ocorrido porque o teor de auxina no tecido não foi limitante ao enraizamento. Assim, outros fatores, também importantes para o enraizamento, como a pouca resistência dos tecidos, a pequena quantidade de reservas e o balanço de hormônios e compostos fenólicos, podem ter tido maior importância do

que a quantidade de zinco no meio de pré-condicionamento ou, ainda, do próprio teor de auxina.

TABELA 5.5. Matéria fresca, matéria seca e percentual de matéria seca de brotações de macieira 'Marubakaido' após 25 dias de pré-condicionamento em meio de cultura com diferentes concentrações de cálcio e zinco. Lavras, UFLA, 1999.

Nutriente	Proporção ¹ (%)	Concentração (mg.L ⁻¹)	Mat. Fresca (g/brotação)	Matéria seca (g/brotação)	Perc. Mat. Seca
Cálcio	100	440	0,044	0,0078	17,62
	125	550	0,062	0,0107	17,22
	150	660	0,045	0,0086	19,22
	175	770	0,064	0,0123	19,20
Zinco	100	8,60	0,044	0,0078	17,62
	125	10,75	0,043	0,0096	22,26
	150	12,90	0,042	0,0095	22,45
	175	15,05	0,039	0,0079	20,18

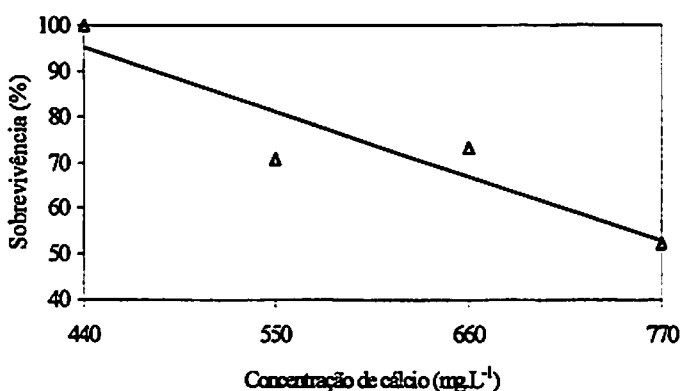
¹ Em relação à concentração convencional no meio de cultura MS

O mesmo comportamento também foi observado com a variável altura da muda (Tabela 7.D). As brotações pré-condicionadas em meio com teor mais elevado de cálcio, após enraizadas, apresentaram altura significativamente superior pelo Teste de Tukey, em relação àquelas que foram pré-condicionadas em meio com maior quantidade de zinco (0,74 e 0,57 cm, respectivamente). Este efeito continuou se manifestando mesmo após passados 70 dias da repicagem das mudas. Naquele momento, as mudas oriundas de brotações pré-condicionadas em diferentes concentrações de cálcio apresentavam altura média de 1,47 cm,

significativamente superior à média das mudas provenientes do tratamento com zinco (0,92 cm).

O aumento da concentração de cálcio, no meio de cultura para pré-condicionamento de brotações, induziu a redução da sobrevivência das mudas após 70 dias da repicagem (Tabela 8.D e Figura 5.8). É provável que, com o aumento das concentrações do nutriente, fossem sendo desenvolvidos desequilíbrios nutricionais que, mesmo não prejudicando o enraizamento, acarretaram prejuízos à sobrevivência das mudas.

Com o número de raízes primárias aos 70 dias após a repicagem, houve resposta quadrática ao aumento das concentrações de cálcio, sendo os maiores valores obtidos com a concentração de 605 mg.L⁻¹, 50% superior em relação à concentração convencional (Figura 5.9).

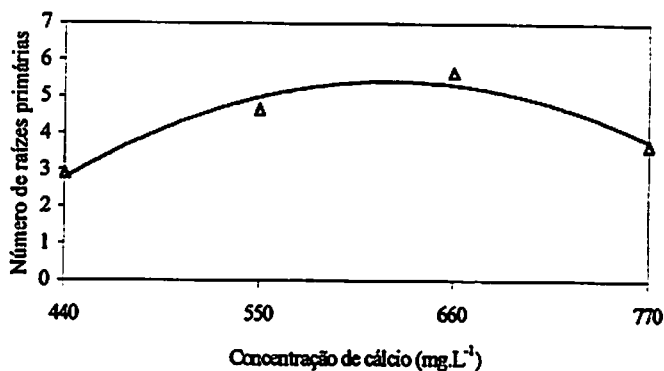


Equação:

$$Y = 151,555 - 0,128 x$$

$$r^2 = 0,8544$$

FIGURA 5.8. Efeito da concentração de cálcio no meio de cultura de pré-condicionamento na sobrevivência de mudas de macieira 'Marubakaido' enraizadas *ex vitro*. Lavras, UFLA, 1999.



Equação:

$$Y = -24,792 + 0,0968 x - 0,00008 x^2$$

$$r^2 = 0,9397$$

FIGURA 5.9. Efeito da concentração de cálcio no meio de cultura de pré-condicionamento sobre o número de raízes primárias de mudas de macieira 'Marubakaido' enraizadas *ex vitro*. Lavras, UFLA, 1999.

A área foliar foi afetada apenas pelo fator nutriente (Tabela 8.D), sendo que com o cálcio, foi obtida a maior área foliar média (5,69 cm²/planta), significativamente superior à média obtida com o zinco (3,57%).

Pode-se afirmar que, de modo geral, a resposta ao cálcio, embora presente em algumas variáveis, foi limitada pela reduzida absorção e translocação do íon, devido à ausência de respiração no interior dos frascos de cultura, de acordo com Caldas, Haridasan e Ferreira (1998). Estes autores recomendam, como alternativas para espécies ou cultivares muito exigentes em cálcio, o aumento da concentração deste nutriente no meio de cultura ou o uso de selamentos permeáveis que aumentem a troca de vapor d'água com o ambiente externo. É possível que o efeito do cálcio no pré-condicionamento fosse intensificado ao serem efetuadas aplicações foliares do nutriente, o que permitiria compensar a baixa translocação do cálcio no tecido.

Considerações gerais

O enraizamento “*ex vitro*” é uma técnica que pode ser utilizada na micropropagação do porta-enxerto ‘Marubakaido’, pois torna possível a ocorrência simultânea do enraizamento e da aclimatização, além de serem formadas raízes mais eficientes e mudas de melhor qualidade. Entretanto, mesmo se tratando de genótipo de fácil enraizamento, a grande limitação permanece sendo o baixo índice de enraizamento, causando grande perda de material vegetativo, uma vez que os tecidos das brotações produzidas *in vitro* são muito sensíveis à redução da umidade relativa do ar na casa de vegetação e à alteração no sistema de nutrição de carbono.

Apesar destas limitações, avanços puderam ser obtidos ao ser utilizado o tratamento com AIB por imersão lenta (16 horas) a $36,17 \text{ mg.L}^{-1}$ ou por imersão rápida (15 segundos) a $134,67 \text{ mg.L}^{-1}$ em Plantmax ou a 300 mg.L^{-1} em Espuma Fenólica. A espuma fenólica é um material promissor para o enraizamento *ex vitro*, pela facilidade de armazenamento, manejo e plantio das brotações, devendo-se, entretanto, aperfeiçoar a metodologia para a sua utilização. Quando as brotações são muito tenras, além dos problemas apontados anteriormente, há dificuldade em introduzi-las na espuma, razão pela qual o pré-condicionamento, ou endurecimento, torna-se fundamental, embora acarrete aumento do tempo necessário para a produção da muda.

4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no experimento, conclui-se que:

- 1) o enraizamento *ex vitro* é afetado pelos fatores AIB, substrato, lesionamento e pré-condicionamento;
- 2) utilizando-se o tratamento com AIB durante 16 horas, o melhor enraizamento em bandejas de espuma fenólica é obtido com 36,17 mg.L⁻¹;
- 3) utilizando-se o tratamento com AIB durante 15 segundos, o melhor enraizamento é obtido com 134,67 mg.L⁻¹ em Plantmax, e com 300 mg.L⁻¹ em espuma fenólica;
- 4) o pré-condicionamento com ágar não afeta o enraizamento, mas com 10,2 g.L⁻¹ são obtidos o maior número de raízes primárias;
- 5) o aumento do teor de cálcio no meio de pré-condicionamento favorece o enraizamento, mas reduz a sobrevivência das mudas.
- 6) o teor de zinco no meio de pré-condicionamento não afeta o enraizamento e a sobrevivência das mudas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANJOS SOBRINHO, A. dos et al. Efeito do tempo de incubação em ácido indolbutírico no enraizamento de plantas obtidas *in vitro* de kiwi cv. Matua. VI CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, (Belém: 1997). Resumos... Belém, SBFV/FCAP, p.123, 1997.

- AVANZATO, D.; CHERUBINI, S. Influence of the substrate on direct rooting of ex vitro microcuttings of the apple MM106. *Informatore Agrario*, Firenze, v.49, n.25, p.77-78, 1993.
- AVANZATTO, D.; CHERUBINI, S.; JAQUE, E. Potenzialità di radicazione diretta e ambientamento di microtalee di portinesti di melo moltiplicati *in vitro*. *Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura*, Bologna, v.55, n.1, p.87-90, 1993.
- BENINCASA, M.M.P. *Análise de crescimento de plantas*. Jaboticabal: FUNEP, 1988. 42p.
- BIASI, L.A. *Avaliação do desenvolvimento inicial de porta-enxertos e de mudas de videira obtidos através de diferentes métodos de propagação*. Piracicaba, ESALQ, 1996, 177p. (Tese - Doutorado em Agronomia)
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998, p.87-132.
- CUZZUOL, G.R.F. *Parâmetros bioquímicos e fisiológicos da vitrificação e do desenvolvimento do cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) in vitro*. Piracicaba: ESALQ, 1993, 89p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas)
- DRUART, P.; OPATRYN, Z.; DE KLERK, G.J. Optimization of culture media for in vitro rooting of *Malus domestica* Borkh. cv. Compact Spartan. *Biologia Plantarum*, [s.l.], v.39, n.1, p.67-77, 1997.
- GEORGE, E.F. *Plant propagation by tissue culture - Part 2: In practice*. 2nd ed. Edington: Exegetics, 1993. 786p.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998, p.183-260.

- GRAY, D.J.; KLEIN, C.M. *In vitro* micropropagation and plant establishment of 'Orlando Seedless' grape and 'Tampa' rootstock. *Proceedings of Florida State Horticultural Society*, Orlando, v.100, p.308-309, 1987.
- GRIBAUDO, I.; FRONDA, A. L'ambientamento delle piante frutticole micropropagate. *Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura*, Bologna, v.51, n.1, p.75-80, 1993.
- JONES, O.P. et al. Propagation *in vitro* of some dwarf apple rootstock trees. *Journal of Horticultural Science*, Ashford, v.60, n.2, p.141-144, 1985.
- LEITE, G.B. Efeito de reguladores de crescimento, substratos, sacarose e intensidade luminosa na micropropagação de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Bartlett e do clone OH x F97. Pelotas: UFPEL, 1995, 50p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia)
- MANSANI, A.; VOLTOLINI, J.A.; PEDROTTI, E.L. Aclimatização de clones de porta-enxertos micropropagados. II ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL (Gramado: 1997). Programa e Resumos... Gramado, FAO-REDBIO/EMBRAPA/UFRGS, p.163, 1997.
- PASQUAL, M.; LOPES, P.A. Efeitos da concentração e tempo de incubação em ácido indolbutírico sobre o enraizamento e posterior desenvolvimento de brotos de *Pyrus calleryana* L. obtidos *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.26, n.7, p.975-980, 1991.
- PASQUAL, M. et al. Meios de Cultura. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997, 127p. (Apostila)
- PEDROTTI, E.L.; VOLTOLINI, J.A. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização dos porta-enxertos de macieira 'Marubakaido' e 'M-9'. II ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL (Gramado: 1997). Programa e Resumos... Gramado, FAO-REDBIO/EMBRAPA/UFRGS, p.76, 1997.
- PUENTE, J.; MARIN, J.A. Splitting of *Malus* microcuttings enhances rooting. *Agronomie*, Dijon, v.12, n.10, p.795-797, 1992.

- SHA, L.; McCOWN, B.H.; PETERSON, L.A. Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot cultures. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v.110, n 6, p.631-634, 1985.
- SILVA, A.T. da et al. Multiplicação vegetativa da 'amoreira-preta' (*Rubus idaeus* L.). II. Análise dos componentes do sistema de proteção. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Cruz das Almas, v. 15, n.2, p.9-13, 1993.
- SIMMONDS, J. Direct rooting of micropropagated M-26 apple rootstock. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.21, n.3, p.233-242, 1983.
- WARDLE, K.; DOBBS, E.B.; SHORT, K.C. In vitro acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v.108, n.3, p.386-389, 1983.
- WEBSTER, C.A.; JONES, O.P. Micropropagation of the apple rootstock M-9: effect of sustained subculture on apparent rejuvenation *in vitro*. *Journal of Horticultural Science*, Ashford, v.64, n.4, p. 421-428, July 1989.
- WELANDER, M. In vitro rooting of apple rootstock 'M-26' in adult and juvenile growth phases and acclimatization of plantlets. *Physiologia plantarum*, Copenhagen, v.58, n.3, p.231-238, 1983.
- YEO, D.Y.; REED, B.M. Micropropagation of three *Pyrus* rootstocks. *HortScience*, Alexandria, v.30, n.3, p.620-623, 1995.
- YEPES, L.M.; ALDWINCKLE, H.S. Micropropagation of thirteen *Malus* cultivars and rootstocks, and effect of antibiotics on proliferation. *Plant Growth Regulation*, [s.l.], v.15, n.1, p.55-67, 1994.
- ZANOL, G.C. Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto Marubakaido (*Malus prunifolia*) afetado pela exposição de períodos de escuro, concentrações de ácido indolbutírico e floroglucinol. Pelotas: UFPEL, 1996, 81p. (Dissertação - Mestrado em Fruticultura de Clima Temperado)

CAPÍTULO 6

CRESCIMENTO DE MUDAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA 'MARUBAKAIDO' PROVENIENTES DO ENRAIZAMENTO *IN VITRO* E *EX VITRO*

Resumo: Este trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento de mudas do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' (*Malus prunifolia*) obtidas através do enraizamento *in vitro* e *ex vitro*. Para tanto, foram utilizadas brotações apicais, com cerca de 2-3 cm de comprimento e 2-3 pares de folhas no ápice, previamente mantidas *in vitro*, em dois experimentos. No primeiro, foi induzido o enraizamento *in vitro*, de duas formas: mantendo-se as brotações em meio de cultura MS acrescido de AIB ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) ou tratando-se as brotações por imersão do terço basal em solução de AIB (200 mg.L^{-1}) durante 15 segundos, com posterior inoculação em meio de cultura sem auxina. Após 45 dias para enraizamento, as brotações com raízes foram levadas para aclimatização em casa de vegetação, sendo avaliadas quinzenalmente até 60 dias após a repicagem. No segundo experimento, as brotações foram tratadas durante 15 segundos com solução de AIB, nas concentrações de 0, 100, 200 e 300 mg.L^{-1} e após, colocadas para enraizar em dois substratos (bandejas de espuma fenólica e Plantmax). Foi, então, avaliado o crescimento durante e após 150 dias da repicagem das mudas para solo na casa de vegetação. A permanência das brotações em meio com AIB proporcionou maior crescimento das mudas durante a aclimatização, em relação ao tratamento por imersão em solução de AIB durante 15 segundos. O enraizamento em Plantmax favoreceu o crescimento das mudas, especialmente da área foliar, pois possibilita a obtenção de mudas com maior desenvolvimento inicial, com reflexos positivos após a sua repicagem. Além disso, o Plantmax permite o maior aprofundamento do sistema radicular em relação à espuma fenólica. Em média, obteve-se após 60 dias, mudas com 3,6 cm de altura e 86,67% de sobrevivência (enraizamento *in vitro*) e, após 150 dias, mudas com até 55 cm de altura e 91,67% de sobrevivência (enraizamento *ex vitro*).

Palavras-chave: Rosaceae, *Malus*, micropropagação, enraizamento, ácido indolbutírico, produção de mudas

GROWTH OF 'MARUBAKAIDO' APPLE ROOTSTOCK PLANTLETS PROPAGATED THROUGH *IN VITRO* AND *EX VITRO* ROOTING

Abstract: The objective of this work was to evaluate the growth of 'Marubakaido' (*Malus prunifolia*) apple rootstock plantlets obtained through both *in vitro* and *ex vitro* rooting. Apical shoots previously maintained *in vitro* with 2-3 cm length and 2-3 pairs of apical leaves were used in two experiments. In the first experiment, rooting was induced *in vitro* by maintaining shoots in MS culture medium with IBA (1.0 mg.L⁻¹) or treating their basal region through a rapid immersion (15 seconds) in IBA (200 mg.L⁻¹) followed by a transference to culture medium without auxin. For rooting, after 45 days, shoots with adventitious roots were taken to a greenhouse for acclimatization and evaluated at 15 days interval up to 60 days. For the second experiment, shoots were treated for 15 seconds in IBA solution (0, 100, 200 and 300 mg.L⁻¹) and inoculated in two substrates (phenolic foam trays or Plantmax) for rooting induction. Plantlets growth was evaluated during and 150 days after transplanting to soil at the greenhouse. Shoots maintained on culture medium with IBA increased plantlets growth during acclimatization when compared with the rapid immersion (15 seconds) in IBA solution. Rooting in Plantmax favoured plantlets growth (especially in leaf area) by providing a high initial development with positive reflections on growth after transplant. The use of Plantmax induced the formation deeper of roots as compared with the use of phenolic foam trays. In average, while plantlets with 3.6 cm height and 86.67% survival (*in vitro* rooting) were obtained with 60 days, plantlets with 55 cm height and 91.67% survival (*ex vitro* rooting) were obtained after 150 days.

Key words: Rosaceae, *Malus*, micropropagation, rooting, indolebutyric acid, plant propagation

1 INTRODUÇÃO

A maioria dos estudos relativos à micropropagação restringe-se à resposta do enraizamento *in vitro* ou *ex vitro* ou, no máximo, à sobrevivência e crescimento das mudas em casa de vegetação durante os primeiros dias da

aclimatização. Assim, faltam informações sobre o crescimento, em fases posteriores, das mudas obtidas por micropropagação em casa de vegetação (Stimart e Harbage, 1993 e Silva et al., 1995a).

A partir do momento em que ocorre o enraizamento *in vitro* ou *ex vitro* para constituição da muda completa, é feita a repicagem para substrato em casa de vegetação. As diferenças entre o ambiente no interior do frasco de cultura e o da casa de vegetação, associadas às características morfo-fisiológicas que conferem pouca resistência da muda micropropagada ao estresse durante a transferência, fazem com que a aclimatização seja uma fase crítica da cultura de tecidos vegetais em muitas espécies. Além disso, devido a estas diferenças, o crescimento das mudas ocorre de forma diferente das mudas obtidas por métodos de propagação convencional (Ziv, 1986; Pierik, 1988; Sciutti e Morini, 1995 e Leite, 1995).

Frequentemente, mudas provenientes de laboratórios de cultura de tecidos, ao serem transferidas para a casa de vegetação, sobrevivem por períodos relativamente longos, porém crescem pouco, dificultando ou inviabilizando o uso da micropropagação em sistemas intensivos de produção de mudas. Marin e Gella (1988) mencionam que a dificuldade de transição do metabolismo heterotrófico do carbono para o autotrófico acarreta a morte ou o baixo desenvolvimento após certo tempo de aclimatização, variável conforme a espécie.

O estudo do crescimento de mudas micropropagadas, é importante para a determinação dos principais fatores que afetam a sobrevivência e o crescimento das plantas durante e após a aclimatização. Entre os principais fatores envolvidos no enraizamento de brotações estão a composição do meio de cultura (Fortes, 1992), o substrato (Ziv, 1986 e Aldrufeu, 1987), o tratamento com fitorreguladores, especialmente auxinas (Leite, 1995 e Zanol, 1996), e o ambiente de enraizamento (Gribaudo e Fronda, 1993).

McClelland, Smith e Carothers (1990) estudaram o efeito da iniciação de raízes *in vitro* ou *ex vitro* sobre a qualidade das raízes nos períodos de aclimatização e pós-aclimatização de três espécies. Os autores observaram que o enraizamento *in vitro* acarreta diferenças na morfologia e anatomia das raízes adventícias, em relação ao enraizamento *ex vitro*. Kunneman e Albers (1992) observaram que a aclimatização de mudas micropropagadas de *Malus* e *Pyrus* é influenciada não somente pelos fatores durante a aclimatização, mas também pelas condições presentes nas fases de multiplicação e enraizamento. Stimart e Harbage (1993), trabalhando com macieira 'Gala', avaliaram o efeito do número de raízes produzidas *in vitro* sobre o crescimento da raiz e da parte aérea *ex vitro* e observaram que houve correlação linear positiva entre a contagem inicial e final de raízes.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento em casa de vegetação de mudas do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' (*Malus prunifolia*) enraizadas *in vitro* e *ex vitro*, durante e após a aclimatização.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo geral das condições de cultivo *in vitro* utilizado nos experimentos está descrito no Capítulo 1. Este trabalho foi constituído de dois experimentos, quais sejam:

Experimento 1 – Crescimento de mudas de macieira 'Marubakaido' durante a aclimatização sob efeito de duas formas de enraizamento *in vitro*

Neste experimento, foram testadas duas formas de enraizamento *in vitro*:

a) manutenção dos explantes em meio de cultura acrescido de ácido indolbutírico

(AIB) a $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e b) tratamento do terço basal dos explantes durante 15 segundos com solução de AIB a 200 mg.L^{-1} e, após, inoculação em meio de cultura sem fitorreguladores. As mudas enraizadas em ambas as formas foram, então, avaliadas durante os 60 dias de aclimatização em casa de vegetação.

Como explantes, foram utilizadas brotações apicais com cerca de 2-3 cm de comprimento e 2-3 pares de folhas, previamente mantidas *in vitro*. Como meio de cultura básico, foi utilizado o meio MS, com a metade da concentração dos sais, adicionado de vitaminas ($1,5 \text{ mg.L}^{-1}$), glicina ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$) e mio-inositol (100 mg.L^{-1}), além de $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ de ágar e 30 g.L^{-1} de sacarose. O meio de cultura foi acondicionado em frascos com 150 cm^3 de capacidade, utilizando 40 ml/frasco. Parte das brotações foram inoculadas em meio acrescido de AIB e o restante, tratadas com AIB e, após escoamento do excesso de solução do fitorregulador, inoculadas em meio sem AIB.

Após 45 dias no meio para enraizamento, as mudas foram divididas em 5 lotes, correspondentes aos 5 períodos de avaliação após a repicagem (0, 15, 30, 45 e 60 dias). As mudas foram, a seguir, levadas para aclimatização em casa de vegetação dotada de sistema de nebulização intermitente, em área coberta com dupla camada de tela de sombreamento (Sombrite 50% de sombreamento), durante 60 dias. Em cada período de avaliação, foram determinadas as seguintes variáveis: altura das mudas, sobrevivência, área foliar, matéria seca da parte aérea, número de raízes primárias, número de raízes secundárias, comprimento da maior raiz e matéria seca da raiz. A área foliar foi determinada pelo método das fotocópias (Benincasa, 1988).

Como delineamento experimental, foi utilizado o inteiramente ao acaso, com 3 repetições de 10 plantas cada, em esquema fatorial 2×5 . Para as variáveis altura e sobrevivência, foi adotado o esquema em parcelas subdivididas no tempo.

Os resultados foram comparados através de análise de regressão, para os níveis de tempo e através do teste de Tukey a 5%, para as formas de enraizamento.

Experimento 2 - Avaliação do crescimento de mudas do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' enraizadas *ex vitro*

Neste experimento, foram obtidas mudas através do enraizamento *ex vitro* de brotações, testando-se dois substratos (Plantmax e bandejas de espuma fenólica) e quatro concentrações de AIB (0, 100, 200 e 300 mg.L⁻¹ durante 15 segundos). Para tanto, foram utilizadas brotações apicais produzidas *in vitro*, pré-condicionadas em meio MS sem fitorreguladores durante 30 dias, as quais, após o tratamento com AIB, foram lesionadas na base e colocadas para enraizar durante 42 dias em casa de vegetação dotada de sistema de nebulização intermitente, em área coberta com dupla camada de tela de sombreamento (Sombrite com capacidade de 50% de sombreamento). Após o período de enraizamento *ex vitro*, as mudas foram avaliadas (altura e área foliar) e repicadas para substrato (solo + composto orgânico + areia na proporção 2:1:1 v/v, adicionado de 300 g de superfosfato simples/m³) (Tabela 6.1), acondicionado em sacos plásticos (25 cm x 20 cm x 20 cm) pretos, mantendo-se as mudas com o torrão ou fragmento da bandeja de espuma fenólica junto com as raízes durante a repicagem.

Os sacos plásticos com as mudas foram mantidos na mesma casa de vegetação, porém em área sem sombreamento, durante 150 dias, ao longo dos quais foram avaliadas a altura e a sobrevivência das mudas. Após este período, foram avaliadas as seguintes variáveis, relativas ao crescimento das mudas: altura, área foliar (determinada através do método das fotocópias), matéria seca da parte aérea, matéria seca das raízes e distribuição do sistema radicular dentro

do recipiente. Para avaliação desta última variável, foram utilizadas 3 plantas por repetição dos tratamentos 100 e 300 mg.L⁻¹ de ambos os substratos.

TABELA 6.1 Resultados da análise do solo utilizado como substrato após a repicagem das mudas. Lavras, UFLA, 1999.

Nutriente/Parâmetro	Unidade	Valor	Interpretação
pH em água	-	7,1	Alcalinidade fraca
Fósforo	ppm	108	Alto
Potássio	ppm	98	Alto
Cálcio	meq/100 cc	9,6	Alto
Magnésio	meq/100 cc	0,6	Médio
Alumínio	meq/100 cc	0,0	Baixo
Boro	ppm	1,05	-
Zinco	ppm	8,5	-
Cobre	ppm	59,7	-
Ferro	ppm	25,8	-
Manganês	ppm	17,7	-
Enxofre	ppm	23,8	-
H + Al	meq/100 cc	1,5	Baixo
Soma de bases trocáveis (S)	meq/100 cc	10,5	Alto
CTC efetiva (t)	meq/100 cc	10,5	Alto
CTC a pH 7,0 (T)	meq/100 cc	12,0	Alto
Saturação de Al da CTC efetiva (m)	%	0,0	Baixo
Saturação de bases da CTC a pH 7 (V)	%	87,0	Alto
Carbono	%	3,1	Alto
Matéria orgânica	%	5,4	Alto
Areia	%	50	-
Silte ou Limo	%	26	-
Argila	%	24	-

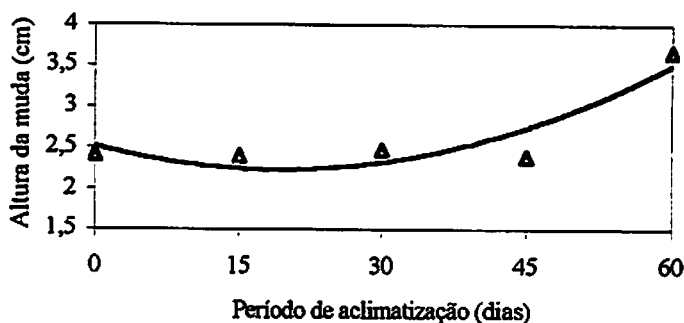
Foi adotado o delineamento experimental inteiramente ao acaso, com 3 repetições e 7 mudas por repetição. Após análise da variância, os tratamentos foram comparados através da análise de regressão para o fator AIB e através do

teste de Tukey a 5% para o fator substrato. Para as variáveis analisadas sequencialmente, foi adotado o esquema de parcelas subdivididas no tempo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1 – Crescimento de mudas de macieira ‘Marubakaido’ durante a aclimatização sob efeito de duas formas de enraizamento *in vitro*

Somente houve efeito do tempo sobre a altura das mudas, sendo que as formas de enraizamento não afetaram esta variável (Tabela 1.E - Anexo). A altura das mudas apresentou comportamento quadrático, com aparente estagnação até os 45 dias após a repicagem e aumento a partir desta avaliação (Figura 6.1).



Equação:

$$Y = 2,518 - 0,030 x + 0,0008 x^2$$

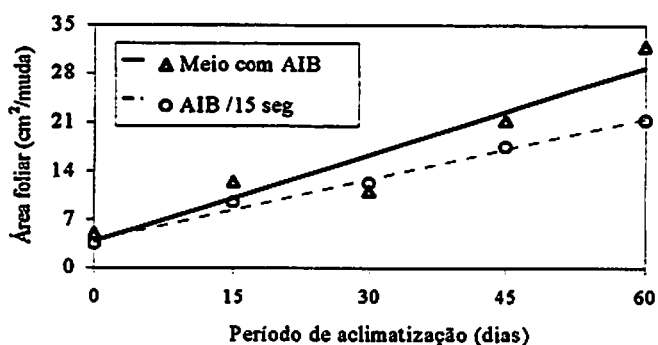
$$r^2 = 0,8310$$

FIGURA 6.1. Evolução da altura de mudas de macieira ‘Marubakaido’ durante a aclimatização. Médias de duas formas de enraizamento *in vitro*. Lavras, UFLA, 1999.

Isto ocorreu porque é comum que, na região apical das mudas, ocorra necrose nos primeiros dias de aclimatização, pois é a região mais sensível ao dessecamento. Conforme mencionado por Silva et al. (1995b), o crescimento em extensão é muito sensível a condições ambientais adversas, especialmente em tecidos jovens e tenros. Isto acarreta redução na altura média das mudas. Além disso, conforme citam Marin e Gella (1988), é necessário ocorrer, durante o início da aclimatização, a troca do metabolismo do carbono, o que atrasa o crescimento. Conforme apresentado na Figura 6.1, com o avanço do período de aclimatização, a altura passou a ter incrementos crescentes, aproximando-se da tendência sigmóide, característica das curvas clássicas de crescimento de plantas (Mohr e Schopfer, 1995).

A sobrevivência das mudas não foi afetada pelo tratamento e pelo tempo (Tabela 1.E), apresentando média de 92,67%. Embora a partir dos 15 a 30 dias tenha havido redução no total de plantas sobreviventes, atingindo 86,67% aos 45 dias, não houve ajuste a uma regressão quadrática. Valores acima de 90% de sobrevivência ou estabelecimento de plantas de macieira oriundas do enraizamento *in vitro* são mencionados por Welander (1983), Simmonds (1983) e Kunneman e Albers (1992). Durante a aclimatização de mudas de macieira cv. Greensleeves, Diaz Perez, Shackel e Sutter (1995) constataram que a redução na condutância devido à aclimatização foi o fator que mais contribuiu para a reduzida transpiração sob condições de elevada demanda evaporativa. As raízes formadas *in vitro* foram associadas com uma elevada condição hídrica, sugerindo que as raízes são funcionais na absorção de água. Os autores concluíram que as mudas micropropagadas possuem comportamento como unidades hidraulicamente integradas, nas quais deve haver coordenação entre a perda de água pela parte aérea e a absorção de água pela raiz, de modo a manter o balanço hídrico favorável.

A área foliar das mudas foi afetada pelo tratamento e pelo tempo, sendo significativa a interação entre os fatores tempo (Tabela 2.E). Conforme é demonstrado na Figura 6.2, a área foliar das mudas em ambos os tratamentos evoluiu linearmente em função do tempo, sendo que, com a manutenção do AIB no meio de cultura, os incrementos foram superiores em relação ao tratamento das brotações durante 15 segundos em solução de AIB. A condição em que as mudas enraizadas deixam o ambiente *in vitro* quando são destinadas à aclimatização afeta o seu desenvolvimento posterior (Stimart e Harbage, 1993 e Cuzzuol, 1993). Isto é demonstrado neste trabalho, pois embora a área foliar das mudas, em ambos os tratamentos, tenha partido de valores semelhantes entre si, especialmente a partir dos 30-45 dias de aclimatização, as mudas enraizadas em meio com AIB apresentaram maior incremento da área foliar.



Equações:

$$Y_{\text{Meio com AIB}} = 3,787 + 0,419 x$$

$$r^2 = 0,8953$$

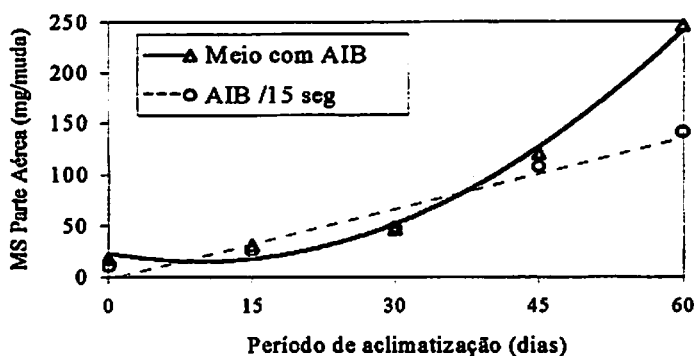
$$Y_{\text{AIB/15 Seg}} = 4,006 + 0,294 x$$

$$r^2 = 0,9898$$

FIGURA 6.2. Evolução da área foliar de mudas de macieira 'Marubakaido' durante a aclimatização, sob efeito de duas formas de enraizamento *in vitro*. Lavras, UFLA, 1999.

É possível, portanto, que as características das raízes, principalmente de conexão do sistema vascular, fossem superiores no tratamento com AIB no meio de cultura (1,0 mg/L), devido à disponibilidade constante do fitorregulador aos explantes.

O mesmo comportamento foi observado com a matéria seca da parte aérea (Tabela 2.E), como seria de se esperar, pois a área foliar geralmente apresenta estreita relação com a matéria seca da parte aérea. Conforme é apresentado na Figura 6.3, também a partir dos 45 dias passou a haver maior incremento na matéria seca da parte aérea das mudas enraizadas em meio com AIB durante todo o período de enraizamento. A partir dos 45 dias, também começou a haver maior diferença entre os tratamentos. Neste tratamento, a tendência de evolução foi quadrática, enquanto no tratamento com AIB durante 15 segundos, esta tendência foi linear.



Equações:

$$Y_{\text{Meio com AIB}} = 23,269 - 1,714 x + 0,089 x^2$$

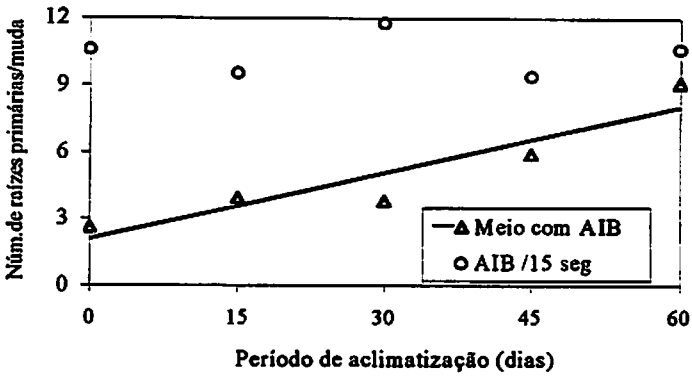
$$r^2 = 0,9915$$

$$Y_{\text{AIB/15 Seg}} = -1,833 + 2,279 x$$

$$r^2 = 0,9494$$

FIGURA 6.3. Evolução da matéria seca da parte aérea de mudas de macieira 'Marubakaido' durante a aclimatização, sob efeito de duas formas de enraizamento *in vitro*. Lavras, UFLA, 1999.

O número de raízes primárias foi afetado por ambos os fatores, sendo significativa a interação entre eles (Tabela 2.E). Somente no caso das mudas enraizadas em meio com AIB, houve efeito do tempo, sendo constatada tendência linear (Figura 6.4).



Equação e Média:

$$Y_{\text{Meio com AIB}} = 2,0703 + 0,997 x$$

$$r^2 = 0,8613$$

$$Y_{\text{AIB/15 seg}} = 10,36 \text{ raízes/muda}$$

FIGURA 6.4. Evolução do número de raízes primárias de mudas de macieira 'Marubakaido' durante a aclimatização, sob efeito de duas formas de enraizamento *in vitro*. Lavras, UFLA, 1999.

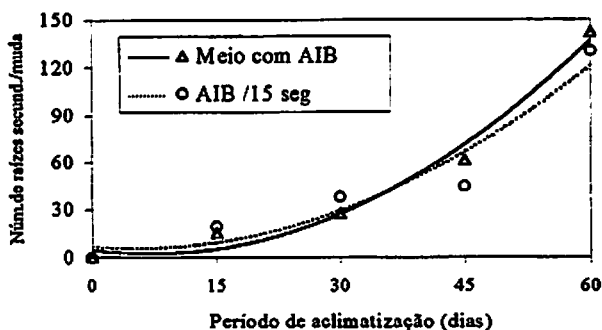
Quando o enraizamento *in vitro* foi induzido em meio contendo AIB, o percentual de enraizamento foi significativamente inferior ao do enraizamento com o tratamento com imersão rápida (83,33 e 100%, respectivamente). A auxina é importante como indutor do enraizamento, mas não deve estar presente durante o desenvolvimento das raízes (Fett Neto, 1991; Fortes, 1992 e George, 1993). Isto se manifesta claramente com o que foi observado no número de raízes primárias, embora o percentual de enraizamento não tenha sido muito comprometido. Em média, as mudas enraizadas em meio contendo AIB apresentaram 2,6 raízes/muda, significativamente inferior ao número das enraizadas da outra forma (10,36 raízes/muda).

Por outro lado, as mudas enraizadas em meio contendo AIB aumentaram o número de raízes primárias durante a aclimatização, o que não ocorreu com as mudas enraizadas com uso de AIB em tratamento com imersão rápida, provavelmente porque neste caso já havia sido atingido o limite potencial de emissão de raízes adventícias. Stimart e Harbage (1993) citam que o enraizamento não é confinado ao período imediato ao tratamento com AIB, de modo que o AIB influencia o enraizamento a curto e a longo prazo após a aplicação. Já ao serem enraizadas mudas em meio com AIB, houve efeito compensatório para atingir este limite ao longo do período de aclimatização, de modo que, em ambas as formas de enraizamento *in vitro*, pode-se atingir este número máximo desde que sejam proporcionadas condições adequadas ao desenvolvimento radicular durante a aclimatização. O número de raízes primárias é importante para o aumento da sobrevivência durante a aclimatização. Stimart e Harbage (1993) constataram relação linear positiva entre a contagem inicial e final de raízes, bem como forte correlação entre elevada emissão de raízes e o subsequente crescimento durante a aclimatização. As raízes, por serem fontes de citocininas, nutrientes e água, têm papel muito importante na aclimatização

(Marin e Gella, 1988). É importante considerar também que as raízes emitidas *ex vitro* (durante a aclimatização), tendem a ser mais funcionais do que as emitidas *in vitro* (Pierik, 1988). Zimmerman (1988) menciona que, devido à pouca funcionalidade das raízes emitidas *in vitro*, estas são substituídas por outras, mais eficientes, durante a aclimatização. Smith et al. (1992) compararam o enraizamento *in vitro* e *ex vitro* em diversas espécies lenhosas e herbáceas. Em espécies lenhosas, os autores observaram que há relação mais elevada entre o sistema vascular e a área da secção de raízes quando o enraizamento ocorre *ex vitro*, indicando a ocorrência de crescimento secundário. Isto fez com que o crescimento das mudas em área foliar e matéria seca da parte aérea fosse maior, a partir dos 30-45 dias, com o tratamento com enraizamento em AIB no meio de cultura, quando já haviam sido emitidas mais raízes. Há, portanto, necessidade de maior emissão de raízes para que o crescimento da muda seja favorecido.

O número de raízes secundárias foi afetado pelo tempo, sendo significativa a interação tratamento x tempo (Tabela 3.E). Nos dois tratamentos, houve evolução quadrática no número de raízes secundárias, com leve superioridade do tratamento com enraizamento sob efeito do AIB adicionado ao meio de cultura (Figura 6.5). Assim, pode-se observar que há pouco efeito da forma como é feito o enraizamento *in vitro* sobre este padrão de ramificação radicular.

Assim como observado com o número de raízes secundárias, a matéria seca da raiz foi afetada pelo tempo e a interação tratamento x tempo foi significativa (Tabela 3.E). Na Figura 6.6, é apresentada a evolução desta variável em função do tempo de aclimatização.

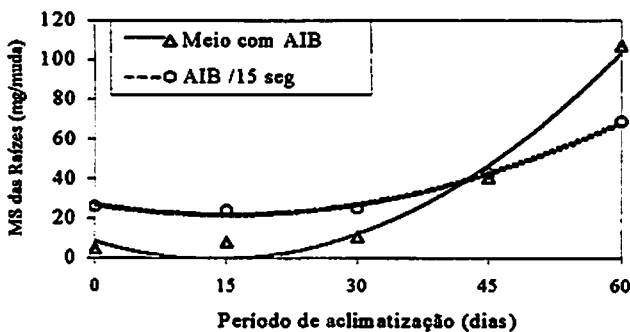


Equações:

$$Y_{\text{Meio com AIB}} = 5,015 - 0,695 x + 0,048 x^2 \quad r^2 = 0,9800$$

$$Y_{\text{AIB/15 Seg}} = 6,637 - 0,390 x + 0,038 x^2 \quad r^2 = 0,9200$$

FIGURA 6.5. Evolução do número de raízes secundárias de mudas de macieira 'Marubakaido' durante a aclimatização, sob efeito de duas formas de enraizamento *in vitro*. Lavras, UFLA, 1999.



Equações:

$$Y_{\text{Meio com AIB}} = 8,642 - 1,347 x + 0,049 x^2 \quad r^2 = 0,9801$$

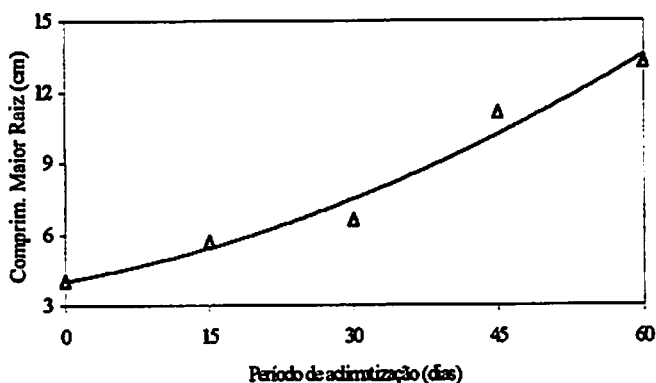
$$Y_{\text{AIB/15 Seg}} = 26,912 - 0,706 x + 0,023 x^2 \quad r^2 = 0,9926$$

FIGURA 6.6. Evolução da matéria seca das raízes de mudas de macieira 'Marubakaido' durante a aclimatização, sob efeito de duas formas de enraizamento *in vitro*. Lavras, UFLA, 1999.

Inicialmente, a matéria seca das raízes foi inferior no enraizamento com AIB no meio de cultura, devido ao menor número de raízes primárias e ao menor comprimento das raízes, apesar das raízes emitidas com o tratamento com AIB por imersão rápida serem mais finas, o que acarretaria menor matéria seca por unidade de raiz. Nos primeiros períodos da aclimatização, houve certa estagnação ou queda na matéria seca das raízes, em relação à avaliação inicial, o que pode ser atribuído à injúria provocada no sistema radicular quando da repicagem. Com o avanço do tempo de aclimatização, entretanto, esta queda inicial foi compensada. Como nas mudas enraizadas em meio com AIB houve maior emissão de raízes primárias, a matéria seca do sistema radicular, neste caso, acabou superando o valor encontrado nas mudas enraizadas com o tratamento com AIB por imersão rápida.

Sobre o comprimento da maior raiz, somente houve efeito dos fatores isolados (Tabela 3.E). Conforme é apresentado na Figura 6.7, houve ajuste a uma regressão quadrática, manifestando tendência a incrementos crescentes com o avanço do período de aclimatização.

Observa-se, ainda, que nos períodos iniciais de aclimatização, não houve redução nos valores da variável, como ocorreu na matéria seca da raiz, pois somente se considerava a maior raiz para a avaliação e como o dano no momento da repicagem foi provocado principalmente sobre as raízes de 2ª ordem ou mais, não foi observado este resultado. Somente houve diferença entre as duas formas de enraizamento no final do período de aclimatização, quando as mudas enraizadas em meio com AIB apresentaram, em média, raízes com 14,67 cm, significativamente superior à outra forma de enraizamento, no qual a média obtida foi de 11,85%.



Equação:

$$Y = 4,030 + 0,0072 x + 0,0014 x^2$$

$$r^2 = 0,9697$$

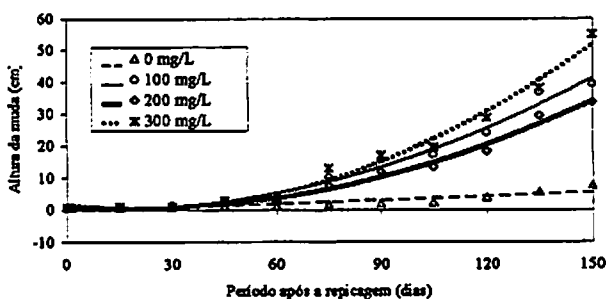
FIGURA 6.7. Evolução do comprimento da maior raiz de mudas de macieira 'Marubakaido' durante a aclimatização. Médias de duas formas de enraizamento *in vitro*. Lavras, UFLA, 1999.

Experimento 2 - Avaliação do crescimento de mudas do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' enraizadas *ex vitro*

A altura das mudas, avaliada no momento da repicagem, foi afetada apenas pelo substrato de enraizamento (Tabela 4.E), sendo que, com Plantmax, a altura foi significativamente superior à obtida utilizando-se a espuma fenólica (1,50 e 0,66 cm, respectivamente). O uso de materiais sintéticos para enraizamento, semelhantes à espuma fenólica utilizada neste trabalho, é mencionado por Avery e Beil (1991), Brochard (1987) e George (1993), mas há poucas informações sobre o seu efeito no crescimento das mudas. As características físicas e químicas do Plantmax proporcionaram melhores condições para o crescimento da muda após a emissão das raízes adventícias. Isto não ocorreu com a espuma fenólica, indicando a importância deste substrato

alternativo apenas para o início do desenvolvimento das raízes, pois em caso contrário, o crescimento e a qualidade da muda poderão ser prejudicados. A área foliar, também avaliada no momento da repicagem, apresentou o mesmo comportamento (Tabela 4.E). As mudas enraizadas em Plantmax apresentaram, em média, 11,04 cm²/muda, enquanto que, quando o enraizamento foi efetuado em espuma fenólica, esta média foi de 8,89 cm²/muda. Estas médias diferiram significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Sobre a altura das mudas, avaliada ao longo de 150 dias após a repicagem no substrato de enraizamento, houve efeito de todos os fatores, exceto do AIB (Tabela 6.E). O efeito do AIB se manifesta sobre o percentual de enraizamento e sobre a qualidade do sistema radicular (Gray e Klein, 1989 e Moucosin, 1991). Neste caso, estes efeitos não causaram diferenças no crescimento em altura das plantas, como também foi observado por Stimart e Harbage (1993). Além disso, a interação substrato x AIB x tempo foi significativa (Tabela 6.E), caracterizando a interdependência entre os efeitos dos fatores. Nas Figuras 6.8 e 6.9, é apresentada a evolução da altura das mudas em função do tempo e das concentrações de AIB das mudas enraizadas em espuma fenólica e em Plantmax, respectivamente.



Equações:

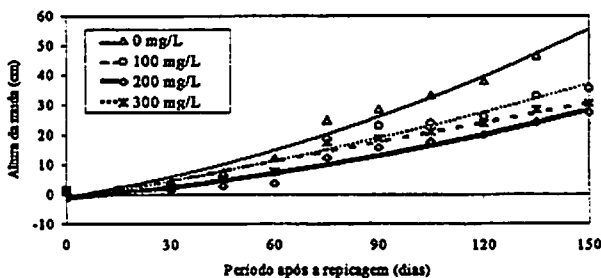
$$Y_{0 \text{ mg/L}} = -0,505 + 0,040 x \quad r^2 = 0,7706$$

$$Y_{100 \text{ mg/L}} = 0,448 - 0,049 x + 0,0021 x^2 \quad r^2 = 0,9805$$

$$Y_{200 \text{ mg/L}} = 1,125 - 0,072 x + 0,0019 x^2 \quad r^2 = 0,9866$$

$$Y_{300 \text{ mg/L}} = 1,708 + 0,128 x + 0,0031 x^2 \quad r^2 = 0,9839$$

FIGURA 6.8. Evolução da altura das mudas de macieira 'Marubakaido' enraizadas *ex vitro*, em bandejas de espuma fenólica, sob efeito de quatro concentrações de AIB, durante a aclimatização. Lavras, UFLA, 1999.



Equações:

$$Y_{0 \text{ mg/L}} = -1,710 + 0,244 x + 0,0008 x^2 \quad r^2 = 0,9771$$

$$Y_{100 \text{ mg/L}} = -1,225 - 0,170 x + 0,0006 x^2 \quad r^2 = 0,9605$$

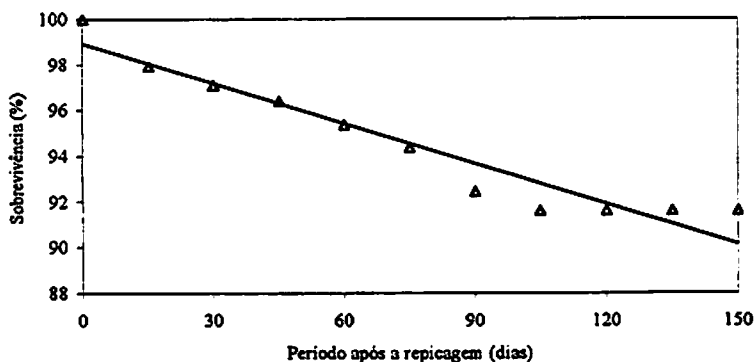
$$Y_{200 \text{ mg/L}} = -1,036 - 0,096 x + 0,0007 x^2 \quad r^2 = 0,9665$$

$$Y_{300 \text{ mg/L}} = -1,952 + 0,218 x \quad r^2 = 0,9620$$

FIGURA 6.9. Evolução da altura das mudas de macieira 'Marubakaido' enraizadas *ex vitro*, em Plantmax, sob efeito de quatro concentrações de AIB, durante a aclimatização. Lavras, UFLA, 1999.

Na maioria das concentrações, houve ajuste a uma regressão quadrática, com tendência a incrementos crescentes com o avanço do tempo, de acordo com a curva clássica de crescimento de plantas (Mohr e Schopfer, 1995). Quando o enraizamento ocorreu em espuma fenólica, observou-se que o maior crescimento em altura ocorreu com a concentração de 300 mg.L⁻¹ de AIB, com as curvas das demais concentrações apresentando valores e tendências próximos entre si, exceto na concentração “zero”, cujo crescimento foi bastante inferior ao dos demais tratamentos. Já quando utilizado o Plantmax, o maior crescimento foi observado com a concentração “zero” de AIB. A facilidade de enraizamento do porta-enxerto ‘Marubakaido’ (Zanol, 1996) pode ter contribuído para a obtenção de elevado crescimento das mudas neste substrato, após a repicagem, sem a utilização do AIB. A espuma fenólica, de modo geral, proporcionou valores em altura inferiores aos observados com o Plantmax, pois as condições físicas e químicas deste substrato são mais favoráveis ao desenvolvimento inicial das mudas, em relação às bandejas de espuma fenólica.

O percentual de sobrevivência das mudas foi afetado apenas pelo tempo, sem efeito dos demais tratamentos (Tabela 6.E), concordando com Silva et al. (1995b), os quais mencionam que a sobrevivência das mudas durante a aclimatização não é afetada pelo substrato. É importante considerar que, neste caso, a sobrevivência diz respeito ao estabelecimento de mudas enraizadas *ex vitro*, portanto sem ocorrer um estresse tão intenso quanto é observado quando mudas enraizadas *in vitro* são transferidas para a casa de vegetação (Ziv, 1986 e McClelland, Smith e Carothers, 1990). Assim, é de se esperar elevada sobrevivência e pouca resposta a tratamentos de indução do enraizamento sobre esta variável. Houve ajuste a uma regressão linear decrescente ao longo do período pós-repicagem (Figura 6.10).



Equação:

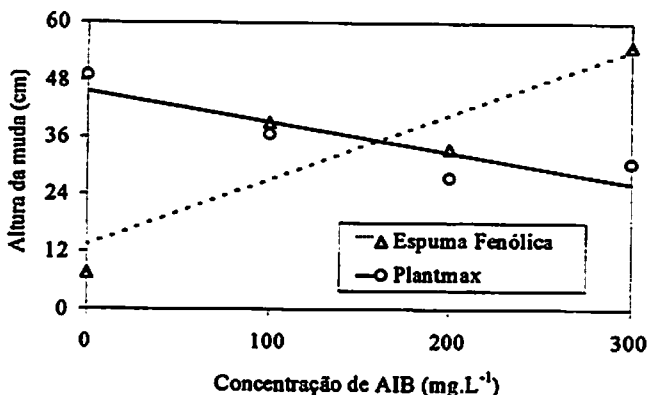
$$Y = 99,003 - 0,058 x$$

$$r^2 = 0,9213$$

FIGURA 6.10. Evolução da sobrevivência de mudas de macieira 'Marubakaido' enraizadas *ex vitro* durante a aclimatização. Médias de dois substratos e quatro concentrações de AIB. Lavras, UFLA, 1999.

Apesar disso, pode-se observar que, especialmente a partir dos 105 dias após a aclimatização, os percentuais de mudas sobreviventes mantiveram-se constantes. Como o estresse devido à repicagem foi relativamente brando, a morte das mudas em percentuais de até 8,40 % (91,6% de sobrevivência) foi devida, provavelmente, à baixa quantidade de raízes em algumas plantas, bem como a injúrias provocadas durante a repicagem.

Após 150 dias da repicagem das mudas enraizadas *ex vitro*, a altura final das mudas foi afetada pela concentração de AIB, sendo significativa a interação substrato x AIB (Tabela 5.E). Como é apresentado na Figura 6.11, houve efeito linear positivo do AIB quando o enraizamento ocorreu em espuma fenólica, e negativo, quando ocorreu em Plantmax.



Equações:

$$Y_{\text{Esp.Fenólica}} = 13,309 + 0,137 x$$

$$r^2 = 0,8022$$

$$Y_{\text{Plantmax}} = 45,644 - 0,065 x$$

$$r^2 = 0,9853$$

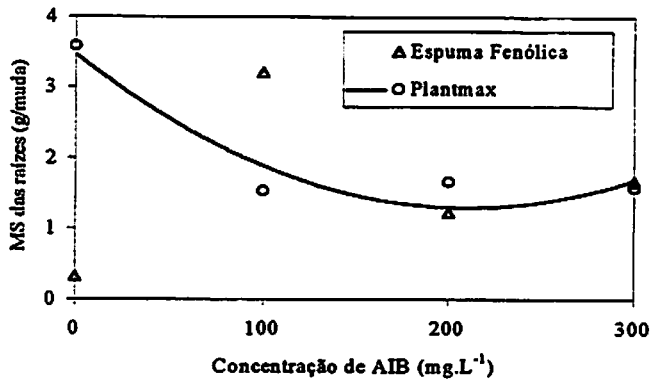
FIGURA 6.11. Efeito do AIB e do substrato de enraizamento *ex vitro* na altura de mudas de macieira 'Marubakaido' aos 150 dias após a repicagem. Lavras, UFLA, 1999.

A área foliar foi afetada apenas pelo substrato de enraizamento (Tabela 5.E), sendo que mudas enraizadas em Plantmax apresentaram, em média, 144 cm²/muda, enquanto as mudas enraizadas em espuma fenólica apresentaram 103,3 cm²/muda, médias significativamente diferentes entre si pelo Teste de Tukey a 5%. A espuma fenólica já havia proporcionado, inicialmente, área foliar inferior ao Plantmax quando da repicagem. Este efeito prolongou-se até os 150 dias, manifestando a importância de serem dadas as melhores condições para o desenvolvimento inicial das mudas, pois haverá reflexos sobre o crescimento posterior e a qualidade das mesmas (Stimart e Harbage, 1993). As melhores condições foram proporcionadas utilizando-se o Plantmax como substrato de enraizamento.

A matéria seca das raízes não foi afetada pelos fatores isolados, embora tenha sido significativa a interação substrato x AIB (Tabela 5.E). Somente quando utilizado o Plantmax, houve ajuste a uma regressão quadrática, sendo o maior valor obtido com 0 mg.L⁻¹ de AIB (Figura 6.12).

Comportamento semelhante foi observado com a matéria seca da parte aérea. Porém, neste caso, quando utilizado o Plantmax como substrato, houve decréscimo linear em função do aumento da concentração de AIB (Figura 6.13).

Na Figura 6.14, são representados graficamente os valores de altura e de área foliar obtidos nas avaliações inicial (na repicagem) e final (aos 150 dias após a repicagem) nos dois substratos utilizados. Observa-se que a maior diferença de valores entre os substratos foi obtida com a área foliar, enquanto que com a altura, não houve diferença significativa entre os valores nos dois substratos. Porém, a altura teve maiores incrementos do que a área foliar, como é apresentado na base da Figura 6.14. Este resultado pode ser devido ao fato de que as mudas encontravam-se em casa de vegetação onde, embora não houvesse cobertura com tela de sombreamento, a luminosidade era parcial em relação ao ambiente externo, causando alongamento maior das mudas, comparativamente à emissão de novas folhas.



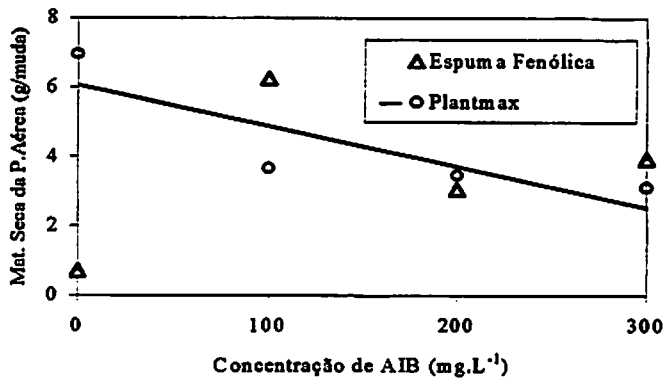
Equação e Média:

Média *Espuma Fenólica* = 1,61 g/muda

$Y_{\text{Plantmax}} = 3,467 - 0,021 x + 0,00005 x^2$

$r^2 = 0,9041$

FIGURA 6.12. Efeito do AIB e do substrato na matéria seca (MS) das raízes de mudas de macieira 'Marubakaido' enraizadas *ex vitro* aos 150 dias após a repicagem. Lavras, UFLA, 1999.



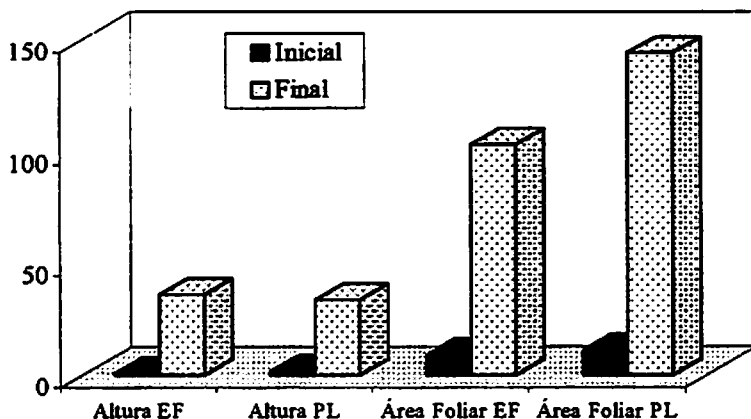
Equação e Média:

Média *Espuma Fenólica* = 3,48 g/muda

$Y_{\text{Plantmax}} = 6,053 - 0,012 x$

$r^2 = 0,7175$

FIGURA 6.13. Efeito do AIB e do substrato na matéria seca da parte aérea de mudas de macieira 'Marubakaido', enraizadas *ex vitro*, aos 150 dias após a repicagem. Lavras, UFLA, 1999.



Incrementos em relação ao valor inicial (%)	5345	2153	1062	1206
---	------	------	------	------

FIGURA 6.14. Altura (cm) e área foliar (cm²/muda) de mudas de macieira 'Marubakaido' enraizadas *ex vitro*, em espuma fenólica (EF) ou em Plantmax (PL) no momento da repicagem (Inicial) e 150 dias após (Final). Lavras, UFLA, 1999.

Na Figura 6.15, é representada graficamente a distribuição das raízes dentro do recipiente onde as mudas foram mantidas durante 150 dias, nos tratamentos com 100 e 300 mg.L⁻¹ de AIB, nos dois substratos. Observa-se que, em ambas as concentrações de AIB, o Plantmax possibilitou o maior aprofundamento do sistema radicular. Utilizando-se o Plantmax como substrato de enraizamento *ex vitro*, obtiveram-se 66,47% da matéria seca das raízes até os 14 cm de profundidade (100 mg.L⁻¹) e 64,45% (300 mg.L⁻¹). Já com a espuma fenólica, estes percentuais foram de 71,68 e 90,90%. Quanto maior o percentual de raízes na camada superficial, menor o aprofundamento do sistema radicular e

maior a suscetibilidade a estresse hídrico ao serem repicadas as mudas para o viveiro (Rom, 1987). Uma das características de mudas produzidas através da propagação vegetativa, como é o caso da estaquia, é a emissão do sistema radicular com pouca profundidade, causando maior sensibilidade a estresse hídrico e a danos por herbicidas, bem como menor ancoragem da planta no pomar (Hartmann, Kester e Davies, 1990). Embora este efeito tenha sido causado durante o enraizamento *ex vitro*, prolongou-se mesmo após 150 dias (5 meses) da repicagem em substrato. A resistência mecânica, a baixa drenagem, a presença de resíduos de fenóis e a permanência de um fragmento de espuma após a repicagem da muda foram os principais fatores que causaram baixo valor de altura na repicagem, bem como menor crescimento do sistema radicular e de alguns parâmetros da parte aérea da muda após 150 dias.

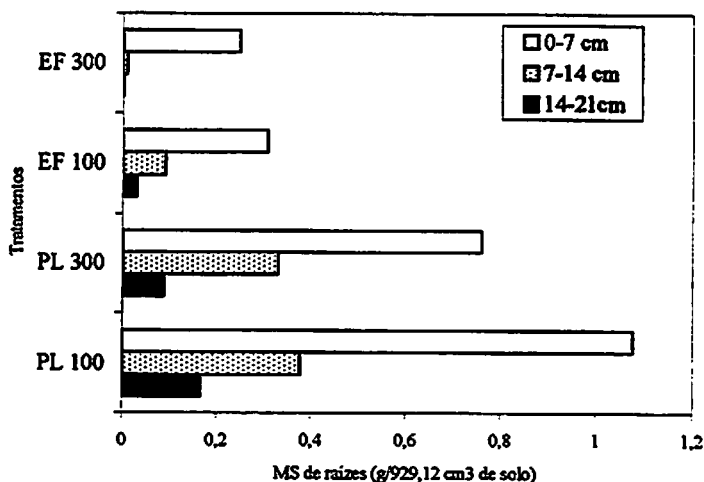


FIGURA 6.15. Distribuição de raízes de mudas do porta-enxerto Marubakaido no interior da embalagem. Lavras, UFLA, 1999.

Considerações gerais

Comparando-se as duas formas de enraizamento, observam-se diferenças quanto ao crescimento e sobrevivência das mudas durante e após a aclimatização.

Tomando-se os melhores resultados obtidos nestes experimentos, pode-se verificar estas diferenças com base em três critérios: a) rendimento de mudas (proporção do total inicial de explantes que originou mudas completas e com características adequadas para comercialização); b) tempo para produção da muda e c) altura média das mudas. Na Tabela 6.2, são apresentados estes resultados para comparação entre as formas de enraizamento.

TABELA 6.2. Comparação entre duas formas de enraizamento de brotações de macieira 'Marubakaido' com relação ao rendimento, tempo para produção e altura média das mudas. Lavras, UFLA, 1999.

Critério	Fase	<i>In vitro</i>	<i>Ex vitro</i>
Rendimento de mudas (%)	Enraizamento	100,00	72,40
	Sobrevivência	86,67	95,50
	Estande final ¹	86,67	69,14 ²
Tempo para produção da muda (dias)	Pré-condicionamento	-	30
	Enraizamento	45	42
	Crescimento da muda	60	60
	Total	105	132
Altura da muda (cm)	Após o enraizamento	2,52	1,71
	Após 60 dias da repicagem	3,60	15,81 ²

¹ Obtido aos 60 dias após a repicagem

² Valores estimados com base nas regressões ajustadas aos resultados.

O rendimento de mudas foi superior quando o enraizamento ocorreu *in vitro*, pois o porta-enxerto 'Marubakaido', por ser de relativamente fácil enraizamento, possibilita a obtenção de elevado percentual de explantes enraizados, os quais, na aclimatização, tendem a apresentar sobrevivência superior a 80%, pois já possuem raízes. Estas raízes, embora apresentem funcionalidade parcial, contribuem para o estabelecimento durante a aclimatização. Já o enraizamento *ex vitro* é limitado pela elevada sensibilidade das brotações micropropagadas ao estresse hídrico e nutricional, de modo que apenas 72,4% das brotações enraizaram. Porém, neste caso, por ocorrerem simultaneamente o enraizamento e a aclimatização, a sobrevivência é mais elevada do que quando o enraizamento ocorre *in vitro*.

Observou-se, também, que o enraizamento *in vitro* requer tempo mais curto para produção da muda, cerca de 30 dias a menos em relação ao enraizamento *ex vitro*. Estes períodos, entretanto, podem ser reduzidos a cerca de 20 dias para o pré-condicionamento e 20-25 dias para o enraizamento. O pré-condicionamento torna-se necessário para que a brotação seja menos sensível ao estresse provocado quando da retirada do ambiente *in vitro*.

A maior diferença entre as duas formas de enraizamento é manifestada ao se comparar a altura das mudas aos 60 dias após o enraizamento/repicagem. As mudas enraizadas *ex vitro*, por aclimatizarem-se à medida que enraizam, bem como por possuírem raízes mais funcionais em relação às mudas enraizadas *in vitro*, crescem mais vigorosamente e originam mudas de melhor qualidade. Porém, há que se considerar que as mudas enraizadas *in vitro* foram mantidas durante 60 dias em bandejas com volume limitado de substrato, do qual foram lixiviados parte dos nutrientes devido à nebulização, o que desfavoreceu o crescimento das mesmas. Esta limitação, porém, pode ser minimizada ao se

repicarem as mudas para o solo, tão logo ocorra a adaptação ao ambiente externo.

4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pode-se afirmar que:

- a) o crescimento das mudas durante e após a aclimatização é afetado pelas condições de enraizamento *in vitro* ou *ex vitro*;
- b) a permanência das brotações em meio com AIB proporciona melhores resultados em relação à imersão em solução durante 15 segundos;
- c) o Plantmax, como substrato para enraizamento *ex vitro* proporciona a obtenção de mudas mais vigorosas e com raízes mais aprofundadas em relação à espuma fenólica.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDRUFEU, A. Rooting and acclimatization of *Pelargonium zonale* plantlets. *Acta Horticulturae*, Wageningen, v.212, p.361-366, 1987.
- AVERY, J.D.; BEYL, C.B. Propagation of peach cuttings using foam cubes. *HortScience*, Alexandria, v.26, n.9, p.1152-1154, 1991.
- BENINCASA, M.M.P. *Análise de crescimento de plantas*. Jaboticabal: FUNEP, 1988. 42p.

- BROCHARD, P.** Use of Milcap® substrates for in vitro rooting and coming out of plants obtained by micropropagation. *Acta Horticulturae*, Wageningen, n.212, p.322, 1987.
- CUZZUOL, G.R.F.** Parâmetros bioquímicos e fisiológicos da vitrificação e do desenvolvimento do cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro*. Piracicaba, ESALQ, 1993, 89p. (Dissertação - Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas)
- DIAZ PEREZ, J.C.; SHACKEL, K.A.; SUTTER, E.G.** Effects of in vitro-formed roots and acclimatization on water status and gas exchange of tissue-cultured apple shoots. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v.120, n.3, p.435-440, 1995.
- FETT NETO, A.G.** Aspectos bioquímicos e morfológicos da rizogênese adventícia *in vitro*, em ramos de *Sequoia sempervirens* (D.Dos) Endl. Viçosa: UFV, 1991, 82p. (Tese - Mestrado em Fisiologia Vegetal)
- FORTES, G.R. de L.** Calogênese e organogênese *in vitro* de macieira (*Malus* spp.) afetadas por fatores físicos, químicos e biológicos. Viçosa: UFV, 1992, 163p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia)
- GEORGE, E.F.** Plant propagation by tissue culture – Part 1: The technology. 2nd ed. Edington: Exegetics, 1993. 786p.
- GRAY, D.J.; KLEIN, C.M.** In vitro micropropagation and plant establishment of 'Blanc du Bois' grape. *Proceedings of Florida State Horticultural Society*, Tampa, v.102, n.1, p.221-223, Nov. 1989.
- GRIBAUDO, I.; FRONDA, A.** L'ambientamento delle piante frutticole micropropagate. *Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura*, Bologna, v.51, n.1, p.75-80, 1993.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, JR., F.T.** Plant Propagation: principles and practices. 5.ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1990. 647p.
- KUNNEMAN, B.P.A.M.; ALBERS, M.R.J.** Effects of tissue culture and acclimatization conditions on the survival and growth of rooted and unrooted *Malus* and *Pyrus* microcuttings. *Acta Horticulturae*, Wageningen, n.314, p.147-154, 1992.

- LEITE, G.B. Efeito de reguladores de crescimento, substratos, sacarose e intensidade luminosa na micropropagação e pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Bartlett e do clone OH x F97. Pelotas: UFPEL, 1995, 50p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia)
- MARIN, J.A.; GELLA, R. Is desiccation the cause of the poor survival rate in the acclimatization of micropropagated *Prunus cerasus* L.? *Acta Horticulturae*, Wageningen, n.230, p.105-112, 1988.
- McCLELLAND, M.T; SMITH, M.A.L.; CAROTHERS, Z.B. The effects of in vitro and ex vitro root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrechts, v.23, n.1, p.115-123, 1990.
- MOHR, H.; SCHOPFER, P. *Plant Physiology*. Berlin: Springer-Verlag, 1995. 629p.
- MOUCOSIN, C. Rooting of in vitro cuttings. In: BAJAJ, Y.P.S. (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry - High Tech and Micropropagation I - Trees 1*. Berlin: Springer-Verlag, 1991, p. 231-261.
- PIERIK, R.L.M. Handicaps for the large scale commercial application of micropropagation. *Acta Horticulturae*, Wageningen, n. 230, p.63-71, 1988.
- ROM, R.C. Roots. In: ROM, R.C.; CARLSON, R.F. *Rootstocks for fruit crops*. New York: John Wiley & Sons, 1987, p.5-28.
- SCIUTTI, R.; MORINI, S. Water loss and photosynthesis of plum plantlets is influenced by relative humidity during rooting *in vitro*. *Journal of Horticultural Science*, Ashford, v.70, n.2, p.221-228, 1995.
- SILVA, A.T. da et al. Crescimento e desenvolvimento de plantas provenientes da cultura de tecidos. *Revista Ceres*, Viçosa, v.42, n.241, p. 243-252, 1995a.
- SILVA, A.T. da et al. Aclimação de plantas provenientes da cultura *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.30, n.1, p.49-53, 1995b.
- SIMMONDS, J. Direct rooting of micropropagated M-26 apple rootstock. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.21, n.3, p.233-242, 1983.

- SMITH, M.A.L. et al. Rhizogenesis pretreatments and effects on microcuttings during transition. *Acta Horticulturae*, Wageningen, n.319, p.77-82, 1992
- STIMART, D.P.; HARBAGE, J.F. Growth of rooted 'Gala' apple microcuttings ex vitro as influenced by initial adventitious root count. *HortScience*, Alexandria, v.28, n.6, p.664-666, June 1993
- WELANDER, M. In vitro rooting of apple rootstock 'M-26' in adult and juvenile growth phases and acclimatization of plantlets. *Physiologia plantarum*, Copenhagen, v.58, n.3, p.231-238, 1983.
- ZANOL, G.C. Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto Marubakaido (*Malus prunifolia*) afetado pela exposição de períodos de escuro, concentrações de ácido indolbutírico e floroglucinol. Pelotas: UFPEL, 1996, 81p. (Dissertação – Mestrado em Fruticultura de Clima Temperado)
- ZIMMERMAN, R.H. Micropropagation of woody plants: post tissue culture aspects. *Acta Horticulturae*, Wageningen, n.227, p.489-499, 1988.
- ZIV, M. In vitro hardening and acclimatization of tissue culture plants. In: WITHERS, L.A.; ALDERSON, P.G. *Plant tissue culture and its agricultural applications*. London: Butterworths, 1986, p.187-196.

ANEXOS

ANEXO A (CAPÍTULO 2)

	Página
TABELA 1.A	201
Resumo do Quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Substratos no enraizamento <i>in vitro</i> e aclimatização de mudas do porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido’”</u> (Fase após o enraizamento <i>in vitro</i>)	
TABELA 2.A	201
Resumo do Quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Substratos no enraizamento <i>in vitro</i> e aclimatização de mudas do porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido’”</u> (Fase após a aclimatização)	
TABELA 3.A	202
Resumo do Quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Substratos na indução e desenvolvimento de raízes adventícias em brotações de macieira ‘Marubakaido’ e ‘M-26’ ”</u> (Primeira Fase / Avaliações sequenciais durante o enraizamento <i>in vitro</i>)	
TABELA 4.A	202
Resumo do Quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Substratos na indução e desenvolvimento de raízes adventícias em brotações de macieira ‘Marubakaido’ e ‘M-26’ ”</u> (Primeira Fase / Avaliação após o enraizamento <i>in vitro</i>)	
TABELA 5.A	203
Resumo do Quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Substratos na indução e desenvolvimento de raízes adventícias em brotações de macieira ‘Marubakaido’ e ‘M-26’ ”</u> (Primeira Fase / Avaliação após a aclimatização).	

	Página	
TABELA 6.A	Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Substratos na indução e desenvolvimento de raízes adventícias em brotações de macieira ‘Marubakaido’ e ‘M-26’ ”</u> (Segunda Fase / Avaliação após o enraizamento <i>in vitro</i>)	203
TABELA 7.A	Resumo do Quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Substratos na indução e desenvolvimento de raízes adventícias em brotações de macieira ‘Marubakaido’ e ‘M-26’ ”</u> (Segunda Fase / Avaliação após a aclimatização)	204
TABELA 8.A	Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Substratos na aclimatização de mudas do porta-enxerto ‘Marubakaido’ enraizadas <i>in vitro</i>”</u> (Avaliações sequenciais durante a aclimatização).	205
TABELA 9.A	Resumo do Quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Substratos na aclimatização de mudas do porta-enxerto ‘Marubakaido’ enraizadas <i>in vitro</i>”</u> (Avaliação após a aclimatização)	205

TABELA 1.A. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Substratos no enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas do porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido’” (Fase após o enraizamento *in vitro*). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Enraizamento		Altura da muda		Número de raízes primárias	
		QM	Prob >F	QM	Prob >F	QM	Prob >F
Substrato	1	5.208,33	0,00001	0,90	0,0039	60,14	0,0102
Proporção	5	3.645,83	0,00003	0,34	0,0093	55,03	0,0003
Substrato x Proporção	5	1.333,33	0,00009	0,47	0,0016	26,34	0,0173
Resíduo	36	355,90	-	0,09	-	8,26	-
Total	47	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	66,67 %		1,50 cm		6,43 raízes/muda	
Coef. Variação	-	28,30 %		20,33 %		44,69 %	

201

TABELA 2.A. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Substratos no enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas do porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido’” (Fase após a aclimatização). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Sobrevivência		Altura da muda		Núm. Rzs. Primárias		Mat. Seca P. Aérea		Mat. Seca Raízes	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F
Substrato	1	25.519,58	0,00001	9,49	0,00007	15,10	0,3207	186,02	0,00001	450,00	0,0066
Proporção	5	2.437,62	0,0007	2,07	0,00003	87,06	0,0001	66,00	0,00001	991,14	0,00001
Substr. x Prop.	5	1.102,00	0,0396	1,07	0,00001	38,24	0,00007	12,21	0,00002	447,82	0,00009
Resíduo	36	419,77	-	0,11	-	4,53	-	1,08	-	54,05	-
Total	47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	66,04 %		2,08 cm		7,66 rzs / muda		6,28 mg/muda		14,90 g/muda	
Coef. Variação	-	31,03 %		16,10 %		27,78 %		20,33 %		49,34 %	

TABELA 3.A. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Substratos na indução e desenvolvimento de raízes adventícias em brotações de macieira ‘Marubakaido’ e ‘M-26’” (Primeira Fase / Avaliações sequenciais durante o enraizamento *in vitro*). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Enraizamento <i>in vitro</i>	
		QM	Prob > F
Repetição	3	-	-
Porta-enxerto	1	62.585,85	0,00001
Substrato	2	24.430,74	0,00002
Porta-enxerto x Substrato	2	13.893,03	0,00010
Resíduo (A)	15	619,98	-
Parcelas	23	-	-
Tempo	7	4.560,87	0,00001
Porta-enxerto x Tempo	7	2.468,67	0,00001
Substrato x Tempo	14	1.397,27	0,00001
P.enxerto x Substrato x Tempo	14	672,09	0,00001
Resíduo (B)	126	69,01	-
Total	191	-	-
Média Geral	-	23,56 %	
Coef. Variação (A)	-	37,36 %	
Coef. Variação (B)	-	35,26 %	

TABELA 4.A. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Substratos na indução e desenvolvimento de raízes adventícias em brotações de macieira ‘Marubakaido’ e ‘M-26’” (Primeira Fase / Avaliação após o enraizamento *in vitro*). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Enraizam. <i>in vitro</i>		Altura da muda		Núm. Rzs. Prim.	
		QM	Prob >F	QM	Prob >F	QM	Prob >F
Porta-enxerto	1	18.517,03	0,00001	1,53	0,00002	39,32	0,00007
Substrato	2	6.327,41	0,00001	1,54	0,00001	25,51	0,00006
P.enx. x Subs.	2	3.050,41	0,00011	0,10	0,0774	11,05	0,00172
Resíduo	18	160,62	-	0,03	-	1,14	-
Total	23	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	37,30 %		0,94 cm		2,11 raízes/muda	
Coef. Variação	-	33,98 %		19,38 %		50,61 %	

TABELA 5.A. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Substratos na indução e desenvolvimento de raízes adventícias em brotações de macieira ‘Marubakaido’ e ‘M-26’” (Primeira Fase / Avaliação após a aclimatização). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Sobrevivência		Altura da muda		Núm. Rzs. Prim.		Mat. Seca P. Aérea		Mat. Seca Raízes	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F
Porta-enxerto	1	3.631,70	0,0067	1,88	0,0959	267,73	0,00001	1,60	0,5306	1,00	0,5038
Substrato	2	437,27	0,3461	0,87	0,2701	59,05	0,00029	6,00	0,1476	6,60	0,0604
P.enx. x Subs.	2	1.514,18	0,0380	0,31	0,6181	31,09	0,00366	1,00	0,9505	1,00	0,6321
Resíduo	18	387,33	-	0,62	-	3,92	-	2,80	-	2,00	-
Total	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	43,25 %		1,78 cm		6,44 rzs / muda		6,90 mg/muda		4,00 mg/muda	
Coef. Variação	-	45,50 %		44,20 %		30,75 %		76,33 %		113,64 %	

TABELA 6.A. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Substratos na indução e desenvolvimento de raízes adventícias em brotações de macieira ‘Marubakaido’ e ‘M-26’” (Segunda Fase / Avaliação após o enraizamento *in vitro*). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Altura da muda		Número de raízes		Enraizamento		Morte de brotações	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F
Porta-enxerto	1	3,46	0,00001	16,28	0,00011	463,11	0,15166	4.251,63	0,00301
Substrato	2	1,83	0,00001	112,41	0,00001	14.743,07	0,00001	2.904,90	0,00304
P.enx. x Subs.	2	0,15	0,1032	45,72	0,00001	2.335,45	0,00067	2.537,43	0,00524
Resíduo	24	0,06	-	0,62	-	214,71	-	380,96	-
Total	29	-	-	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	1,77 cm		3,30 raízes/muda		43,93 %		13,81 %	
Coef. Variação	-	14,04 %		23,77 %		33,36 %		141,33 %	

TABELA 7.A. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Substratos na indução e desenvolvimento de raízes adventícias em brotações de macieira ‘Marubakaido’ e ‘M-26’” (Segunda Fase / Avaliação após a aclimatização). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Sobrevivência		Altura da muda		Núm. de raízes primárias		Mat.Seca P. Aérea		Mat. Seca Raízes	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F
Porta-enxerto	1	175,26	0,5869	0,30	0,1337	1.291,14	0,00002	0,0055	0,0033	0,0049	0,00033
Substrato	2	2.558,49	0,0008	1,82	0,0002	850,88	0,00001	0,0095	0,0006	0,0086	0,00001
P.enx. x Subs.	2	171,52	0,5139	0,33	0,0925	173,94	0,01063	0,0018	0,04224	0,0015	0,00746
Resíduo	18	247,48	-	0,13	-	31,51	-	0,0005	-	0,0002	-
Total	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	29,77 %		2,06 cm		16,05 rzs/muda		0,049 g/muda		0,042 g/muda	
Coef. Variação	-	52,85 %		17,26 %		34,97 %		45,76 %		37,60 %	

TABELA 8.A. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Substratos na aclimatização de mudas do porta-enxerto ‘Marubakaido’ enraizadas *in vitro*” (Avaliações sequenciais durante a aclimatização). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Sobrevivência		Altura da muda	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F
Repetição	3	-	-	-	-
Substrato	4	276,04	0,72679	1,05	0,03119
Resíduo (A)	12	533,59	-	0,27	-
Parcelas	19	-	-	-	-
Tempo	5	2.651,19	0,00001	0,97	0,00001
Substrato x Tempo	20	48,78	0,64360	0,03	0,14338
Resíduo (B)	75	57,15	-	0,02	-
Total	119	-	-	-	-
Média Geral	-	73,71 %		1,75 cm	
Coef. Variação (A)	-	12,79 %		12,19 %	
Coef. Variação (B)	-	10,26 %		7,81 %	

TABELA 9.A. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Substratos na aclimatização de mudas do porta-enxerto ‘Marubakaido’ enraizadas *in vitro*” (Avaliação após a aclimatização). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Altura da muda		Núm. de rzs. prim.		Mat. Seca Parte Aérea		Matéria Seca Raízes	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F
Substrato	4	0,08	0,3992	11,29	0,0485	0,00011	0,36147	0,00003	0,14421
Resíduo	15	0,07	-	3,67	-	0,00010	-	0,00001	-
Total	19	-	-	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	2,10 cm		12,01 raízes/muda		0,0429 g/muda		0,0174 g/muda	
Coef. Variação	-	12,79 %		15,95%		22,82 %		20,61 %	

ANEXO B (CAPÍTULO 3)

	Página
TABELA 1.B	209
Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “ <u>Influência do teor de sacarose na multiplicação, enraizamento <i>in vitro</i> e aclimatização de mudas de macieira ‘Marubakaido’</u> ” (Fase de multiplicação <i>in vitro</i>)	
TABELA 2.B	209
Resumo do Quadro de análise de variância. Experimento: “ <u>Influência do teor de sacarose na multiplicação, enraizamento <i>in vitro</i> e aclimatização de mudas de macieira ‘Marubakaido’</u> ” (Avaliações sequenciais durante o enraizamento <i>in vitro</i>).	
TABELA 3.B	210
Resumo do Quadro de análise de variância. Experimento: “ <u>Influência do teor de sacarose na multiplicação, enraizamento <i>in vitro</i> e aclimatização de mudas de macieira ‘Marubakaido’</u> ” (Fase após enraizamento <i>in vitro</i>)	
TABELA 4.B	210
Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “ <u>Influência do teor de sacarose na multiplicação, enraizamento <i>in vitro</i> e aclimatização de mudas de macieira ‘Marubakaido’</u> ” (Fase após aclimatização)	
TABELA 5.B	211
Resumo do Quadro de análise de variância. Experimento: “ <u>Influência do teor de sacarose na multiplicação, enraizamento <i>in vitro</i> e aclimatização de mudas de macieira ‘Marubakaido’</u> ” (Fase após subcultivo para meio sem sacarose)	

	Página
TABELA 6.B	211
<p>Resumo do Quadro de análise de variância. Experimento: "<u>Efeito de concentrações de sacarose e do selamento do recipiente de cultivo sobre o enraizamento <i>in vitro</i> e aclimatização de mudas de macieira 'Marubakaido'</u>" (Fase após enraizamento <i>in vitro</i>)</p>	
TABELA 7.B	212
<p>Resumo do Quadro de análise de variância. Experimento: "<u>Efeito de concentrações de sacarose e do selamento do recipiente de cultivo sobre o enraizamento <i>in vitro</i> e aclimatização de mudas de macieira 'Marubakaido'</u>" (Fase após aclimatização)</p>	

TABELA 1.B. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Influência do teor de sacarose na multiplicação, enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de macieira ‘Marubakaido’ ” (Fase de multiplicação *in vitro*). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Matéria seca das microestacas		Rendimento de microestacas	
		QM	Prob >F	QM	Prob >F
Sacar. multiplic.	2	0,42	0,06800	4,02	0,02927
Resíduo	6	0,58	-	0,59	-
Total	8	-	-	-	-
Média Geral	-	3,21 mg/microestaca		3,41microestacas/brot.axilar	
Coef. Variação	-	9,66 %		22,64 %	

TABELA 2.B. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Influência do teor de sacarose na multiplicação, enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de macieira ‘Marubakaido’ ” (Avaliações sequenciais durante o enraizamento *in vitro*). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Enraizamento <i>in vitro</i>	
		QM	Prob > F
Repetição	2	-	-
Sac. Multiplic.	2	110,55	0,80922
Sac. Enraizam.	3	3.996,94	0,00127
Sac. Mult.x Sac. Enraiz.	6	1.049,24	0,10111
Resíduo (A)	22	-	-
Parcelas	35	-	-
Tempo	7	50.166,03	0,00001
Sac. Mult. x Tempo	14	101,55	0,17449
Sac. Enraiz. x Tempo	21	357,32	0,00001
Sac.Mult x Sac.Enr x Tempo	42	148,87	0,00129
Resíduo (B)	168	74,34	-
Total	287	-	-
Média Geral	-	45,04 %	
Coef. Variação (A)	-	17,76 %	
Coef. Variação (B)	-	19,14 %	

TABELA 3.B. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Influência do teor de sacarose na multiplicação, enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de macieira ‘Marubakaido’” (Fase após enraizamento *in vitro*). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Enraiz. <i>in vitro</i>		Altura da muda		Núm.Rzs. Prim.		Número de folhas		% Mat.Seca	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F
Sacar. Multip.	2	216,08	0,5269	0,108	0,5019	5,41	0,5504	7,46	0,04567	20,75	0,08455
Sacar. Enraiz.	3	792,27	0,0876	0,117	0,5213	21,96	0,0339	6,55	0,04671	330,29	0,00001
Sac. Multip. x Sac. Enraiz.	6	360,02	0,3854	0,096	0,7013	1,46	0,9635	0,95	0,84269	18,07	0,06078
Resíduo	24	324,07	-	0,150	-	6,49	-	2,14	-	7,62	-
Total	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	84,26 %		2,24 cm		6,06 raízes/muda		9,34 folhas/muda		23,66 %	
Coef. Variação	-	21,37 %		17,35 %		42,06 %		15,65 %		11,67 %	

TABELA 4.B. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Influência do teor de sacarose na multiplicação, enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de macieira ‘Marubakaido’” (Fase após aclimatização). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Sobrevivência		Núm.Rzs.Prim.		Altura da muda		MS Parte Aérea		MS Raízes	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F
Sacar. Multip.	2	461,76	0,00236	18,48	0,52660	1,02	0,00220	0,0010	0,32120	0,0002	0,59588
Sacar. Enraiz.	3	2.465,08	0,00001	74,17	0,04355	0,84	0,00219	0,0019	0,09734	0,0011	0,04567
Sac. Multip. x Sac. Enraiz.	6	375,42	0,00049	23,20	0,53869	0,50	0,00644	0,0009	0,37020	0,0003	0,52721
Resíduo	24	56,36	-	23,68	-	0,12	-	0,0008	-	0,0004	-
Total	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	40,32 %		8,03 raízes/muda		2,12 cm		0,0402 g/muda		0,0247 g/muda	
Coef. Variação	-	18,62 %		60,61 %		16,60 %		75,59 %		11,67 %	

TABELA 5.B. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Influência do teor de sacarose na multiplicação, enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de macieira ‘Marubakaido’ ” (Fase após subcultivo para meio sem sacarose). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Matéria fresca das mudas	
		QM	Prob > F
Fase (inicial/final)	1	0,1349	0,00010
Sacarose na multiplicação	2	0,0268	0,01758
Sacarose no enraizamento	3	0,0411	0,00098
Fase x Sacar. Multiplicação	2	0,0001	0,98413
Fase x Sacar. Enraizamento	3	0,0053	0,53065
Sacar. Mult. x Sacar. Enraiz.	6	0,0103	0,14430
Fase x Sac. Multip. x Sac. Enr.	6	0,0093	0,18885
Resíduo	48	0,0061	-
Total	71	-	-
Média Geral	-	0,37 g/muda	
Coef. Variação	-	21,40 %	

TABELA 6.B. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Efeito de concentrações de sacarose e do selamento do recipiente de cultivo sobre o enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de macieira ‘Marubakaido’ ” (Fase após enraizamento *in vitro*). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Enraizamento		Núm. rzs. prim.		Altura da muda	
		QM	Prob >F	QM	Prob >F	QM	Prob >F
Selamento	1	175,72	0,14518	0,0055	0,91856	0,061	0,31853
Sacarose	3	8.989,84	0,00001	11,481	0,00001	0,573	0,00039
Selam.xSacar.	3	1.026,49	0,00010	1,2293	0,11252	0,477	0,00091
Resíduo	24	78,84	-	0,5573	-	0,059	-
Total	31	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	77,34 %		3,64 raízes/muda		2,40 cm	
Coef. Variação	-	11,48 %		20,52 %		10,10 %	

TABELA 7.B. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Efeito de concentrações de sacarose e do selamento do recipiente de cultivo sobre o enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de macieira ‘Marubakaido’” (Fase após aclimatização). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Sobrevivência		Altura da muda		MS Parte Aérea		Núm. Rzs. Prim.		MS Raízes	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F
Selamento	1	1.051,68	0,07698	3,001	0,00568	13.029,41	0,01512	24,50	0,02932	727,90	0,02845
Sacarose	3	458,42	0,25121	1,587	0,00862	9.370,47	0,00902	2,78	0,62818	472,75	0,03182
Selam. x Sac.	3	241,17	0,52737	1,127	0,03098	6.642,44	0,03231	2,83	0,62028	340,47	0,08398
Resíduo	24	315,23	-	0,324	-	1.933,29	-	4,67	-	136,97	-
Total	31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	43,80 %		2,13 cm		93,48 mg/muda		7,34 rzs/muda		21,63 mg/muda	
Coef. Variação	-	40,54 %		26,79 %		47,04 %		29,42 %		54,10 %	

ANEXO C (CAPÍTULO 4)

	Página	
TABELA 1.C	Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Pré-aclimatização e poda de raízes na aclimatização de mudas micropropagadas de macieira ‘Marubakaido’ ”</u> (1ª parte)	215
TABELA 2.C	Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Pré-aclimatização e poda de raízes na aclimatização de mudas micropropagadas de macieira ‘Marubakaido’ ”</u> (2ª parte)	215
TABELA 3.C	Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Uso do ácido giberélico e do frio na quebra da dormência de gemas durante a aclimatização de mudas de macieira ‘Marubakaido’ ”</u> (1ª parte)	216
TABELA 4.C	Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Uso do ácido giberélico e do frio na quebra de dormência de gemas durante a aclimatização de mudas de macieira ‘Marubakaido’ ”</u> (2ª parte)	216
TABELA 5.C	Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Formas de pré-aclimatização de mudas de macieira ‘Marubakaido’ no final do período de enraizamento <i>in vitro</i>”</u> (Avaliação após a pré-aclimatização)	217
TABELA 6.C	Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Formas de pré-aclimatização de mudas de macieira ‘Marubakaido’ no final do período de enraizamento <i>in vitro</i>”</u> (Avaliação após a aclimatização – 1ª parte)	217

	Página	
TABELA 7.C	Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Formas de pré-aclimatização de mudas de macieira ‘Marubakaido’ no final do período de enraizamento <i>in vitro</i>”</u> (Avaliação após a aclimatização – 2ª parte)	218
TABELA 8.C	Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Efeito da permanência sob baixa temperatura na aclimatização de mudas micropropagadas de macieira ‘Marubakaido’ ”</u>	218

TABELA 1.C. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Pré-aclimatização e poda de raízes na aclimatização de mudas micropropagadas de macieira ‘Marubakaido’” (1ª parte). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Altura da muda		Sobrevivência		Comprimento de Raízes		Número de Rzs. Primárias	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F
Período Pré-Acl.	3	1,83	0,00720	1.742,97	0,00332	0,89	0,00966	54,36	0,00424
Poda Raízes	1	0,47	0,26153	333,53	0,28965	19,84	0,00001	0,11	0,91219
Período x Poda	3	0,38	0,38785	1.539,25	0,00570	0,33	0,17636	3,99	0,73941
Resíduo	24	0,36	-	284,39	-	0,19	-	9,38	-
Total	31	-	-	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	3,10 cm		79,06 %		2,81 cm		11,28 raízes/muda	
Coef. Variação	-	19,26 %		21,33 %		15,38 %		27,16 %	

TABELA 2.C. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Pré-aclimatização e poda de raízes na aclimatização de mudas micropropagadas de macieira ‘Marubakaido’” (2ª parte). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Número de raízes secundárias		Mat. Seca P. Aérea		Mat. Seca Raízes	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F
Período Pré-Acl.	3	8.622,64	0,11776	448,88	0,15427	7,25	0,85224
Poda Raízes	1	242,99	0,80219	266,27	0,29835	16,50	0,54745
Período x Poda	3	633,17	0,92241	140,19	0,62740	18,49	0,58126
Resíduo	24	3987,00	-	235,26	-	27,55	-
Total	31	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	48,62 raízes/muda		1,51 g/muda		0,40 g/muda	
Coef. Variação	-	129,87 %		32,16 %		41,41 %	

TABELA 3.C. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Uso do ácido giberélico e do frio na quebra de dormência de gemas durante a aclimatização de mudas de macieira ‘Marubakaido’” (1ª parte). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Altura da muda		Sobrevivência		Área Foliar		Mudas + de 1 internódio	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F
Frio	1	3,70	0,00022	6.057,26	0,00008	422,06	0,00169	-	-
Ácido Giberélico	3	0,68	0,01308	658,31	0,02916	48,92	0,20167	1.207,20	0,03233
Frio x Ac. Giber.	3	0,69	0,01240	517,96	0,05859	109,42	0,02945	-	-
Resíduo	16	0,14	-	0,0006	-	28,38	-	246,99	-
Total	23	-	-	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	2,96 cm		62,01 %		17,22 cm ² /muda		34,75 %	
Coef. Variação	-	12,60 %		21,04 %		15,38 %		45,22 %	

TABELA 4.C. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Uso do ácido giberélico e do frio na quebra de dormência de gemas durante a aclimatização de mudas de macieira ‘Marubakaido’” (2ª parte). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Compr.internódios		Mat. Seca Parte Aérea		Número de raízes primárias		Mat. Seca Raízes	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F
Frio	1	-	-	0,0033	0,03283	33,42	0,07345	0,00001	0,74257
Ácido Giberélico	3	0,198	0,00968	0,0017	0,07152	10,59	0,36429	0,00017	0,14523
Frio x Ac. Giber.	3	-	-	0,0016	0,08680	12,29	0,30244	0,00015	0,18532
Resíduo	16	0,025	-	170,22	-	9,31	-	0,00008	-
Total	23	-	-	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	0,45 cm		0,08 g/muda		12,60 rzs/muda		0,03 g/muda	
Coef. Variação	-	35,30 %		32,22 %		24,23 %		32,52 %	

TABELA 5.C. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Formas de pré-aclimatização de mudas de macieira ‘Marubakaido’ no final do período de enraizamento *in vitro*” (Avaliação após a pré-aclimatização). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Sobrevivência		Altura da muda		Área Foliar		Número de raízes primárias	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F
Tratam. Pré-Aclim.	3	626,31	0,00070	0,73	0,00356	16,36	0,01102	0,60	0,73397
Resíduo	16	59,94	-	0,11	-	2,59	-	1,38	-
Total	19	-	-	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	94,40 %		1,89 cm		6,14 cm ² /muda		5,82 raízes/muda	
Coef. Variação	-	8,20 %		17,20 %		26,18 %		20,21 %	

TABELA 6.C. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Formas de pré-aclimatização de mudas de macieira ‘Marubakaido’ no final do período de enraizamento *in vitro*” (Avaliação após a aclimatização – 1ª parte). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Sobrevivência		Altura da muda		Número de Raízes Primárias	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F
Trat. Pré-Acl.	3	7.408,59	0,00014	9,91	0,00001	125,87	0,00001
Resíduo	16	471,64	-	0,10	-	4,06	-
Total	19	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	94,40 %		2,11 cm		7,47 raízes/muda	
Coef. Variação	-	8,20 %		14,77 %		29,97 %	

TABELA 7.C. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Formas de pré-aclimatização de mudas de macieira ‘Marubakaido’ no final do período de enraizamento *in vitro*” (Avaliação após a aclimatização – 2ª parte). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Área Foliar		Matéria Seca da Parte Aérea		Matéria Seca das Raízes	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F
Trat. Pré-Acl.	3	160,98	0,00202	0,0033	0,00174	0,0003	0,00224
Resíduo	16	20,02	-	0,0004	-	0,00004	-
Total	19	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	1,89 cm ² /muda		0,04 g/muda		0,01 g/muda	
Coef. Variação	-	52,66 %		51,61 %		53,74 %	

218

TABELA 8.C. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Efeito da permanência sob baixa temperatura na aclimatização de mudas micropropagadas de macieira ‘Marubakaido’”. Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Sobrevivência		Altura da muda		Área Foliar		Mat. Seca P. Aérea		Mat. Seca Raízes	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F
Período Frio	4	670,00	0,00754	0,23	0,54775	18,59	0,04928	0,0078	0,00212	0,0002	0,14690
Resíduo	15	126,67	-	0,24	-	6,84	-	0,0011	-	0,0001	-
Total	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	71,00%		2,17 cm		24,98 cm ² /muda		0,13 g/muda		0,04 g/muda	
Coef. Variação	-	15,85 %		22,37 %		10,47 %		25,27 %		27,98 %	

ANEXO D (CAPÍTULO 5)

	Página	
TABELA 1.D	Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Influência do AIB no enraizamento <i>ex vitro</i> de brotações do porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido’ em bandejas de espuma fenólica”</u> (1ª parte)	221
TABELA 2.D	Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Influência do AIB no enraizamento <i>ex vitro</i> de brotações do porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido’ em bandejas de espuma fenólica”</u> (2ª parte)	221
TABELA 3.D	Resumo do Quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Efeito do substrato, AIB e lesionamento no enraizamento <i>ex vitro</i> de brotações do porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido’ ”</u> (1ª parte)	222
TABELA 4.D	Resumo do Quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Efeito do substrato, AIB e lesionamento no enraizamento <i>ex vitro</i> de brotações do porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido’ ”</u> (2ª parte)	223
TABELA 5.D	Resumo do Quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Efeito do ágar, cálcio e zinco no pré-condicionamento visando o enraizamento <i>ex vitro</i> de brotações de macieira ‘Marubakaido’ ”</u> (1ª etapa /Ágar – 1ª parte)	224
TABELA 6.D	Resumo do Quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Efeito do ágar, cálcio e zinco no pré-condicionamento visando o enraizamento <i>ex vitro</i> de brotações de macieira ‘Marubakaido’ ”</u> (1ª etapa /Ágar – 2ª parte)	224

	Página
TABELA 7.D	225
Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Efeito do ágar, cálcio e zinco no pré-condicionamento visando o enraizamento <i>ex vitro</i> de brotações de macieira ‘Marubakaido’ ” (2ª etapa/Cálcio e Zinco – 1ª parte)</u>	
TABELA 8.D	225
Resumo do Quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Efeito do ágar, cálcio e zinco no pré-condicionamento visando o enraizamento <i>ex vitro</i> de brotações de macieira ‘Marubakaido’ ” (2ª etapa/Cálcio e Zinco – 2ª parte)</u>	

TABELA 1.D. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Influência do AIB no enraizamento *ex vitro* de brotações do porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido’ em bandejas de espuma fenólica” (1ª parte). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Enraizamento		Altura da muda ¹		Sobrevivência		Altura da muda ²	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F
AIB	4	164,13	0,03313	0,011	0,91933	56,09	0,88412	0,266	0,25710
Resíduo	10	126,01	-	0,051	-	200,78	-	0,170	-
Total	14	-	-	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	63,44 %		1,32 cm		87,34 %		3,03 cm	
Coef. Variação	-	17,69 %		17,06 %		16,22 %		13,58 %	

Legenda:

¹ Altura da muda após o enraizamento *ex vitro*

² Altura da muda aos 60 dias após a repicagem

TABELA 2.D. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Influência do AIB no enraizamento *ex vitro* de brotações do porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido’ em bandejas de espuma fenólica” (2ª parte). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Número de raízes primárias		Matéria Seca Parte Aérea		Matéria Seca Raízes	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F
AIB	4	8,69	0,01725	0,0011	0,09637	0,0012	0,24777
Resíduo	10	1,71	-	0,0004	-	0,0007	-
Total	14	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	10,03 raízes/muda		0,14 g/muda		0,11 g/muda	
Coef. Variação	-	13,06 %		14,92 %		24,08 %	

TABELA 3.D. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Efeito do substrato, AIB e lesionamento no enraizamento *ex vitro* de brotações do porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido’ ” (1ª parte). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Enraizamento		Altura da muda ¹		Área foliar ¹	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F
Substrato	1	508,63	0,16537	10,010	0,00001	133,90	0,00001
AIB	3	1.279,03	0,00617	0,208	0,28104	10,09	0,03228
Lesionamento	1	137,53	0,52420	0,001	0,93427	9,32	0,08704
Subs. x AIB	3	699,60	0,05925	0,201	0,29522	20,66	0,00148
AIB x Lesion.	3	2.906,63	0,00010	0,211	0,27393	13,51	0,01050
Subs. x Les.	1	183,11	0,59102	0,059	0,55041	16,53	0,02511
Subs.x AIB x Les.	3	1815,05	0,00116	0,206	0,28492	34,11	0,00011
Resíduo	32	256,35	-	0,156	-	3,06	-
Total	47	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	41,02 %		1,07 cm		9,53 cm ² /muda	
Coef. Variação	-	39,04 %		36,82 %		18,36 %	

Legenda:

¹ Altura ou área foliar da muda após o enraizamento *ex vitro*

TABELA 4.D. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Efeito do substrato, AIB e lesionamento no enraizamento *ex vitro* de brotações do porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido’” (2ª parte). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Altura da muda ¹		Área foliar ¹		Sobrevivência	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F
Substrato	1	657,416	0,00001	133,34	0,25090	3.132,45	0,00001
AIB	3	5,288	0,18145	78,55	0,50498	238,81	0,00040
Lesionamento	1	11,544	0,05849	102,09	0,31620	0,91	0,85042
Subs. x AIB	3	15,211	0,00640	114,04	0,33912	326,56	0,00008
AIB x Lesion.	3	11,365	0,02129	22,61	0,87477	97,76	0,02416
Subs. x Les.	1	46,808	0,00073	83,58	0,63438	423,05	0,00068
Subs.x AIBxLes.	3	14,858	0,00711	38,04	0,76535	54,76	0,13240
Residuo	32	3,074	-	98,04	-	27,36	-
Total	47						
Média Geral	-	5,44 cm		31,07 cm ² /muda		98,81 %	
Coef. Variação	-	32,24 %		16,83 %		10,23 %	

Legenda:

¹ Altura ou área foliar da muda aos 60 dias após a repicagem

TABELA 5.D. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Efeito do ágar, cálcio e zinco no pré-condicionamento visando o enraizamento *ex vitro* de brotações de macieira ‘Marubakaido’ ” (1ª etapa/Ágar – 1ª parte). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Enraizamento		Altura da muda ¹		Altura da muda ²	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F
Sacarose	1	796,63	0,04950	0,151	0,0234	3,465	0,07057
Ágar	3	411,37	0,11851	0,032	0,32503	0,344	0,79347
Sacar. x Ágar	3	421,39	0,11213	0,076	0,05505	0,457	0,71571
Resíduo	24	190,74	-	0,026	-	0,991	-
Total	31	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	34,82 %		0,68 cm		2,33 cm	
Coef. Variação	-	39,67 %		23,95 %		42,69 %	

Legenda: ¹ Altura da muda após o enraizamento *ex vitro* ² Altura da muda aos 60 dias após a repicagem

TABELA 6.D. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Efeito do ágar, cálcio e zinco no pré-condicionamento visando o enraizamento *ex vitro* de brotações de macieira ‘Marubakaido’ ” (1ª etapa/Ágar – 2ª parte). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Sobrevivência		Número de raízes primárias		Área foliar	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F
Sacarose	1	18,06	0,84929	9,32	0,20214	85,22	0,05301
Ágar	3	441,49	0,50787	49,66	0,00054	52,99	0,08158
Sacar. x Ágar	3	69,49	0,94005	30,65	0,00495	50,29	0,09320
Resíduo	24	530,93	-	5,48	-	21,08	-
Total	31	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	78,36 %		7,11 raízes/muda		9,66 cm ² /muda	
Coef. Variação	-	29,41 %		32,91 %		47,54 %	

TABELA 7.D. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Efeito do ágar, cálcio e zinco no pré-condicionamento visando o enraizamento *ex vitro* de brotações de macieira ‘Marubakaido’ ” (2ª etapa/Cálcio e Zinco – 1ª parte). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Enraizamento		Altura da muda ¹		Altura da muda ²	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F
Nutriente	1	1.146,49	0,01494	0,226	0,01149	2,442	0,00395
Concentração	3	105,14	0,61193	0,017	0,65173	0,125	0,67188
Nutr. x Conc.	3	161,50	0,56759	0,068	0,11099	0,300	0,30816
Resíduo	24	169,39	-	0,031	-	0,237	-
Total	31	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	26,87 %		0,66 cm		1,20	
Coef. Variação	-	48,45 %		26,64 %		40,52 %	

Legenda: ¹ Altura da muda após o enraizamento *ex vitro* ² Altura da muda aos 60 dias após a repicagem

TABELA 8.D. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Efeito do ágar, cálcio e zinco no pré-condicionamento visando o enraizamento *ex vitro* de brotações de macieira ‘Marubakaido’ ” (2ª etapa/Cálcio e Zinco – 2ª parte). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Sobrevivência		Número de raízes primárias		Área foliar	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F
Nutriente	1	789,04	0,16502	4,46	0,06521	35,89	0,01077
Concentração	3	2.037,17	0,00666	6,57	0,00587	10,18	0,11971
Nutr. x Conc.	3	176,59	0,72168	0,75	0,61555	6,29	0,28894
Resíduo	24	390,62	-	1,22	-	4,74	-
Total	31	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	79,06 %		3,85 raízes/muda		4,63 cm ² /muda	
Coef. Variação	-	25,00 %		28,73 %		47,04 %	

ANEXO E (CAPÍTULO 6)

	Página	
TABELA 1.E	Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Crescimento de mudas de macieira ‘Marubakaido’ durante a aclimatização sob efeito de duas formas de enraizamento <i>in vitro</i>”</u> (Avaliações sequenciais)	229
TABELA 2.E	Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Crescimento de mudas de macieira ‘Marubakaido’ durante a aclimatização sob efeito de duas formas de enraizamento <i>in vitro</i>”</u> (1ª parte)	230
TABELA 3.E	Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Crescimento de mudas de macieira ‘Marubakaido’ durante a aclimatização sob efeito de duas formas de enraizamento <i>in vitro</i>”</u> (2ª parte)	230
TABELA 4.E	Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Avaliação do crescimento de mudas do porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido’ enraizadas <i>ex vitro</i>”</u> (1ª parte)	231
TABELA 5.E	Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Avaliação do crescimento de mudas do porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido’ enraizadas <i>ex vitro</i>”</u> (2ª parte)	231
TABELA 6.E	Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: <u>“Avaliação do crescimento de mudas do porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido’ enraizadas <i>ex vitro</i>”</u> (Avaliações sequenciais)	232

TABELA 1.E. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Crescimento de mudas de macieira ‘Marubakaido’ durante a aclimatização sob efeito de duas formas de enraizamento *in vitro*” (Avaliações sequenciais). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Altura da muda		Sobrevivência	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F
Repetição	2	-	-	-	-
Tratamento	1	0,021	0,69427	13,33	0,42384
Resíduo (A)	2	0,104	-	13,33	-
Parcelas	5	-	-	-	-
Tempo	4	1,883	0,00001	213,33	0,07830
Tratamento x Tempo	4	0,133	0,15034	13,33	0,95324
Resíduo (B)	16	0,068	-	83,33	-
Total	29	-	-	-	-
Média Geral	-	2,67 cm		92,67 %	
Coef. Variação (A)	-	5,40 %		1,76 %	
Coef. Variação (B)	-	9,79 %		9,85 %	

TABELA 2.E. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Crescimento de mudas de macieira ‘Marubakaido’ durante a aclimatização sob efeito de duas formas de enraizamento *in vitro*” (1ª parte). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Área foliar		Matéria Seca Parte Aérea		Número de Raízes Primárias	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F
Tratamento	1	93,63	0,00500	4.935,70	0,01013	210,73	0,00001
Tempo	4	449,38	0,00001	33.012,74	0,00001	10,19	0,00666
Tratam. x Tempo	4	28,35	0,04117	2.963,76	0,00724	12,10	0,00314
Resíduo	20	9,35	-	617,85	-	2,08	-
Total	29	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	14,59 cm ² /muda		79,36 mg/muda		7,71 raízes/muda	
Coef. Variação	-	20,96 %		31,32 %		18,71 %	

TABELA 3.E. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Crescimento de mudas de macieira ‘Marubakaido’ durante a aclimatização sob efeito de duas formas de enraizamento *in vitro*” (2ª parte). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Número de Raízes Secundárias		Comprimento da maior raiz		MS Raízes	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F
Tratamento	1	62,21	0,65401	45,53	0,00003	71,80	0,24534
Tempo	4	16.891,55	0,00001	90,20	0,00001	5.841,72	0,00001
Tratam. x Tempo	4	189,16	0,05007	0,96	0,52999	877,13	0,00002
Resíduo	20	66,25	-	1,17	-	50,40	-
Total	29	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	47,91 raízes/muda		8,15 cm		35,70 mg/muda	
Coef. Variação	-	16,99 %		13,29%		19,89 %	

TABELA 4.E. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: "Avaliação do crescimento de mudas do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' enraizadas *ex vitro*" (1ª parte). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Altura da muda ¹		Área foliar ¹		Altura da muda ²	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F
Substrato	1	4,267	0,00066	27,74	0,01728	27,41	0,55789
AIB	3	0,068	0,81908	2,72	0,57950	266,30	0,03657
Substrato x AIB	3	0,001	0,99902	5,86	0,26100	1.169,90	0,00014
Resíduo	16	0,219	-	4,00	-	74,14	-
Total	23	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	1,08 cm		9,96 cm ² /muda		34,87 cm	
Coef. Variação	-	43,39 %		20,09 %		24,70 %	

Legenda: ¹ Avaliação após o enraizamento *ex vitro*

² Avaliação aos 150 dias após a repicagem

TABELA 5.E. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: "Avaliação do crescimento de mudas do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' enraizadas *ex vitro*" (2ª parte). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Área foliar ¹		Mat. Seca Parte Aérea		Mat. Seca Raízes	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F	QM	Prob > F
Substrato	1	10.030,33	0,00209	3,99	0,24552	1,39	0,20488
AIB	3	1.115,92	0,23924	3,38	0,33286	0,99	0,33018
Substrato x AIB	3	1.075,36	0,25318	22,05	0,00208	6,39	0,00214
Resíduo	16	0,219	-	2,76	-	0,81	-
Total	23	-	-	-	-	-	-
Média Geral	-	123,74 cm ² /muda		3,89 g/muda		1,85 g/muda	
Coef. Variação	-	21,67 %		42,74 %		48,55 %	

Legenda: ¹ Avaliação aos 150 dias após a repicagem

TABELA 6.E. Resumo do quadro de análise de variância. Experimento: “Avaliação do crescimento de mudas do porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido’ enraizadas *ex vitro*” (Avaliações sequenciais). Lavras, UFLA, 1999.

Causas da Variação	GL	Sobrevivência		Altura da muda	
		QM	Prob > F	QM	Prob > F
Repetição	2	-	-	-	-
Substrato	1	149,04	0,77387	1.858,77	0,00213
AIB	3	1.684,81	0,54940	254,66	0,15871
Substrato x AIB	3	680,07	0,77236	1.637,80	0,00044
Resíduo (A)	14	1.797,07	-	126,91	-
Parcelas	23	-	-	-	-
Tempo	10	219,39	0,00011	2.556,30	0,00001
Substrato x Tempo	10	56,75	0,37703	96,60	0,00001
AIB x Tempo	30	49,01	0,56599	32,14	0,00006
Substrato x AIB x Tempo	30	49,01	0,56608	146,04	0,00001
Resíduo (B)	160	52,33	-	11,43	-
Total	263	-	-	-	-
Média Geral	-	94,63 %		13,52 cm	
Coef. Variação (A)	-	13,51 %		25,12 %	
Coef. Variação (B)	-	7,65 %		25,01 %	

ANEXO F (CONSIDERAÇÕES FINAIS)

	Página	
TABELA 1.F	Protocolo para multiplicação de brotações do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido'.	235
TABELA 2.F	Protocolo para enraizamento <i>in vitro</i> de brotações e aclimatização de mudas dos porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' e 'M-26', com relação ao substrato	236
TABELA 3.F	Protocolo para enraizamento <i>in vitro</i> de brotações e aclimatização de mudas do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido', com relação à sacarose no meio de cultura	238
TABELA 4.F	Protocolo para pré-aclimatização de mudas enraizadas <i>in vitro</i> do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido'	239
TABELA 5.F	Protocolo para enraizamento <i>ex vitro</i> de brotações do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido'	240

PROPOSTA DE UM PROTOCOLO GERAL DE MICROPROPAGAÇÃO DOS PORTA-ENXERTOS DE MACIEIRA 'MARUBAKAIDO' E 'M-26'

Com base nas técnicas e resultados obtidos nos experimentos que compuseram o presente trabalho, apresenta-se a seguir o presente protocolo de micropropagação, a partir da fase de multiplicação das brotações.

TABELA 1.F. Protocolo para multiplicação de brotações do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido'. Lavras, UFLA, 1999.

Componente ou critério	Caracterização, alternativas e resultados
Meio de cultura	MS (100% dos sais), acrescido de vitaminas (1,5 mg.L ⁻¹), glicina (2,0 mg.L ⁻¹), mio-inositol (100 mg.L ⁻¹), BAP (1,0 mg.L ⁻¹), ágar (7,0 g.L ⁻¹), sacarose ¹ (45 g.L ⁻¹) e pH 5,7
Propágulo	brotações apicais e medianas, com 2,0 cm de comprimento com 4 folhas no ápice
Período necessário	40 dias
Resultado obtido	4,71 brotações (microestacas) por brotação

Legenda:

¹ Sacarose utilizada na forma de açúcar comum comercial, não-refinado

TABELA 2.F. Protocolo para enraizamento *in vitro* de brotações e aclimatização de mudas dos porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' e 'M-26', com relação ao substrato. Lavras, UFLA, 1999.

Componente ou critério	Caracterização, alternativas e resultados	
	Marubakaido	M-26
Meio de cultura	MS (50% dos sais), acrescido de vitaminas (1,5 mg.L ⁻¹), glicina (2,0 mg.L ⁻¹), mio-inositol (100 mg.L ⁻¹), AIB (1,0 mg.L ⁻¹), sacarose ¹ (30 g.L ⁻¹) e pH 5,7	idem 'Marubakaido'
Propágulo	brotações apicais, com 1,5 a 2,0 cm de comprimento, com 2 a 3 pares de folhas no ápice	idem 'Marubakaido'
Substrato para enraizamento (indução e desenvolvimento)	Alternativas: <ul style="list-style-type: none"> • meio solidificado com ágar (7,0 g.L⁻¹) • mistura de 2,4 g/frasco de vermiculita + 5,6 g.L⁻¹ de ágar • mistura de 29,6 g/frasco de areia + 5,6 g.L⁻¹ de ágar • vermiculita (12 g/frasco) umedecida com meio de cultura líquido 	não testado
Substrato para indução do enraizamento (em meio de cultura com AIB durante 7 dias)	<ul style="list-style-type: none"> • meio solidificado com ágar (7,0 g.L⁻¹) 	idem 'Marubakaido'
Substrato para desenvolvimento das raízes (em meio de cultura sem AIB durante 49 dias)	Alternativas: <ul style="list-style-type: none"> • meio solidificado com ágar (7,0 g.L⁻¹) • Plantmax (48 g/frasco) 	idem 'Marubakaido'

Componente ou critério	Caracterização, alternativas e resultados	
	Marubakaido	M-26
Ambiente aclimatização	para casa de vegetação com sistema de nebulização intermitente (URar \approx 90%), com sombreamento usando-se dupla camada de Sombrite	idem 'Marubakaido'
Substrato aclimatização	para • Plantmax	não testado
Período necessário	• Enraizamento <i>in vitro</i> : 56 dias • Aclimatização: 35 dias • Total: 91 dias	idem 'Marubakaido'
Resultados obtidos	• Enraizamento <i>in vitro</i> : 80 a 100% de brotações enraizadas • Aclimatização: 40 a 90% de sobrevivência	• Enraizamento <i>in vitro</i> : 20 a 70% de brotações enraizadas • Aclimatização: 40% de sobrevivência

Legenda:

¹ Sacarose utilizada na forma de açúcar comum comercial, não-refinado

TABELA 3.F. Protocolo para enraizamento *in vitro* de brotações e aclimatização de mudas do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido', com relação à sacarose no meio de cultura. Lavras, UFLA, 1999.

Componente ou critério	Caracterização, alternativas e resultados
Meio de cultura	MS (50% dos sais), acrescido de vitaminas (1,5 mg.L ⁻¹), glicina (2,0 mg.L ⁻¹), mio-inositol (100 mg.L ⁻¹), AIB (1,0 mg.L ⁻¹), ágar (7,0 g.L ⁻¹) e pH 5,7
Propágulo	brotações apicais, com 1,5 a 2,0 cm de comprimento, com 2 a 3 pares de folhas no ápice
Teor de sacarose no meio de cultura de enraizamento	Alternativas: <ul style="list-style-type: none"> • 10 a 30 g.L⁻¹ de sacarose¹ (favorece a formação de raízes) • 45 a 60 g.L⁻¹ de sacarose¹ (favorece a sobrevivência e a aclimatização)
Selamento durante o enraizamento	selamento com chumaço de algodão, com redução do teor de sacarose para 20 g.L ⁻¹
Ambiente para aclimatização	casa de vegetação com sistema de nebulização intermitente (URar ≈ 90%), com sombreamento usando-se dupla camada de Sombrite
Período necessário	<ul style="list-style-type: none"> • Enraizamento <i>in vitro</i>: 42 a 49 dias • Aclimatização: 42 a 61 dias • Total: 84 a 110 dias
Resultados obtidos	<ul style="list-style-type: none"> • Enraizamento <i>in vitro</i>: 60 a 90% de brotações enraizadas • Aclimatização: 40 a 75% de sobrevivência

Legenda:

¹ Sacarose utilizada na forma de açúcar comum comercial, não-refinado

TABELA 4.F. Protocolo para pré-aclimatização de mudas enraizadas *in vitro* do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido'. Lavras, UFLA, 1999.

Componente ou critério	Caracterização, alternativas e resultados
Meio de cultura	MS (50% dos sais), acrescido de vitaminas (1,5 mg.L ⁻¹), glicina (2,0 mg.L ⁻¹), mio-inositol (100 mg.L ⁻¹), AIB (1,0 mg.L ⁻¹), ágar (7,0 g.L ⁻¹), sacarose ¹ (30 g.L ⁻¹) e pH 5,7
Propágulo	brotações apicais, com 1,5 a 2,0 cm de comprimento, com 2 a 3 pares de folhas no ápice
Técnicas de pré-aclimatização	Alternativas: <ul style="list-style-type: none"> • poda de 50% do volume do sistema radicular sem abertura antecipada dos frascos • manutenção das mudas nos frascos de cultivo a 5°C em BOD com fotoperíodo de 16 horas durante 96 a 192 horas (4 a 8 dias) • manutenção das mudas nos frascos de cultivo a 5°C em BOD com fotoperíodo de 16 horas durante 120 horas (5 dias), combinada com a aplicação de ácido giberélico na concentração de 28-33 mg.L⁻¹ por imersão da parte aérea das mudas durante 2 minutos, imediatamente antes da repicagem para o substrato de aclimatização
Ambiente para aclimatização	casa de vegetação com sistema de nebulização intermitente (URar ≈ 90%), com sombreamento usando-se dupla camada de Sombrite
Período necessário	<ul style="list-style-type: none"> • Enraizamento <i>in vitro</i>: 25 a 51 dias • Pré-aclimatização: 2 a 10 dias • Aclimatização: 28 a 56 dias • Total: 55 a 117 dias
Resultado obtido	75 a 100% de sobrevivência

Legenda:

¹ Sacarose utilizada na forma de açúcar comum comercial, não-refinado

TABELA 5.F. Protocolo para enraizamento *ex vitro* de brotações do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido'. Lavras, UFLA, 1999.

Componente ou critério	Caracterização, alternativas e resultados
Propágulo	brotações apicais, com a 2,0 a 3,0 cm de comprimento, com 2 a 3 pares de folhas no ápice
Pré-condicionamento das brotações	Manutenção das brotações em meio MS (100% dos sais e com concentração de 605 mg.L ⁻¹ de CaCl ₂ .H ₂ O), acrescido de vitaminas (1,5 mg.L ⁻¹), glicina (2,0 mg.L ⁻¹), mio-inositol (100 mg.L ⁻¹), AIB (1,0 mg.L ⁻¹), ágar (10,2 g.L ⁻¹), sacarose ¹ (30 g.L ⁻¹) e pH 5,7
Preparo das brotações	retirada da porção basal (1-2 mm) das brotações, sem lesionamento
Substrato para enraizamento	Alternativas: <ul style="list-style-type: none"> • Plantmax • Bandejas de espuma fenólica
Tratamento com ácido indolbutírico (AIB)	Alternativas: <ul style="list-style-type: none"> • imersão lenta (16 horas) com 36,17 mg.L⁻¹ de AIB, em bandejas de espuma fenólica • imersão rápida (15 segundos) com 134,67 mg.L⁻¹ de AIB (Plantmax) • imersão rápida (15 segundos) com 300 mg.L⁻¹ de AIB (espuma fenólica)
Ambiente para enraizamento <i>ex vitro</i>	casa de vegetação com sistema de nebulização intermitente (URar ≈ 90%), com sombreamento usando-se dupla camada de Sombrite
Período necessário	<ul style="list-style-type: none"> • Pré-condicionamento: 23 a 29 dias • Enraizamento <i>ex vitro</i>: 21 a 42 dias • Aclimatização: 60-70 dias • Total: 104 a 141 dias
Resultados obtidos	<ul style="list-style-type: none"> • 32 a 80% de enraizamento • 70 a 96% de sobrevivência

Legenda:

¹ Sacarose utilizada na forma de açúcar comum comercial, não-refinado