

DENISE DE MELLO CORRÊA

ENRAIZAMENTO 'IN VITRO' DE PORTA-ENXERTOS DE
MACIEIRA (*Malus domestica* Borkh.)

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração, Fitotecnia, para obtenção do grau de "MESTRE".

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS

LAVRAS - MINAS GERAIS

1990

ORGANIZADO

ALUNO

DATA

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO
DE LAVRAS

DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA

TRATAMENTO "IN VITRO" DE PORTA-EXERTOS DE
MACIEIRA (Macaca leonina - Bokh.)

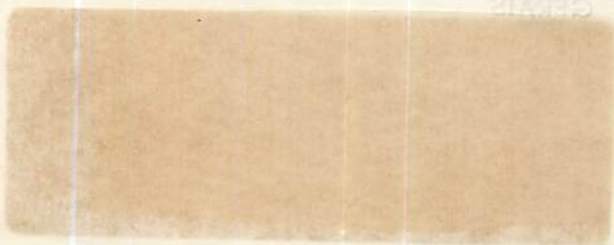
Tratamento experimental da Escola Superior de
Agricultura de Lavras, como parte das
experiências do curso de Pós-Graduação em
Agronomia, das de Concentração.
Procedimento para obtenção do grau de
"MESTRE"



ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS

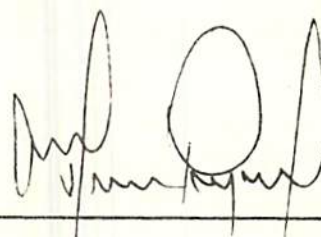
LAVRAS - MINAS GERAIS

1990

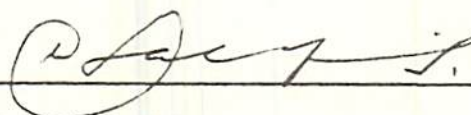


ENRAIZAMENTO 'IN VITRO' DE PORTA-ENXERTOS DE MACIEIRA
(Malus domestica Borkh.)

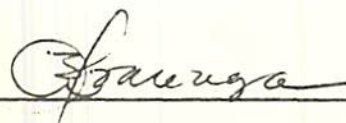
APROVADA: 11/12/90



Prof. Dr. Moacir Pasqual
Orientador



Prof. Dr. Nilton Nagib Jorge Chalfun



Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga

AGRADECIMENTOS

Às seguintes Instituições, pela oportunidade do curso e facilidades no desenvolvimento do trabalho de dissertação:

- . Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL).
- . Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).
- . Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).
- . Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

À amizade, incentivo, apoio e colaboração de:

- . Prof. Moacir Pasqual
- . Prof. Nilton Nagib Jorge Chalfun
- . Prof. Amauri Alves de Alvarenga
- . Edson Yui
- . Eduardo Fonseca Arelló
- . Renato Marques
- . Vantuil Antônio Rodrigues (Laboratorista)
- . Evaldo de Sousa Arantes (Laboratorista).

E à todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

DENISE DE MELLO CORRÊA, filha de Hélio Corrêa e Eunice de Mello Corrêa, nasceu em Sete Lagoas, Estado de Minas Gerais, no dia 20 de abril de 1964.

Concluiu o 2º grau no Colégio N. S. Aparecida, em Lavras-MG, em 1980.

Diplomou-se Engenheiro Agrônomo pela Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), Lavras-MG, em dezembro de 1985.

Em março de 1987, iniciou o curso de Pós-Graduação a nível de Mestrado em Agronomia, área de concentração Fitotecnia na Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), Lavras-MG.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Considerações gerais	3
2.2. Fatores químicos que interferem na rizogênese	4
2.2.1. Reguladores de crescimento	4
2.2.2. Sais minerais	9
2.2.3. Carboidratos	10
2.2.4. Consistência do meio	11
2.2.5. Vitaminas, substâncias orgânicas e pH	12
2.3. Fatores físicos que influenciam a rizogênese	13
2.3.1. Temperatura, luminosidade e fotoperíodo ...	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Ensaio 1. AIB x sais minerais	17
3.2. Ensaio 2. Açúcar x ágar	18
3.3. Ensaio 3. AIB x tempo de incubação	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. Ensaio 1. AIB x sais minerais	21

4.2. Ensaio 2. Açúcar x ágar	28
4.3. Ensaio 3. AIB x tempo de incubação	34
5. CONCLUSÕES	40
6. RESUMO	41
7. SUMMARY	43
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

LISTA DE QUADROS

QUADROS		PÁGINA
1	Composição do meio MURASHIGE & SKOOG(1962) - MS modificado	16
2	Resumo da análise de variância para a porcentagem de enraizamento 'in vitro' do porta-enxerto 'M-7', em diferentes concentrações de AIB (mg/l) e sais minerais (%). ESAL, Lavras-MG, 1989	22
3	Percentuais médios de enraizamento 'in vitro' do porta-enxerto 'M-7' nas diferentes concentrações de AIB (mg/l) e sais minerais (%). ESAL, Lavras-MG, 1989	22
4	Resumo da análise de variância para a porcentagem de enraizamento 'in vitro' do porta-enxerto 'MI-793' em diferentes concentrações de AIB (mg/l) e sais minerais (%). ESAL, Lavras-MG, 1989	24

QUADROS

PÁGINA

5	Percentuais médios de enraizamento 'in vitro' do porta-enxerto 'MI-793' nas diferentes concentrações de AIB (mg/l) e sais minerais (%). ESAL, Lavras-MG, 1989	25
6	Resumo da análise de variância para a porcentagem de enraizamento do porta-enxerto 'M-7', em diferentes concentrações de açúcar (g/l) e ágar (g/l). ESAL, Lavras - MG, 1989	29
7	Percentuais médios de enraizamento 'in vitro' do porta-enxerto 'M-7' nas diferentes concentrações de açúcar (g/l) e ágar(g/l). ESAL, Lavras-MG, 1989	29
8	Resumo da análise de variância para a porcentagem de enraizamento 'in vitro' do porta-enxerto 'MI-793' em diferentes concentrações de açúcar (g/l) e ágar (g/l).ESAL, Lavras-MG, 1989	31
9	Percentuais médios de enraizamento 'in vitro' de porta-enxerto 'MI-793' nas diferentes concentrações de açúcar (g/l) e ágar (g/l). ESAL, Lavras-MG, 1989	31

QUADROS

PÁGINA

10	Resumo da análise de variância para a porcentagem de enraizamento 'in vitro' do porta-enxerto 'M-7', em diferentes concentrações de AIB (mg/l) e tempo de incubação (horas). ESAL, Lavras-MG, 1989	35
11	Percentuais médios de enraizamento 'in vitro' do porta-enxerto 'M-7' nas diferentes concentrações de AIB (mg/l) e tempo de incubação (horas). ESAL, Lavras-MG, 1989 ...	35
12	Resumo da análise de variância para a porcentagem de enraizamento 'in vitro' do porta-enxerto 'MI-793' em diferentes concentrações de AIB (mg/l) e tempo de incubação (horas). ESAL, Lavras-MG, 1989	37
13	Percentuais médios de enraizamento 'in vitro' do porta-enxerto 'MI-793' nas diferentes concentrações de AIB (mg/l) e tempo de incubação (horas). ESAL, Lavras-MG, 1989 .	38

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS		PÁGINA
1	Enraizamento médio 'in vitro' do porta-enxerto 'M-7' nas diferentes concentrações de sais minerais (%) e AIB (mg/l). ESAL, Lavras-MG, 1989	23
2	Enraizamento médio 'in vitro' do porta-enxerto 'MI-793' nas diferentes concentrações de sais minerais (%) e AIB (mg/l). ESAL, Lavras-MG, 1989	26
3	Enraizamento médio 'in vitro' do porta-enxerto 'M-7' nas diferentes concentrações de açúcar (g/l). ESAL, Lavras-MG, 1989 ..	30
4	Enraizamento médio 'in vitro' do porta-enxerto 'MI-793' nas diferentes concentrações de açúcar (g/l) e ágar (g/l). ESAL, Lavras-MG, 1989	32

FIGURAS

PÁGINA

5	Enraizamento médio 'in vitro' do porta-enxerto 'M-7' nas diferentes concentrações de AIB (mg/l) e tempo de incubação (horas). ESAL, Lavras-MG, 1989	36
6	Enraizamento médio 'in vitro' do porta-enxerto 'MI-793' nas diferentes concentrações de AIB (mg/l) e tempo de incubação (horas). ESAL, Lavras-MG, 1989	39

1. INTRODUÇÃO

A técnica de cultura de tecidos tem sido amplamente utilizada para espécies frutíferas e os conhecimentos neste campo têm possibilitado a obtenção de altas taxas de regeneração e multiplicação clonal, principalmente em espécies com dificuldades de enraizamento pelos métodos convencionais. Além disso, a propagação 'in vitro', possibilita a obtenção mais rápida de novas cultivares tanto de copas como de porta-enxertos em programas de melhoramento. Esta técnica permite ainda a produção de grande número de mudas já enraizadas, fitossanitariamente saudáveis, em curto espaço de tempo e em qualquer época do ano, desde que lhe sejam fornecidas condições apropriadas.

A macieira é uma planta que se propaga vegetativamente através da enxertia e os porta-enxertos são obtidos utilizando-se a técnica da "amontoa de cepa", apresentando porém um rendimento extremamente baixo, o que tem contribuído para uma elevação do custo das mudas. Neste caso, a cultura de tecidos poderá contribuir na solução deste problema permitindo a obtenção de grande quantidade de porta-enxertos em um curto período.

Porém, verifica-se que certos cultivares copas e porta-enxertos de macieira continuam a apresentar dificuldades com respeito à indução de raízes 'in vitro', sendo para isto, necessário um melhor ajustamento dos componentes químicos e físicos do meio de cultura, de modo a promover a iniciação radicular.

O presente trabalho teve como objetivo, estudar a influência da variação de níveis de ácido indolbutírico (AIB), sais minerais, açúcar, ágar e tempo de incubação em AIB no enraizamento 'in vitro' dos porta-enxertos de macieira 'M-7' e 'MI-793'.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Considerações gerais

A técnica da cultura de tecidos ou do cultivo 'in vitro', consiste em cultivar assepticamente explantes em meios nutritivos contendo concentrações adequadas de reguladores de crescimento para indução de crescimento, proliferação e enraizamento. Variações na composição química dos meios, incluindo tipos e concentrações de reguladores de crescimento, açúcares, sais minerais e ágar, tem sido comumente estudadas por diversos autores (JONES & HATFIELD, 1976; JAMES & THURBON, 1979, 1981; NÉMETH, 1981; SRISKANDARAJAH & MULLINS, 1981).

O desenvolvimento desta técnica é de fundamental importância, pois, permite aumentar o rendimento no processo de multiplicação, evitar a disseminação de doenças, além de manter as características da planta mãe. Como os porta-enxertos de macieira são de difícil enraizamento, o método convencional (mergulhia com posterior enxertia), apresenta-se deficiente para atender a demanda de mudas (MATTOS, 1982). Além disso, a dissemina-

ção de doenças, principalmente viroses, é agravada com as sucessivas gerações de propagação vegetativa.

2.2. Fatores químicos que interferem na rizogênese

2.2.1. Reguladores de crescimento

A habilidade dos tecidos das plantas para a formação de raízes adventícias depende da interação entre diferentes fatores endógenos e exógenos. Dentre estes destacam-se as auxinas e alguns compostos fenólicos. Cofatores específicos também são produzidos em folhas jovens e gemas, sendo translocadas para regiões de enraizamento onde juntamente com as auxinas e polifenoloxidasas, aumentam o complexo que estimula à iniciação radicular (NÉMETH, 1986).

Em frutíferas temperadas, a auxina fornecida pelas gemas em expansão na primavera estimula a atividade cambial e alguma diferenciação de novos elementos do xilema pode ser observada (WAREING & PHILLIPS, 1984).

O ácido indolacético (AIA) foi identificado como o principal hormônio formador de raízes. Em alguns casos, nutrientes nitrogenados também estimulam o enraizamento, embora a auxina pareça ser o fator mais limitante (WAREING & PHILLIPS, 1984; VÁIO, 1985). Segundo HAISSIG (1986) o enraizamento é influenciado também pelo desenvolvimento vegetativo das estacas, o que de-

pende da relação carbono/nitrogênio. Neste caso, a auxina atua -
ria aumentando a redistribuição e a utilização do nitrogênio nas
estacas. Em meios de micropropagação, a concentração efetiva de
cada substância é muito variada, sendo necessário um ajuste, de
acordo com cada tecido ou órgão, com o método de micropropagação
e com o estágio da cultura, pois a formação de brotos/raízes de-
pende da proporção entre auxina e citocinina, existente no meio
de cultivo (GEORGE & SHERRINGTON, 1984a). SKOOG & MILLER (1957) a
perfeiçãoaram a teoria sobre o balanço hormonal auxínico na forma
ção de raízes, mostrando que existe relação entre auxinas e cito
cininas durante a organogênese. Auxinas e citocininas, endógenas
e exógenas, são exigidas em proporções adequadas para a formação
de brotos e raízes adventícias, os quais variam com as diversas
espécies vegetais. O aumento na concentração de auxina, implica
no favorecimento de iniciação radicular enquanto que o aumento
na concentração de citocinina induz a multiplicação de brotos
(MURASHIGE, 1974).

Em se tratando da propagação 'in vitro' de macieira
a substância mais empregada do grupo das auxinas, para induzir o
enraizamento, é o ácido indolbutírico (AIB). Concentrações va-
riando de 1,0 a 3,0 mg/l, são as mais usadas conforme relatam vá-
rios autores (JONES et alii, 1977, 1979; SNIR & EREZ, 1980; WER-
NER & BOE, 1980; SRISKANDARAJAH & MULLINS, 1981 e MATTOS, 1982).
Porém, se o explante ficar por tempo prolongado na presença de
AIB, o número de raízes pode ser reduzido consideravelmente e o
processo de alongamento das brotações pode ser prejudicado (JA-
MES & THURBON, 1979).

WALKEY (1972) e LANE (1978) relatam que o ácido nafenalenoacético (ANA), também induz o enraizamento da macieira, porém em menor proporção que o AIB. Por outro lado, o ácido indolacético (AIA) é pouco empregado devido a sua grande instabilidade e fácil degradação (DUTCHER & POWELL, 1972), enquanto o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é raramente usado, pois tem efeito inibitório sobre as brotações e é fitotóxico de acordo com SRISKANDARAJAH & MULLINS (1981).

Utilizando-se o porta-enxerto 'M-7', WERNER & BOE (1980) verificaram que a melhor concentração de ácido indolbutírico (AIB) foi 2,0 mg/l, sendo que aos 18 dias após a aplicação desta auxina 88% das brotações enraizaram, sendo que aos 28 dias o enraizamento foi total. SNIR & EREZ (1980) obtiveram altas taxas de enraizamento (100%) dos porta-enxertos 'MM-104', 'MM-106' e 'MM-109', utilizando 1,0 mg/l de AIB no meio de cultivo para indução de raízes. Também JONES et alii (1985), empregando a concentração de 1,0 mg/l no enraizamento das cultivares Redspur e Goldspur, obtiveram uma taxa de 69 a 80% de enraizamento após 4 semanas. Porém, acima de 80% de enraizamento somente foi obtido quando no meio de cultivo havia 15 g de sacarose e 0,3 mg/l de AIB.

SRISKANDARAJAH & MULLINS (1981) induziram o enraizamento na cultivar Granny Smith a partir de um meio contendo 2,0 mg/l de AIB, obtendo uma taxa de 78 a 82% de enraizamento, TRAVERS et alii (1985) utilizaram meio MS modificado mais 0,05 mg/l de AIB no enraizamento do porta-enxerto Antonovka 313 obtendo, a

pós 2 semanas de incubação, 100% de enraizamento, sendo que as raízes se tornaram visíveis depois de 6 a 8 dias de incubação. BARBOSA et alii (1986) verificaram que a dosagem mais eficaz de AIB, para o enraizamento das cultivares Rainha e Gala e das seleções 'IAC 1381-22', '3881-8' e '4881-11', foi na faixa de 0,4 mg/l, induzindo um maior número de raízes/propágulo.

De acordo com ZIMMERMAN & BROOME (1981), concentrações variando de 0,1 mg/l a 0,3 mg/l promoveram um ótimo enraizamento na maioria das cultivares testadas por eles. Contudo, para aquelas de difícil enraizamento ('Delicious'), a concentração de 1,0 mg/l de AIB proporcionou o melhor resultado.

A eficiência do AIB isoladamente ou em combinação com floroglucinol (PG) e carvão ativado, foi testada por CHEEMA & SHARMA (1983). Obteve-se 100% de enraizamento quando utilizou-se a combinação 2,0 mg/l de AIB mais 2% de carvão ativado. O PG quando adicionado ao meio mostrou efeito deletério na posterior aclimação das plantas enraizadas. JONES et alii (1977), obtiveram 97% de enraizamento utilizando a combinação AIB mais PG (1,0 mg/l e 162 mg/l respectivamente) no período de 6 semanas com o porta-enxerto 'M-26'. Por outro lado, JAMES & THURBON (1979), utilizando o porta-enxerto 'M-9', verificaram uma elevada taxa de enraizamento com 2,0 mg/l de AIB mais 162 mg/l de PG.

JAMES & THURBON (1981) estudando duas séries do porta-enxerto 'M-9', verificaram que a combinação 3,0 mg/l de AIB mais 162 mg/l de PG, foi a mais favorável para o desenvolvimento de raízes. ZIMMERMAN (1984b) utilizou 1,0 mg/l de PG mais 0,28mg/l de AIB suplementado com 0,5 mg/l de GA₃ (ácido Giberélico) ob-

tendo 100% de enraizamento nas cultivares do grupo Delicious. Para o clone 'M-4' de macieira, o tratamento que apresentou melhores resultados no enraizamento continha 0,1 mg/l de BAP (6-Benzilaminopurina) mais 2,0 mg/l de AIB (OCHATT & CASO, 1983).

Segundo SRISKANDARAJAH et alii (1981), quanto maior o número de subculturas de algumas cultivares maior a facilidade de se produzir raízes adventícias, quando tratadas com ácido nafenacético (ANA) a 3,4 mg/l ou ácido indolacético (AIA) a 17,5 mg/l. Estes autores notaram que, após 9 subculturas, a cultivar Jonathan apresentou 95% de enraizamento, porém com a cultivar Delicious, obteve-se baixa taxa de enraizamento, tanto na presença de ANA quanto de AIB a 150 mg/l, após sucessivas subculturas.

WALKEY (1972) utilizando uma combinação de 10,0 mg/l de AIA mais leite de côco, obteve uma baixa taxa de enraizamento. Baixa porcentagem de enraizamento, também foi obtida por ABBOTT & WHITELEY (1976) quando brotações da cultivar Cox's Orange Pippin foram transferidas para um meio contendo AIB, ANA ou AIA com concentrações variando de 0,1 a 10,0 mg/l. LANE (1978) por sua vez, verificou que a eficiência do enraizamento é reduzida quando se substitui o AIB pelo ANA.

Geralmente para se controlar o problema do excesso de produção de calos na base do caule e melhorar o alongamento das raízes após a iniciação radicular, alguns pesquisadores transferem as estacas de um meio com auxina (AIB ou ANA) para um meio sem reguladores de crescimento, após um intervalo que varia de 4 dias a 4 semanas (LANE, 1978; JAMES & THURBON, 1979; SNIR &

EREZ, 1980 e JAMES & THURBON, 1981). Todavia OCHATT & CASO(1983) observaram que a formação de calos foi reduzida quando se utilizou meio líquido com AIB. Porém, na maioria das cultivares de maieira, o AIB é o regulador de crescimento que tem apresentado melhores resultados, seguido do ANA e do AIA, respectivamente (ZIMMERMAN & FORDHAM, 1985).

2.2.2. Sais minerais

Experimentos realizados 'in vitro', têm demonstrado que as concentrações e o tipo de sais minerais utilizados nos diferentes meios de cultivo, promovem significativos efeitos na rizogênese sendo também amplamente utilizados para o cultivo de tecidos vegetais (JONES et alii, 1977; LANE, 1978; JONES et alii, 1979; SNIR & EREZ, 1980 e SRISKANDARAJAH & MULLINS, 1981). Entretanto, ZIMMERMAN & FORDHAM (1985) não observaram efeito significativo da adição de sais minerais no meio de cultivo, para o enraizamento das cultivares do grupo Delicious e McIntosh.

Os sais minerais necessários ao enraizamento estão contidos no meio de MURASHIGE & SKOOG (1962) - MS e podem ser reduzidos a $3/4$ (DUNSTAN & TURNER, 1984), a $1/2$ (SNIR & EREZ, 1980; SRISKANDARAJAH & MULLINS, 1981; ZIMMERMAN & BROOME, 1981; CHEEMA & SHARMA, 1983 e ZIMMERMAN & BROOME, 1985), a $1/3$ (WERNER & BOE, 1980), a até mesmo a $1/4$ (GEORGE & SHERRINGTON, 1984), em relação a concentração utilizada para a multiplicação e desenvolvi -

mento das brotações. Alguns autores como LANE (1978), JAMES et alii (1979, 1981) e BARBOSA et alii (1986), utilizaram concentrações integrais dos sais MS, obtendo bons resultados no enraizamento da macieira.

2.2.3. Carboidratos

Como fonte de energia para a propagação 'in vitro' da macieira, a sacarose é o carboidrato mais utilizado, em concentrações que variam de 2 a 3% (JONES et alii, 1977 e SNIR & EREZ, 1980). A sacarose, segundo TRAVERS et alii (1985), é considerada o componente que mais influencia a rizogênese no meio de cultivo. Para SNIR & EREZ (1980) a ausência de açúcar no meio de cultura inibe completamente o enraizamento da macieira e provoca a morte dos explantes dentro de uma semana de acordo com SRISKANDARAJAH & MULLINS, 1981.

Concentrações inferiores a 2% fazem com que a iniciação de raízes seja diminuída, na proporção em que se reduz a quantidade de sacarose (LANE, 1978 e SNIR & EREZ, 1980). Entretanto, concentrações superiores ou 5,2% também podem reduzir o enraizamento da macieira (LANE, 1978).

Concentrações entre 10 a 15 g/l tem sido as mais benéficas para o enraizamento de algumas cultivares de macieira (WERNER & BOE, 1980; SRISKANDARAJAH & MULLINS, 1981; ZIMMERMAN & BROOME, 1981; CHEEMA & SHARMA, 1983 e BARBOSA et alii, 1986).

Entretanto, Zimmerman & Broome (1980), citados por MATTOS (1982), não observaram diferenças no enraizamento das brotações de diversas cultivares de macieira, quando utilizaram sacarose em concentrações variando de 1,5 a 6,0%. JONES et alii (1977), utilizaram a concentração integral de sacarose do meio MS (30 g/l) e obtiveram altas taxas de enraizamento para o porta-enxerto 'M-26', sendo que OCHATT & CASO (1983), também utilizando esta concentração, verificaram o mesmo comportamento para o clone 'M-4'. Entretanto SNIR & EREZ (1980), ao enraizarem os porta-enxertos 'MM-104', 'MM-106' e 'MM-109', obtiveram bons resultados utilizando 20 g/l de sacarose no meio de cultivo.

2.2.4. Consistência do meio

O grau de consistência do meio, varia em função da quantidade de ágar adicionado. No enraizamento 'in vitro', da macieira por exemplo, pode-se utilizar tanto meio líquido, semi-sólido como sólido. Para o meio sólido são normalmente adicionados 7,0 g/l de ágar (JONES et alii, 1977; LANE, 1978; SNIR & EREZ, 1980; ZIMMERMAN, 1984a e TRAVERS et alii, 1985), sendo que baixas concentrações também podem ser efetivas (WERNER & BOE, 1980 e ZIMMERMAN & BROOME, 1981). Porém, a concentração de ágar necessária para dar consistência adequada ao meio de cultivo, irá depender basicamente da quantidade do produto utilizado, do pH do meio e do tipo de tecido vegetal a ser cultivado segundo MURASHI

GE (1974).

WERNER & BOE (1980), conseguiram em 18 dias 88% de enraizamento do porta-enxerto 'M-7', com baixa concentração de ágar (2,7 g/l), sendo que dentro de 28 dias o enraizamento foi total. SRISKANDARAJAH & MULLINS (1981), ao utilizarem meio líquido em agitação constante, verificaram 95% de enraizamento com a cultivar Jonathan. Já OCHATT & CASO (1983) trabalharam com meio só-lido e líquido para o porta-enxerto 'M-4', e verificaram melhores resultados em meio líquido. ZIMMERMAN (1984) por sua vez, obteve bons resultados de enraizamento 'in vitro' com a cultivar cultivar 'Delicious' em meio geleificado com ágar.

2.2.5. Vitaminas, substâncias orgânicas e pH

O sucesso no enraizamento da maioria das frutíferas mostra que as vitaminas contidas no meio MS também devem ser a-propriadadas. A tiamina-HCl, isoladamente ou em combinação com ou-tras vitaminas, é muito empregada para induzir a iniciação radi-cular da macieira (JONES et alii, 1977, 1979; SNIR & EREZ, 1980; CHEEMA & SHARMA, 1983 e LÊ, 1985).

Entre os aminoácidos, o mais utilizado na propagação da macieira tem sido a glicina (WALKEY, 1972; JONES et alii, 1977, 1979 e SNIR & EREZ, 1980), por apresentar melhores resulta-dos.

Outros compostos no entanto têm sido empregados na

micropropagação de fruteiras, como é o caso do mio-inositol, que mesmo não sendo essencial apresenta efeitos benéficos no enraizamento (MURASHIGE, 1974).

Em relação ao pH, a faixa mais utilizada no enraizamento da macieira, varia de 5,0 a 6,0 (MURASHIGE & SKOOG, 1962 ; JONES et alii, 1977; LANE, 1978; SNIR & EREZ, 1980; WERNER & BOE 1980; SRISKANDARAJAH et alii, 1981; CHEEMA & SHARMA, 1983; OCHATT & CASO, 1983 e TRAVERS et alii, 1985).

2.3. Fatores físicos que influenciam a rizogênese

2.3.1. Temperatura, luminosidade e fotoperíodo

A temperatura é um dos fatores físicos que mais influencia o enraizamento 'in vitro'. Normalmente, o intervalo de variação mais utilizado nas fases de cultivo está compreendido entre 20 e 28°C (NÉMETH, 1981; SRISKANDARAJAH & MULLINS, 1981, 1984).

Na propagação 'in vitro', a presença de luz é indispensável para regular certos processos morfogênicos. A luz pode ser avaliada em termos de intensidade, qualidade e duração (MURASHIGE, 1974). A intensidade de luz utilizada para o enraizamento da macieira é geralmente de 2.000 a 4.000 lux, embora alguns trabalhos indiquem a utilização de intensidades mais baixas (LANE, 1978).

O fotoperíodo normalmente utilizado na propagação de plantas oscila entre 14 e 18 horas (LANE, 1978 e NÉMETH, 1981). O mais utilizado para macieira é de 16 horas de luz e 8 horas de escuro (WERNER & BOE, 1980; SRISKANDARAJAH & MULLINS, 1981; ZIMMERMAN & BROOME, 1981; CHEEMA & SHARMA, 1983; OCHATT & CASO, 1983; ZIMMERMAN, 1984b e ZIMMERMAN & FORDHAM, 1985).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Células, Tecidos e Órgãos Vegetais, do Departamento de Agricultura da Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), situada no município de Lavras-MG. Os porta-enxertos utilizados foram o 'M-7' e o 'MI-793', caracterizados como semi-ananizante e vigoroso, respectivamente. O 'M-7' é um dos porta-enxertos mais usados no Brasil por conferir precocidade na produção de frutos, boa sustentação de copa, frutos de boa qualidade, além de apresentar um sistema radicular prolífero. Já o 'MI-793' é menos produtivo quando comparado ao 'M-7', porém é o único que apresenta resistência ao pulgão lanígero e à podridão do colo.

O meio básico de cultivo utilizado nos ensaios foi o de MURASHIGE & SKOOG (1962) - MS (Quadro 1), cujas soluções estoque foram preparadas anteriormente e armazenadas em geladeira a 4°C, exceto o açúcar, o ágar e o AIB que foram pesados e adicionados no momento da preparação do meio. O pH do meio de cultivo foi ajustado para 6,0.

O meio de cultura foi colocado em tubos de ensaio

QUADRO 1 - Composição do meio MURASHIGE & SKOOG (1962) - MS modificado.

Solução estoque	Compostos	Concentração na solução estoque (mg/l)	Volume da solução estoque adicionada ao meio (ml/l)	Concentração final (mg/l)
A	NH_4NO_3	82.500	20	1.650,000
B	KNO_3	95.000	20	1.900,000
C	H_3BO_3	1.240	5	6,200
	KH_2PO_4	34.000		170,000
	KI	166		0,830
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	50		0,250
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5		0,025
D	CaCl_2	8.306	30,2	250,841
E	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	74.000	5	370,000
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4.460		22,300
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.720		8,600
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5		0,025
F	Na_2EDTA	74.500	5	37,250
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.570		27,850
	Mioinositol	2.000	50	100,000
Vitaminas	Tiamina - HCl	50		0,500
	Piridoxina - HCl	50	10	0,500
	Ácido nicotínico	50		0,500
	Glicina	80	25	2,000
	Sacarose		30 g	30.000,000
	Ágar			7.000,000

(10 ml/tubo), os quais foram vedados com tampa plástica e autoclavados a 121°C , sob uma pressão de 1,5 atm durante 20 minutos. Posteriormente foram levados para sala asséptica onde procedeu-se ao resfriamento e a inoculação dos explantes.

As brotações foram individualizadas e seccionadas em tamanho de 1 a 2 cm de comprimento (explantes) com o auxílio de um bisturi e de uma pinça metálica, mantendo-se os folíolos já formados. Este procedimento foi realizado em câmara asséptica de fluxo laminar horizontal. Posteriormente foram cuidadosamente transferidas para os tubos de ensaio, em número de 1 explante/tubo, os quais foram vedados com tampa plástica recoberta por fita adesiva (parafilm).

A incubação foi feita em sala de crescimento, onde os tubos foram acondicionados em suportes e mantidos a uma temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 horas de luz, com exceção para os tratamentos apresentados no ensaio 3 (AIB x tempo de incubação). O cultivo foi realizado sob uma irradiância de $60 \mu\text{mol quantum/m}^2\text{s}^2$ fornecida por uma combinação de lâmpadas/fluorescentes "branca-fria" Phillips e Sylvania Grow-lux.

3.1. Ensaio I. AIB x sais minerais

Neste ensaio estudou-se o efeito dos fatores: concentração de sais minerais e de AIB. Utilizou-se o meio de cultivo MS acrescido de regulador de crescimento AIB, nas concentrações

de 0,1, 2 e 3 mg/l e de sais minerais nas concentrações de 0, 25, 50, 75 e 100%, em todas as combinações possíveis. O ensaio constou de 20 tratamentos com 10 repetições para o porta-enxerto 'M-7' e 9 repetições para o porta-enxerto 'MI-793'. A solidificação do meio foi obtida utilizando-se 6,0 g/l de ágar.

O ensaio foi instalado e analisado segundo o delineamento inteiramente casualizado, adotando-se o esquema fatorial 5 x 4. Foi feita análise de variância para porcentagem de enraizamento com os dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$. Aplicou-se teste de médias (Tukey).

A avaliação foi realizada 30 dias após a inoculação, sendo considerada a porcentagem de explantes enraizadas (explantes que apresentassem pelo menos uma raiz).

3.2. Ensaio 2. Açúcar x ágar

Neste ensaio, avaliou-se o comportamento dos porta-enxertos em relação a todas as combinações possíveis entre diferentes concentrações de açúcar e ágar que variaram de 0, 15, 30 e 45 g/l e 0, 3, 6, 9 e 12 g/l, respectivamente. O experimento constou de 20 tratamentos com 10 repetições para o porta-enxerto 'M-7' e 9 repetições para o 'MI-793'. Utilizou-se o meio de cultivo MS, sendo que, para o porta-enxerto 'MI-793' a concentração de sais minerais foi integral e para o 'M-7' foi reduzida a 3/4. O meio foi suplementado com 1,0 mg/l de AIB. Quando utilizou-se

o meio líquido (ausência de ágar), foram colocadas pontes de papel de filtro com o objetivo de sustentar os explantes.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, adotando-se o esquema fatorial 5 x 4. A análise de variância foi feita para porcentagem de enraizamento, sendo os dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$. Foi aplicado teste de médias (Tukey).

A avaliação foi realizada 30 dias após a inoculação, sendo verificada a porcentagem de enraizamento. Foram consideradas enraizadas explantes que apresentassem pelo menos uma raiz.

3.3. Ensaio 3. AIB x tempo de incubação

Neste ensaio, utilizou-se o meio MS sólido com 75% dos sais para o porta-enxerto 'M-7' e 100% para o 'MI-793'. As concentrações de AIB variaram de 0, 10, 20 e 40 mg/l e o período de incubação foi de 12, 24, 48 e 96 horas, em todas as combinações possíveis. O experimento constou de 16 tratamentos com 12 repetições e foi dividido em duas etapas: primeiramente, os explantes foram inoculados no meio de cultivo contendo o regulador auxínico AIB nas diferentes concentrações, permanecendo incubadas nos intervalos estabelecidos anteriormente. Transcorridos estes intervalos, os explantes foram transferidos para um novo meio de cultivo sem regulador de crescimento, onde permaneceram até completarem 96 horas de escuro. Após este período, foram le-

vados para sala de crescimento com uma irradiância de $60 \mu\text{mol quantum/m}^2\text{s}^2$.

O ensaio foi instalado segundo o delineamento inteiramente casualizado, sendo adotado o esquema fatorial 4×4 . A análise de variância foi feita para porcentagem de enraizamento, com os dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$. Aplicou-se teste de médias (Tukey).

A avaliação foi realizada 30 dias após a inoculação, sendo determinada a porcentagem de enraizamento. Foram considerados explantes que apresentassem pelo menos uma raiz.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ensaio 1. AIB x sais minerais

O resumo da análise da variância referente a porcentagem de enraizamento do porta-enxerto 'M-7' é apresentado no Quadro 2. Observa-se que houve significância tanto para AIB e sais minerais como para a interação AIB x sais minerais.

A dosagem de AIB que promoveu a melhor porcentagem de enraizamento (100%) dos explantes foi de 1,0 mg/l em uma concentração de sais minerais de 75% (Quadro 3 e Figura 1).

Nota-se que o AIB na presença de sais minerais, nos níveis estudados, tornou-se mais eficiente no enraizamento do porta-enxerto 'M-7'. No nível zero de sais minerais não houve enraizamento algum observando-se uma tendência no aumento da porcentagem de enraizamento à medida em que se elevou a concentração dos sais minerais, até o nível de 75%, ocorrendo a partir daí, uma redução. Da mesma forma, o enraizamento foi praticamente nulo na ausência de AIB, atingindo valores mais elevados com 1 mg/l para todas as concentrações de sais, registrando-se redu-

QUADRO 2 - Resumo da análise de variância para a porcentagem de enraizamento 'in vitro' do porta-enxerto 'M-7' em diferentes concentrações de AIB (mg/l) e sais minerais (%). ESAL, Lavras-MG, 1989.

Causas de variação	GL	QM
AIB	3	2.0400**
Sais	4	2.3675**
AIB x Sais	12	0.2775**
Resíduo	180	0,1889
CV (%)		44,2050

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

QUADRO 3 - Percentuais médios de enraizamento 'in vitro' do porta-enxerto 'M-7' nas diferentes concentrações de AIB (mg/l) e sais minerais (%). ESAL, Lavras-MG, 1989.

Sais minerais (%)	0	25	50	75	100	Média
AIB (mg/l)						
0,0	0	0	10	10 CD	10	6
1,0	0 d	20 cd	80 ab	100 aA	60 abc	52
2,0	0	10	40	80 AB	50	36
3,0	0	0	20	50 ABCD	20	18
Médias	0	7,5	37,5	60	35	

As médias seguidas da mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey 5%.

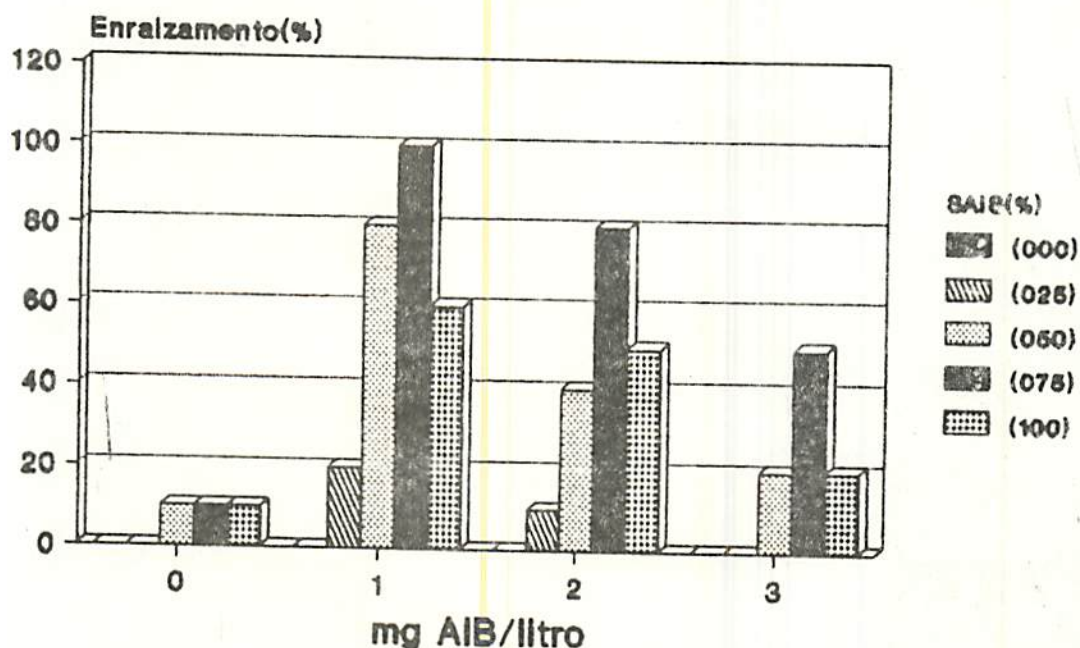


FIGURA 1 - Enraizamento médio 'in vitro' do porta-enxerto 'M-7' nas diferentes concentrações de sais minerais (%) e AIB (mg/l). ESAL, Lavras-MG, 1989.

ção acentuada à medida em que se elevou os níveis de AIB no meio de cultura.

Para o porta-enxerto 'MI-793' ocorreu significância estatística ao nível de 1% somente para os sais minerais e ao nível de 5% para a interação AIB x sais, como pode ser observado no Quadro 4.

Para este porta-enxerto as melhores dosagens foram

QUADRO 4 - Resumo da análise de variância para a porcentagem de enraizamento 'in vitro' do porta-enxerto 'MI-793' em diferentes concentrações de AIB (mg/l) e sais minerais (%). ESAL, Lavras-MG, 1989.

Causas de variação	GL	QM
AIB	3	0.1981 NS
Sais	4	1.2972**
AIB x Sais	12	0.3231*
Resíduo	160	0.1306
CV (%)		50,4170

** , * Significativo ao nível de 1 e 5% de probabilidade.
NS - não significativo.

de 1 mg/l de AIB e 100% de sais minerais com taxa de 89% de explantes enraizados (Quadro 5 e Figura 2).

Pelos dados obtidos observa-se que de um modo geral a presença de AIB isoladamente não influenciou no enraizamento, contudo o maior efeito deste regulador foi observado na presença de sais. Isto indica que os sais minerais são importantes na indução do enraizamento do porta-enxerto 'MI-793' e que se fazem necessários em altas concentrações, uma vez que em níveis inferiores a 50% não houve efeito do AIB sobre a porcentagem de enraizamento.

Os resultados obtidos com a aplicação de AIB estão de acordo com diversos autores que verificaram que as concentra-

QUADRO 5 - Percentuais médios de enraizamento 'in vitro' do porta-enxerto 'MI-793' nas diferentes concentrações de AIB (mg/l) e sais minerais (%). ESAL, Lavras-MG, 1989.

Sais minerais (%)	0	25	50	75	100	Média
AIB (mg/l)						
0	11	33	11	0	22 B	15
1	0	0	22	44	89 A	31
2	0	0	11	33	56 AB	20
3	0	0	22	44	33 AB	20
Média	2,8	8,3	16,7	30,6	50	

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

ções mais usadas no enraizamento 'in vitro' da macieira, estão entre 1 e 3 mg/l (JONES et alii, 1977, 1979; SNIR & EREZ, 1980; SRISKANDARAJAH & MULLINS, 1981 e MATTOS, 1982).

Entretanto, apesar de ser necessária a aplicação de AIB para a indução de raízes em macieira, pode-se observar para o porta-enxerto 'MI-793', um enraizamento razoável (15%) na ausência desse regulador de crescimento (Figura 2). Isto poderia ser devido ao nível endógeno existente no explante, que teria sido suficiente para manter a relação auxina/citocinina favorável à indução de raízes (MURASHIGE, 1974; GEORGE & SHERRINGTON, 1984).

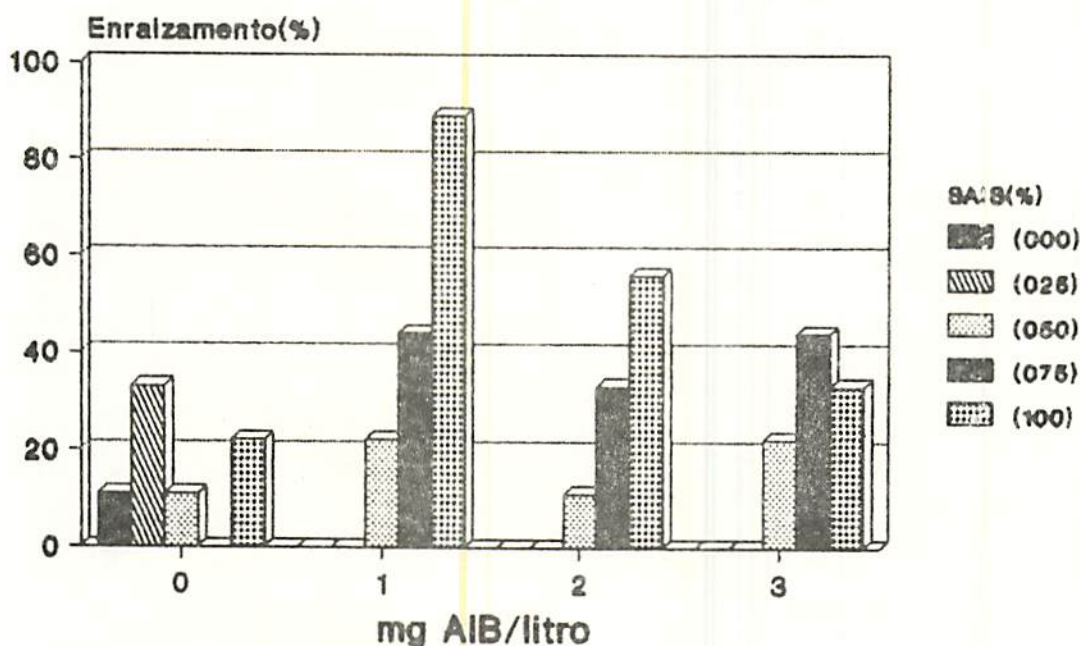


FIGURA 2 - Enraizamento médio 'in vitro' do porta-enxerto 'MI-793' nas diferentes concentrações de sais minerais (%) e AIB (mg/l). ESAL, Lavras-MG, 1989.

Para o porta-enxerto 'M-7', observou-se que a indução do enraizamento está relacionada com a adição de AIB ao meio de cultivo, provavelmente devido a seu baixo nível endógeno auxínico, que não seria suficiente para ativar o processo da rizogênese.

Com relação as concentrações de sais minerais foram observadas respostas diferenciadas entre os dois porta-enxertos

avaliados (Figuras 1 e 2). Isto poderia ser explicado em parte, pelas diferenças genotípicas entre os porta-enxertos.

No caso do 'M-7', o melhor resultado obtido com 75% dos sais poderia estar relacionado à elevada concentração de nitrogênio contido no meio 'MS' em sua concentração total de sais, o que poderia afetar obviamente a rizogênese (HAISSIG, 1986). Outra explicação possível seria a menor exigência do porta-enxerto 'M-7' por sais minerais, devido a sua característica semi-ananizante. O porta-enxerto 'MI-793', entretanto, por apresentar hábito de crescimento vigoroso, exigiria um maior suprimento de macro e micronutrientes, daí se obter um melhor enraizamento utilizando-se a concentração integral dos sais 'MS'.

Os resultados verificados para o porta-enxerto 'M-7' estão de acordo com os obtidos por DUNSTAN & TUBNER (1984) utilizando o mesmo tipo de porta-enxerto. A concentração de sais (100%) que promoveu a maior porcentagem de enraizamento do porta-enxerto 'MI-793', foi igual a observada por LANE (1978), JAMES et alii (1979, 1981) e por BARBOSA et alii (1986). Contudo outros pesquisadores (SNIR & EREZ, 1980; CHEEMA & SHARMA, 1983; DUNSTAN & TURNER, 1984 e GEORGE & SHERRINGTON, 1984) têm verificado percentuais variáveis de enraizamento de explantes de macieira com a aplicação de concentrações de sais variando de 25 a 75%.

Para os dois porta-enxertos testados no presente ensaio, verificou-se que a ausência de sais minerais resultou em taxas de enraizamentos nulas. Isto evidentemente diverge das observações de ZIMMERMAN & FORDHAM (1985) que não verificaram efei

to significativo da adição de sais minerais ao meio de enraizamento para as cultivares do grupo Delicious e McIntosh. Neste caso, poderia estar ocorrendo um esgotamento das reservas nutricionais, levando o explante a morte, indicando que para estes porta-enxertos a presença de sais minerais no meio de cultivo é essencial para o enraizamento.

4.2. Ensaio 2. Açúcar x ágar

O resumo da análise de variância para a porcentagem de enraizamento 'in vitro' do porta-enxerto 'M-7' nas diferentes dosagens de açúcar e ágar, encontram-se no Quadro 6. Verifica-se que houve um efeito significativo somente para a adição de açúcar.

Os melhores resultados obtidos para o 'M-7' foram com a adição de 15 g/l não diferindo estatisticamente de 45 g/l de açúcar, ocorrendo em média 68 e 70% de explantes enraizados respectivamente, independente da concentração de ágar utilizada (Quadro 7 e Figura 3).

O resumo da análise de variância para o porta-enxerto 'MI-793' em diferentes concentrações de açúcar e ágar, apresentou efeito significativo tanto para os fatores estudados como para a sua interação (Quadro 8).

Para o porta-enxerto 'MI-793', os percentuais mais e

QUADRO 6 - Resumo da análise de variância para a porcentagem de enraizamento do porta-enxerto 'M-7', em diferentes concentrações de açúcar (g/l) e ágar (g/l). ESAL, Lavras-MG, 1989.

Causas de variação	GL	QM
Ágar	4	0,3675 NS
Açúcar	3	5,3383**
Ágar x Açúcar	12	0,2508 NS
Resíduo	180	0,1606
CV (%)		42,4010

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

NS Não significativo.

QUADRO 7 - Percentuais médios de enraizamento 'in vitro' do porta-enxerto 'M-7' nas diferentes concentrações de açúcar (g/l) e ágar (g/l). ESAL, Lavras-MG, 1989.

Açúcar (g/l)	0	15	30	45	Média
Ágar (g/l)					
0	0	90	40	80	52.5
3	0	90	40	50	47.5
6	0	50	10	70	32.5
9	0	40	40	70	37.5
12	0	70	70	80	55.0
Média	0 c	68 a	40 b	70 a	

As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey 5%.

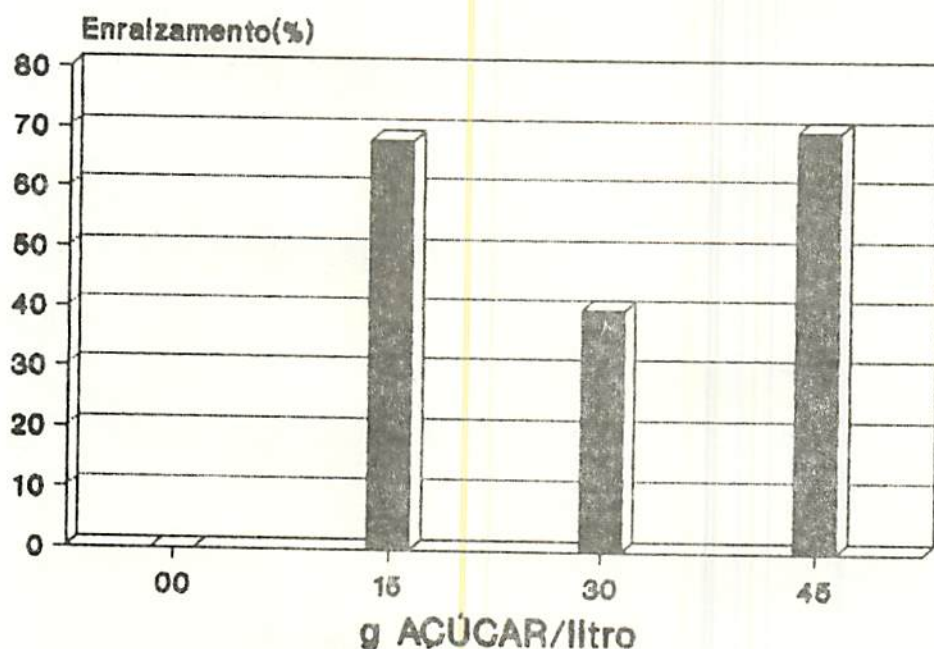


FIGURA 3 - Enraizamento médio 'in vitro' do porta-enxerto 'M-7' nas diferentes concentrações de açúcar (g/l). ESAL, Lavras-MG, 1989.

levados de enraizamento (67%) foram obtidos quando se utilizou 45 g/l de açúcar na ausência e presença de ágar a 12 g/l (Quadro 9 e Figura 4).

Vários autores têm utilizado 15 g/l de sacarose obtendo bons resultados no enraizamento da macieira (SRISKANDARA - JAH & MULLINS, 1981; ZIMMERMAN & BROOME, 1981 e CHEEMA & SHARMA, 1983), contudo neste trabalho, o porta-enxerto 'MI-793' apresentou melhor taxa de enraizamento, quando da aplicação de 45 g/l de açúcar.

QUADRO 8 - Resumo da análise de variância para a porcentagem de enraizamento 'in vitro' do porta-enxerto 'MI-793' em diferentes concentrações de açúcar (g/l) e ágar(g/l). ESAL, Lavras-MG, 1989.

Causas de variação	GL	QM
Ágar	4	0,9500**
Açúcar	3	0,7481**
Ágar x Açúcar	12	0,2574*
Resíduo	160	0,1153
CV (%)		49,2860

** , * Significativo ao nível de 1 e 5% de probabilidade.

QUADRO 9 - Percentuais médios de enraizamento 'in vitro' de porta-enxerto 'MI-793' nas diferentes concentrações de açúcar (g/l) e ágar (g/l). ESAL, Lavras-MG, 1989.

Açúcar (g/l)	0	15	30	45	Média
Ágar (g/l)					
0	0 b	44 ab	33 ab	67 Aa	36,10
3	22	0	0	0 B	5,10
6	0	0	0	11 AB	2,75
9	0	0	22	33 AB	13,75
12	0	33	44	67 A	36,10
Média	4,4	15,6	20,0	35,6	

As médias seguidas de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey 5%.

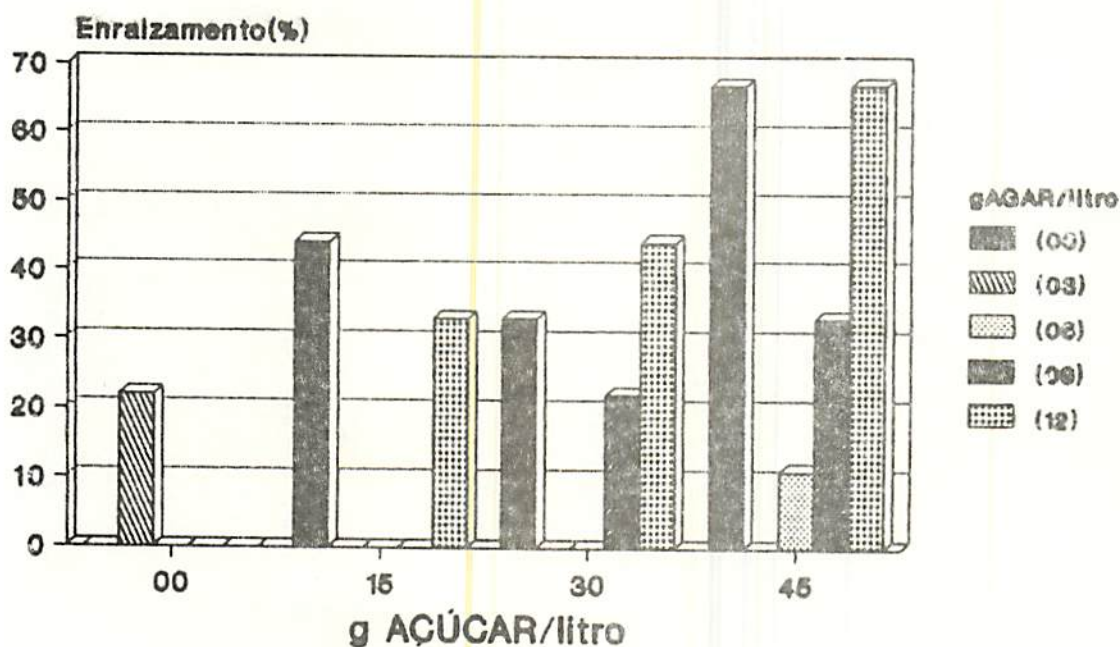


FIGURA 4 - Enraizamento médio 'in vitro' do porta-enxerto 'MI-793' nas diferentes concentrações de açúcar (g/l) e ágar (g/l). ESAL, Lavras-MG, 1989.

As diferenças verificadas entre os porta-enxertos 'M-7' e 'MI-793' discordam das observações de Zimmerman & Broome (1980), citados por MATTOS (1982) de que cultivares de macieira (grupo 'Delicious') não apresentaram enraizamento diferenciado ao se aplicar sacarose no meio de cultivo, em concentrações variando de 15 a 60 g/l.

Os significativos efeitos da adição de sacarose ao

meio de cultivo, no enraizamento 'in vitro' da macieira, podem ser devidos ao papel deste componente como principal substrato para a respiração e como fonte de energia para os tecidos, além de atuar na manutenção do potencial osmótico do meio. A energia liberada pela respiração é empregada para síntese de componentes celulares, que serão utilizados durante a rizogênese.

Com relação a adição de ágar no meio de cultivo, verifica-se na Figura 3 que o porta-enxerto 'M-7' enraizou em todas as concentrações de ágar testadas. O porta-enxerto 'MI-793', por sua vez, só apresentou altas taxas de enraizamento quando da ausência do ágar ou quando este estava em sua concentração maior ou seja, o melhor enraizamento foi obtido em meio líquido e em meio sólido (Figura 4).

A influência do ágar sobre a rizogênese pode ser devida a ação deste composto sobre a difusão de carboidratos, oxigênio, nutrientes, reguladores de crescimento e de outras substâncias relacionadas no enraizamento. Sabe-se no entanto, que o ágar aplicado em baixas concentrações (meio semi-sólido) retarda a difusão de oxigênio dentro do meio de cultivo, o que vem constituir num dos principais fatores inibitórios ao enraizamento (MURASHIGE, 1974). Isto poderia explicar as menores porcentagens de enraizamento observadas nas doses intermediárias de ágar (Quadro 9).

O porta-enxerto 'M-7' não foi afetado de maneira tão significativa quanto o 'MI-793', provavelmente em função de sua maior capacidade de absorção de oxigênio pela parte aérea, impedindo assim os efeitos inibitórios causados pelo déficit de oxi-

gênio nas raízes.

Contudo, segundo MURASHIGE (1974), a concentração necessária de ágar a ser adicionado ao meio de cultivo depende de fatores como pH do meio e tipo de tecido vegetal a ser cultivado.

No presente trabalho, observou-se que a quantidade de açúcar empregada no meio de cultivo pode exercer grandes efeitos sobre a quantidade de ágar a ser adicionado ocorrendo inclusive uma interação entre eles. Para o porta-enxerto 'MI-793', o fator açúcar foi determinante na obtenção de elevados percentuais de enraizamento, sendo que na ausência deste, o enraizamento foi praticamente nulo (Quadro 9 e Figura 4).

4.3. Ensaio 3. AIB x tempo de incubação

Os resultados da análise de variância para o porta-enxerto 'M-7' são apresentados no Quadro 10. Nota-se que os fatores AIB e tempo de incubação bem como a interação entre eles, foram significativos para o enraizamento dos explantes.

Pelo teste de Tukey, verificou-se que com a aplicação de 10 mg/l de AIB e 48 horas de incubação foi possível obter 100% de enraizamento para o 'M-7' (Quadro 11 e Figura 5).

QUADRO 10 - Resumo da análise de variância para a porcentagem de enraizamento 'in vitro' do porta-enxerto 'M-7' em diferentes concentrações de AIB (mg/l) e tempo de incubação (horas). ESAL, Lavras-MG, 1989.

Causas de variação	GL	QM
AIB	3	0,7569**
Tempo	3	1,8125*
AIB x Tempo	9	0,5486**
Resíduo	176	0,1865
CV (%)		38,7520

** , * Significativo ao nível de 1 e 5% de probabilidade.

QUADRO 11 - Percentuais médios de enraizamento 'in vitro' do porta-enxerto 'M-7' nas diferentes concentrações de AIB (mg/l) e tempo de incubação (horas). ESAL, Lavras-MG, 1989.

Tempo (h)					Média
AIB (mg/l)	12	24	48	96	
0	50	8	17 CD	66	35
10	92 ab	50 abcd	100 aA	75 abc	79
20	92	83	56 ABCD	50	73
40	58	33	83 AB	58	58
Média	73	44	67	62	

As médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey 5%.

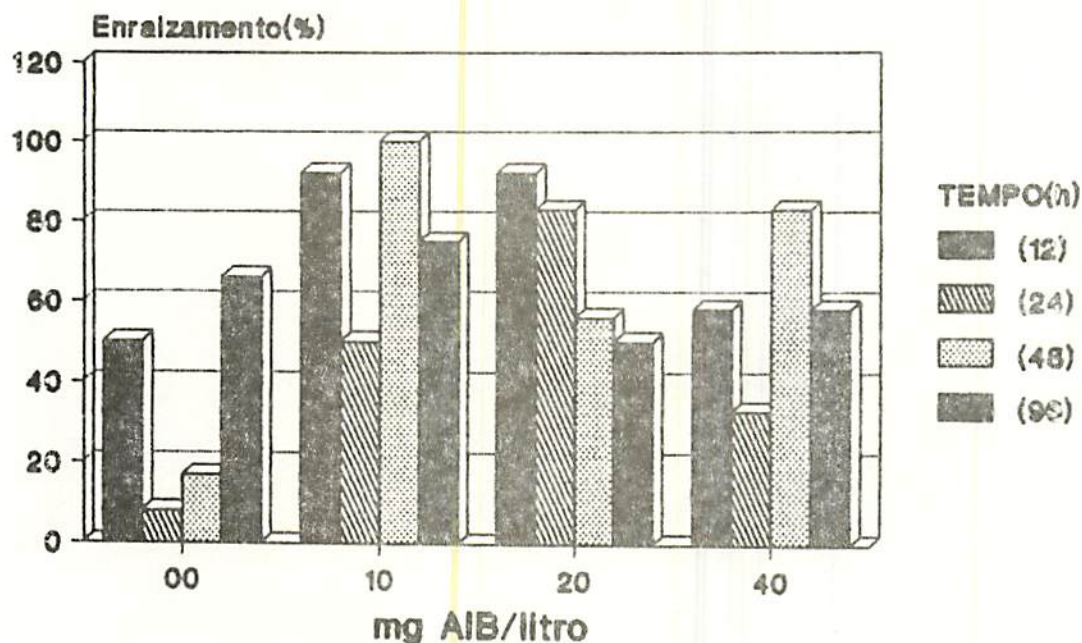


FIGURA 5 - Enraizamento médio 'in vitro' do porta-enxerto 'M-7' nas diferentes concentrações de AIB (mg/l) e tempo de incubação (horas). ESAL, Lavras-MG, 1989.

Para o 'MI-793', observa-se que os fatores AIB e tempo, assim como a interação entre eles, foram significativas para o enraizamento dos explantes (Quadro 12).

Para este porta-enxerto os melhores resultados foram obtidos quando se aplicou 10 mg/l de AIB associado aos tempos de incubação de 12 e 24 horas, com um percentual de 67% de enraizamento em ambos os tempos.

Neste ensaio, as diferenças genotípicas entre os por

QUADRO 12 - Resumo da análise de variância para a porcentagem de enraizamento 'in vitro' do porta-enxerto 'MI-793' em diferentes concentrações de AIB (mg/l) e tempo de incubação (horas). ESAL, Lavras-MG, 1989.

Causas de variação	GL	QM
AIB	3	1,7431**
Tempo	3	1,0625**
AIB x Tempo	9	0,3032*
Resíduo	176	0,1468
CV (%)		50,3830

** , * Significativo ao nível de 1 e 5% de probabilidade.

ta-enxertos foram determinantes nas porcentagens de enraizamento. Analisando-se os Quadros 11 e 13 verifica-se que o porta-enxerto 'MI-793' enraiza-se com mais dificuldade, do que o porta-enxerto 'M-7'.

Em relação ao tempo de incubação, observa-se que o porta-enxerto 'M-7' necessitou de um período de contato mais longo com o AIB para que fosse induzida a iniciação radicular, enquanto que o 'MI-793' respondeu mais rapidamente. Estas diferenças podem estar relacionadas com uma maior ou menor capacidade de absorção do regulador auxínico e também em função do nível en dógeno de auxinas.

As melhores taxas de enraizamento verificadas nos me

QUADRO 13 - Percentuais médios de enraizamento 'in vitro' do porta-enxerto 'MI-793' nas diferentes concentrações de AIB (mg/l) e tempo de incubação (horas). ESAL, Lavras-MG, 1989.

Tempo (h)	12	24	48	96	Média
AIB (mg/l)					
0	0	0 B	0	0	0
10	67 a	67 aA	50 ab	0 b	45,8
20	33	58 A	25	0	29,2
40	25	42 AB	25	25	29,2
Média	31,3	41,7	25	6,3	

As médias seguidas de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

nores tempos de incubação (12 e 24 horas) parecem confirmar a expectativa de alguns pesquisadores (LANE, 1978; JAMES & THURBON, 1979; SNIR & EREZ, 1980 e JAMES & THURBON, 1981) de que a incubação dos explantes em uma determinada concentração de AIB por curto espaço de tempo, com posterior remoção para um meio sem reguladores, é suficiente para induzir a iniciação radicular.

Esta metodologia vem sendo estudada e aprimorada para a maioria das espécies que necessitam de substâncias indutoras do processo de enraizamento, principalmente porque após a indução, estas substâncias, normalmente auxinas, podem tornar-se prejudiciais ao desenvolvimento posterior das raízes, não permi-

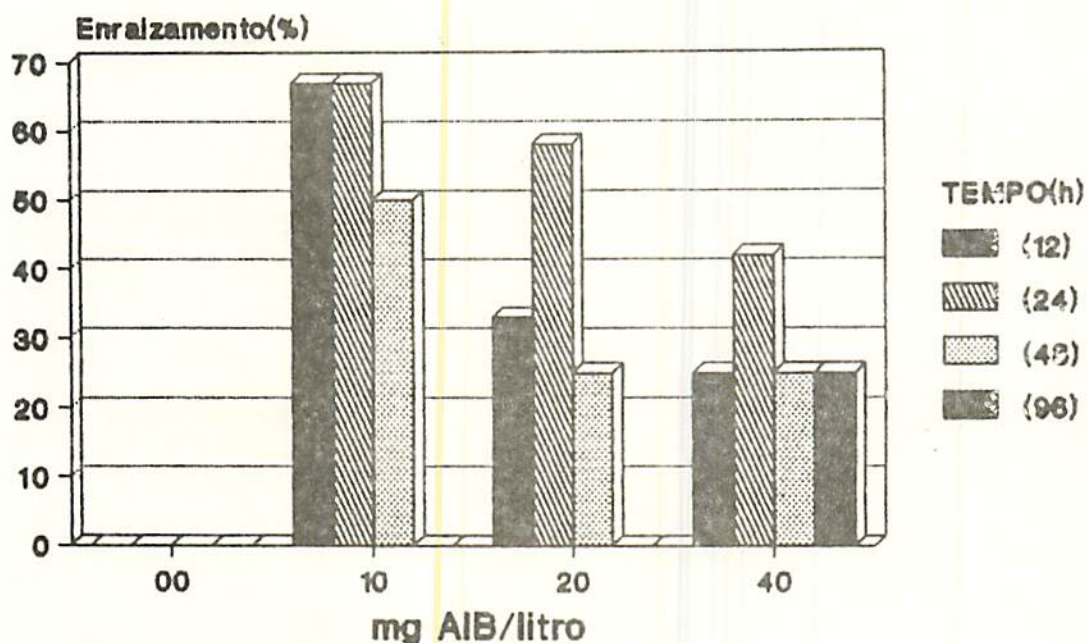


FIGURA 6 - Enraizamento médio 'in vitro' do porta-enxerto 'MI-793' nas diferentes concentrações de AIB (mg/l) e tempo de incubação (horas). ESAL, Lavras-MG, 1989.

tindo o seu alongamento.

Outra razão de se trabalhar com indução do enraizamento por incubação é substituir o enraizamento 'in vitro'. Desta forma o processo seria induzido 'in vitro' e a seguir os brotos seriam removidos para casa de vegetação, onde se daria o desenvolvimento do sistema radicular.

5. CONCLUSÕES

1. A adição de ácido indolbutírico (AIB) na dosagem de 1,0 mg/l no meio de cultivo associado com 75% dos sais promoveu 100% de enraizamento para o porta-enxerto 'M-7' e 80% quando se associou 1,0 mg/l de AIB a 100% dos sais minerais para o 'MI-793'.

2. A sacarose mostrou-se ser essencial ao enraizamento, sendo 15 g/l suficiente para o porta-enxerto 'M-7' e 45 g/l para o 'MI-793'.

3. Os melhores resultados com relação as concentrações de ágar foram obtidos em meio líquido (ausência de ágar) e com 12 g/l para ambos os porta-enxertos.

4. Em relação ao tempo de incubação associado à adição de ácido indolbutírico (AIB) os melhores resultados obtidos para os porta-enxertos 'M-7' e 'MI-793' foram respectivamente 10 mg/l de AIB por 48 horas com 100% de enraizamento e 10 mg/l de AIB por 12 horas com 67%.

6. RESUMO

Para se promover a rizogênese 'in vitro' tornam-se necessários ajustes dos componentes químicos e físicos do meio de cultivo, pois a concentração efetiva de cada substância varia de acordo com as cultivares utilizadas.

Objetivou-se estudar a influência da variação de níveis de AIB, sais minerais, açúcar e ágar no enraizamento 'in vitro' dos porta-enxertos de macieira 'M-7' e 'MI-793'.

O meio de cultivo utilizado nos ensaios foi de MURAS HIGE & SKOOG (1962) - MS sólido, semi-sólido e líquido com pH ajustado para 6.0. Foram usados explantes dos porta-enxertos 'M-7' e 'MI-793' com 1,0 a 2,0 cm de comprimento, sendo inoculado 1 explante por tubo de ensaio. No primeiro ensaio testou-se os efeitos do ácido indolbutírico (AIB) nas concentrações de 0, 1, 2 e 3 mg/l e dos sais minerais do meio MS nas concentrações de 0,25, 50, 75 e 100%. No segundo testou-se os efeitos das diferentes concentrações de açúcar e ágar, que variaram de 0, 15, 30 e 45 g/l e 0, 3, 6, 9 e 12 g/l respectivamente; e no terceiro ensaio avaliou-se o efeito de concentrações do ácido indolbutírico (AIB)

variando de 0, 10, 20 e 40 mg/l com períodos de incubação de 12, 24, 48 e 96 horas.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, adotando-se o esquema fatorial. A análise de variância foi feita para porcentagens de enraizamento, sendo os dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$.

Os porta-enxertos 'M-7' e 'MI-793', mostraram que 1,0 mg/l de AIB, associado com concentrações de sais de 75 e 100%, respectivamente, promoveram de 85 a 100% de enraizamento. O açúcar se mostrou essencial para o enraizamento 'in vitro' e a melhor dose foi em 45 g/l para os dois porta-enxertos, na ausência de ágar ou na dose de 12 g/l. A interação açúcar x ágar foi significativa somente para o 'MI-793', sendo que a melhor taxa de enraizamento (61%) foi obtida quando se aplicou 45 g/l de açúcar + 12 g/l de ágar ou 45 g/l de açúcar na ausência de ágar. Verificou-se que a melhor concentração de AIB para promover o enraizamento foi de 10 mg/l, para os dois porta-enxertos, quando associado com os tempos de incubação de 48 horas para o 'M-7' e 12 horas para o 'MI-793', proporcionando percentuais de enraizamento na ordem de 100 e 67,0% respectivamente.

7. SUMMARY

The induction 'in vitro' rhizogenesis on apple tree one need adjust chemical and physical components medium, because the efective concentrations for each substance change with cultii var used.

The objective was to study the effects of different concentrations of indol butyric acid (IBA), mineral salts, sugar and agar, on in vitro rooting of apple tree rootstock 'M-7' and 'MI-793'.

The MURASHIGE & SKOOG (1962) - MS medium solid, half solid and liquid with pH 6,0, was used. The explants were seg - ments of branches with 1,0 to 2,0 cm lenght, being inoculated 1,0 explant/test tube. In the experiment one were used different conu concentrations of IBA (0, 1, 2 and 3 mg/liter) and mineral salts (0, 25, 50, 75, 100%). The second test used various sugar and agar concentrations (0, 15, 30 and 45 g/liter and 0, 3, 6, 9 and 12 g/liter, respectivelly). In the third experiment the IBA was used at 0, 10, 20 and 40 mg/liter concentrations and incubation of explants by 12, 24, 48 and 96 hours.

The experimental design used was completely randomized in factorial scheme. The experiments were evaluated by rooting percents and the data were transformed in $\sqrt{x + 0,5}$.

The rootstocks 'M-7' and 'MI-793' on 1,0 mg/l of AIB associated with 75 a 100% salts concentrations, showed 85 to 100% of rooting. The sugar was indispensable for in vitro rooting and the better dose was 45 g/l to both rootstocks, on the absence of agar or on 12 g/l. The sugar x agar interactions was significant only to 'MI-793' and the better rooting rate (61%) was achieved with 45 g/l of sugar + 12 g/l of agar or 45 g/l of sugar without agar. The better IBA concentration to induce rooting was 10 mg/l, when associated with incubation times of 48 hours to 'M-7' and 12 hours to 'MI-793' rootstocks, achieving 100 and 67,0% of rooting, respectively.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBOTT, A.J. & WHITELEY, E. Culture of malus tissues in vitro. I. Multiplication of apple plants from isolated shoot apices. Scientia Horticulturae, Amsterdam, 4(2): 183-9, 1976.
2. BARBOSA, W.; DALL'ORTO, F.A.C.; OJIMA, M.; CAMPOS, S.A.F. & TOMBOLATO, A.F.C. Propagação vegetativa 'in vitro' de cultivares de macieira. Bragantia, Campinas, 45(1):143-54, 1986.
3. CHEEMA, G.S. & SHARMA, D.P. In vitro propagation of apple rootstock-EMLA 25. Acta Horticulturae, Hague, 131:75-88, 1983.
4. DUNSTAN, D.J. & TURNER, K.E. The acclimatization of micropropagated plants. In: VASIL, I.K. Cell culture and somatic cell genetics of plants. Orlando, Academic Press, 1984. v.1, cap.15, p.123-9.

5. DUTCHER, R.D. & POWELL, L.E. Culture of apple shoots from buds in vitro. Journal of the American Society for Horticultural Science, New York, 97(4):511-4, 1972.
6. GEORGE, E.F. & SHERRINGTON, P.D. Factors affecting growth and morphogenesis. In: _____. Plant propagation by tissue culture, England, Exegetics, 1984a, cap.5, p.125-71.
7. _____ & _____. The osmotic effect of media ingredients. In: _____. Plant propagation by tissue culture. England, Exegetics, 1984b, cap.6, p.184.
8. HAISSIG, B.E. Metabolic processes in adventitious rooting of cuttings. In: JACKSON, M.B. New roots formation in plants and cuttings. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1986. cap.5, p.141-89.
9. JAMES, D.J. & THURBON, I.J. Rapid 'in vitro' rooting of the apple rootstock M-9. Journal of Horticultural Science, London, 54(4):309-11, 1979.
10. _____. Shoot and root initiation in vitro in apple rootstock M-9 and the promotive effects of phloroglucinol. Journal of Horticultural Science, London, 56(1):15-20, 1981.

11. JONES, D.P. & HATFIELD, S.G.S. Root initiation in apple shoots cultured in vitro with auxins and phenolic compounds. Journal of Horticultural Science, London, 51(4): 495-9, 1976.
12. _____; HOPGOOD, M.E. & O'FARREL, D. Propagation in vitro of M-26 apple rootstocks. Journal of Horticultural Science, London, 52(2):235-8, 1977.
13. _____; PONTIKIS, C.A. & HOPGOOD, M.E. Propagation in vitro of five scion cultivars. Journal of Horticultural Science, London, 54(2):155-8, 1979.
14. _____; ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAN, I.M. & HOPGOOD, M.E. Propagation in vitro of some dwarf apple trees. Journal of Horticultural Science, London, 60(2):141-4, 1985.
15. LANE, D.W. Regeneration of apple plants from shoots meristem tips. Plant Science Letters, Amsterdam, 13(3):281-5, 1978.
16. LÊ, C.L. Influence of temperature on in vitro root initiation and development of apple rootstock M-26. Hortscience, Alexandria, 20(3):451-2, June 1985.

17. MATTOS, E.B. Enraizamento in vitro de brotações de macieira (Malus domestica, Borkh.), cvs. Golden Delicious e Gala e porta-enxerto MM-106. Pelotas, UFP, 1982. 45p. (Dissertação MS).
18. MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. Annual Review of Plant Physiology, Palo Alto, 25:135-66, 1974.
19. _____ & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 15(3):473-97, 1962.
20. NÉMETH, C. Adventitious root induction by substituted 2-chloro-3-phenyl-propionitriles in apple rootstocks cultured in vitro. Scientia Horticulturae, Amsterdam, 14(3):253-9, 1981.
21. _____. Induction on rooting. In: BAJAH, Y.P.S. Biotechnology in agriculture and forestry. I. New York, Boyah, 1986. cap.4, p.49-64.
22. OCHATT, S.J. & CASO, O.M. In vitro meristem of M-4 apple (Malus pumila Mill.). I. optimal nutrient medium. Plant Cell Organ Culture, Netherlands, 2:39-48, 1983.

23. SKOOG, F. & MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symposium of the Society for Experimental Biology, London, 11: 118-31, 1957.
24. SNIR, I. & EREZ, A. In vitro propagation of malling merton apple rootstocks. Hortscience, Alexandria, 15(5):597-8, Sept. 1980.
25. SRISKANDARAJAH, S. & MULLINS, M.C. Micropropagation of Granny Smith apple: factors affecting root formation in vitro. Journal of Horticultural Science, London, 56(1):71-6, 1981.
26. TRAVERS, J.N.; STARBUCK, C.J. & NATARELLA, N.J. Effects of culture medium on in vitro rooting of Antonovka 313 apple. Hortscience, Alexandria, 20(6):1051-2, Dec. 1985.
27. VÁLIO, I.F.M. Auxinas. In: FERRI, M.G. Fisiologia vegetal. São Paulo, EPU, 1985, v.2, cap.2, p.39-72.
28. WALKEY, D.G. Production of apple platlets from axillary-bud meristems. Canadian Journal of Plant Science, Ottawa, 52: 1085-7, Nov. 1972.

29. WAREING, P.F. & PHILLIPS, I.D.J. The role of hormones in shoot and root growth. In: _____. The control of growth and differentiation in plants. Oxford, Pergamon Press, 1984, cap.5, p.89-111.
30. WERNER, E.M. & BOE, A.A. In vitro propagation of malling-7 apple rootstock. Hortscience, Alexandria, 15(4):509-10, Aug. 1980.
31. ZIMMERMAN, R.H. Apple. In: SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMMI-RATO, P.V. & YAMADA, Y. Handbook of plant cell culture. New York, MacMillan Publishing, 1984a, v.2, cap.14, Sec. VII, p.369-95.
32. _____. Rooting apple cultivars in vitro: interactions among light, temperature, phloroglucinol and auxin. Plant Cell Tissue Organ Culture, Netherlands, 3:301-11, 1984b.
33. _____ & BROOME, O.C. Phloroglucinol and in vitro rooting of apple cultivar cuttings. Journal of the American Society for Horticultural Science, New York, 106(5):648-52, 1981.
34. _____ & FORDHAN, I. Simplified method for rooting apple cultivar in vitro. Journal of the American Society for Horticultural Science, New York, 110(1):34-8, 1985.