

LIZANE LÚCIA DE SOUZA

**ENRAIZAMENTO E ACLIMATAÇÃO EM DIFERENTES SUBSTRATOS
DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA 'MARUBAKAIDO'
(*Malus prunifolia* Borkh) MICROPROPAGADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Flávio Zanette

Co-orientadores: Luiz Antônio Biasi
Henrique Soares Koehler

CURITIBA

2004

Souza, Lizane Lúcia de

Enraizamento e aclimação em diferentes substratos do porta-enxerto de macieira 'marubakaido' (*Malus prunifolia* Borkh) micropropagado / Lizane Lúcia de Souza.—Curitiba, 2004.

x, 46 f.

Orientador: Flávio Zanette.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

1. Maça – Propagação in vitro. 2. Porta-enxertos. 3. Maça – Mudanças – Propagação in vitro. I. Título.

CDD 634.11

CDU 631.53:634.11



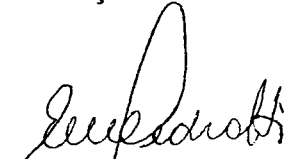
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E FITOSSANITARISMO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
PRODUÇÃO VEGETAL

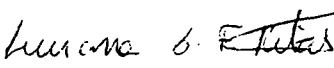
PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pela candidata **LIZANE LUCIA DE SOUZA**, sob o título **“ENRAIZAMENTO E ACLIMATAÇÃO EM DIFERENTES SUBSTRATOS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA ‘MARUBAKAIDO’ (*Malus prunifolia* L.) MICROPROPAGADO”**, para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.


Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata são de parecer pela **“APROVAÇÃO”** da Dissertação.

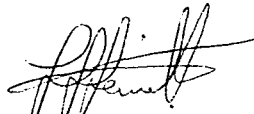
Curitiba, 23 de Março de 2004.


Professor Dr. Enio Pedrotti
Primeiro Examinador


Professora Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas
Segunda Examinadora


Professor Dr. Henrique Soares Koehler
Terceiro Examinador


Professor Dr. Luiz Antonio Biasi
Quarto Examinador


Professor Dr. Flávio Zanette
Presidente da Banca e Orientador

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo apoio, dedicação e estímulo.

Ao Cássio, pelo companheirismo, compreensão, dedicação e auxílio.

Ao meu irmão Herbert, pelo apoio.

À Nádia e ao Sérgio, pelo carinho.

Ao Prof. Dr. Flávio Zanette, pela orientação e transmissão de conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Luiz Antônio Biasi, pela co-orientação e contribuições.

Ao Prof. Dr. Henrique Soares Koehler, pela co-orientação e apoio.

À Elisângela, à Sandra, ao Tássio, ao Marcelo, ao Élcio, pelos auxílios e pela amizade.

Aos colegas de Pós-Graduação, Roberson, Alexandre, Alessandro, Justina e Regina, pelo convívio.

À Célia, funcionária do Laboratório de Micropropagação Vegetal, pelas colaborações.

Aos professores e alunos do Curso de Pós-Graduação que em Agronomia, pelas contribuições.

Às secretárias do curso da Pós-Graduação, Lucimara e Lurdinha, pelo auxílio.

À Sônia, pelo auxílio no resumo em inglês.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos durante o período de fevereiro de 2002 à fevereiro de 2004.

À Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

O sentimento humano
Pode peregrinar por toda parte.
Mesmo buscando o amor
Só o encontrará em si mesmo.
Para todo ser humano
O seu "eu" é o mais amado.
Assim, quem se conhece como o ser amado
Não deve ferir os outros. (Buda)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	vi
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 MICROPROPAGAÇÃO	3
2.2 ENRAIZAMENTO E ACLIMATAÇÃO	5
2.2.1 Tempo de permanência no meio de enraizamento.....	7
2.2.2 Substrato	8
2.2.3 Adubação foliar.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 FONTE DO MATERIAL VEGETAL.....	12
3.2 MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	12
3.3 EXPERIMENTO DE ENRAIZAMENTO E ACLIMATAÇÃO.....	13
3.4 EXPERIMENTO COM AS MUDAS DE MACIEIRA EM EMBALAGEM DE POLIETILENO.....	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1 EXPERIMENTO DE ENRAIZAMENTO E ACLIMATAÇÃO.....	17
4.1.1 Número de folhas, Comprimento de caule e Nota para desenvolvimento de caule	17
4.1.2 Número, comprimento e nota para desenvolvimento de raízes	20
4.1.3 Sobrevivência.....	25
4.2 Experimento com as mudas de macieira colocadas em Embalagens de polietileno ...	28
4.2.1 Número de folhas e Comprimento de caule.....	28
4.2.2 Número e comprimento de raízes.....	32
4.2.2 Massa fresca e sobrevivência	34
5 CONCLUSÕES.....	36
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
REFERÊNCIAS	39
ANEXOS.....	44

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

TABELA 1	- Análise química dos substratos - 1) Plantmax [®] , 2) Plantmax [®] (3/4) + Casca de arroz carbonizada (1/4), 3) Plantmax [®] (1/2) + Casca de arroz carbonizada (1/2), 4) Plantmax [®] (1/4) + Casca de arroz carbonizada (3/4), 5) Casca de arroz carbonizada	14
TABELA 2	- Resultados da análise de variância para o número de folhas, comprimento de caule e nota para desenvolvimento de caule do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos 85 dias em casa-de-vegetação	17
TABELA 3	- Resultados da avaliação do número de folhas, comprimento do caule e nota para desenvolvimento do caule do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos 85 dias em casa-de-vegetação, em diferentes tempos de permanência no meio de enraizamento	18
TABELA 4	- Resultados da avaliação do número de folhas, comprimento do caule e nota para desenvolvimento do caule do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos 85 dias em casa-de-vegetação, em diferentes substratos	18
TABELA 5	- Resultados da avaliação do número de folhas e comprimento do caule (cm) do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos 85 dias em casa-de-vegetação, com e sem adubação foliar	19
TABELA 6	- Resultados da análise de variância para número, comprimento e nota para desenvolvimento de raízes do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos 85 dias em casa-de-vegetação	21
TABELA 7	- Resultados da avaliação do comprimento de raízes (cm) do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos 85 dias em casa-de-vegetação, na interação entre tempo de permanência no meio de enraizamento e substratos	22
TABELA 8	- Resultados da avaliação do número e nota para desenvolvimento de raízes do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos 85 dias em casa-de-vegetação, em diferentes tempos de permanência no meio de enraizamento	22
TABELA 9	- da avaliação do número de raízes e nota para desenvolvimento de raízes do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos 85 dias casa-de-vegetação, em diferentes em diferentes substratos	22
TABELA 10	- Resultados da avaliação do número, comprimento (cm) de raízes e nota para desenvolvimento de raízes do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos 85 dias em casa-de-vegetação, com e sem adubação foliar	22

TABELA 11	- Custos de produção do substrato para produção de 1000 mudas de macieira, em tubetes	25
TABELA 12	- Resultados da análise de variância para porcentagem de sobrevivência do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos 85 em casa-de-vegetação	26
TABELA 13	- Resultados da avaliação da sobrevivência do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos 85 dias em casa-de-vegetação, em diferentes tempos de permanência no meio de enraizamento	26
TABELA 14	- Resultados da avaliação da sobrevivência do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos 85 dias em casa-de-vegetação, em diferentes substratos	26
TABELA 15	- Resultados da avaliação da sobrevivência do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos 85 dias em casa-de-vegetação, com e sem adubação foliar	27
TABELA 16	- Resultados da análise de variância para número de folhas e comprimento de caule do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos seis meses em casa-de-vegetação	28
TABELA 17	- Resultado da avaliação do número de folhas, comprimento de caule e massa fresca do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos seis meses em casa-de-vegetação, em diferentes substratos	29
TABELA 18	- Resultados da análise de variância para número de raízes do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos seis meses em casa-de-vegetação	32
TABELA 19	- Resultado da avaliação do número e comprimento de raízes do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos seis meses em casa-de-vegetação, em diferentes substratos	32
TABELA 20	- Resultados da análise de variância massa fresca e sobrevivência do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido'	34
TABELA 21	- Resultado da avaliação da massa fresca e sobrevivência do porta enxerto de macieira 'Marubakaido' em diferentes substratos	34
FIGURA 1	- Critério de avaliação para desenvolvimento do sistema caulinar e radicial do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido', após a avaliação realizada em casa-de-vegetação, com notas de 1 a 4, em ordem decrescente	15

- FIGURA 2 - Comparação dos resultados das avaliações do número de folhas do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, no primeiro experimento com as mudas em tubetes de 50cm³ de volume, e no segundo experimento com as mudas em embalagens de 1178cm³ de volume, aos 85 dias e aos seis meses em casa-de-vegetação, respectivamente 30
- FIGURA 3 - Comparação dos resultados das avaliações de comprimento de caule do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, no primeiro experimento com as mudas em tubetes de 50cm³ de volume, e no segundo experimento com as mudas em embalagens de 1178cm³ de volume, aos 85 dias e aos seis meses em casa-de-vegetação, respectivamente 30
- FIGURA 4 - Porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos 85 dias em casa-de-vegetação, com as mudas em tubetes de 3cm de diâmetro, 12cm de altura e de 50cm³ de volume 31
- FIGURA 5 - Porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos seis meses em casa-de-vegetação, em embalagens de polietileno de 10cm de largura, 15cm de altura e 1178cm³ de volume 31
- FIGURA 6 - Comparação dos resultados das avaliações do número de raízes do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, no primeiro experimento com as mudas em tubetes de 50cm³ de volume, e no segundo experimento com as mudas em embalagens de 1178cm³ de volume, aos 85 dias e aos seis meses em casa-de-vegetação, respectivamente 33
- FIGURA 7 - Comparação dos resultados das avaliações de comprimento de raízes do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, no primeiro experimento com as mudas em tubetes de 50cm³ de volume, e no segundo experimento com as mudas em embalagens de 1178cm³ de volume, aos 85 dias e aos seis meses em casa-de-vegetação, respectivamente 34

RESUMO

Os métodos de propagação *in vitro*, são bastante eficientes na multiplicação de porta-enxertos, oferecendo segurança no aspecto fitossanitário das mudas produzidas. Contudo, o enraizamento e a aclimação são pontos críticos na micropropagação. O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Micropropagação do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo e na casa-de-vegetação na Universidade Federal do Paraná no período de junho de 2002 a dezembro de 2003. O objetivo do trabalho foi encontrar um protocolo para o enraizamento e aclimação do porta-enxerto de macieira Marubakaido micropropagado. As plantas foram transferidas do laboratório para casa-de-vegetação em tubetes de 50cm³. Foram avaliados três fatores: A) Tempo de permanência no meio de enraizamento, por 10 e 30 dias, B) Diferentes substratos: 1) Plantmax[®], 2) Plantmax[®](3/4) + Casca de arroz carbonizada (1/4), 3) Plantmax[®](1/2) + casca de arroz carbonizada (1/2), 4) Plantmax[®](1/4) + casca de arroz carbonizada (3/4), 5) Casca de arroz carbonizada, C) Aplicação ou não de adubação foliar. O delineamento foi inteiramente ao acaso com 4 repetições e 8 plantas por unidade experimental em arranjo fatorial de três fatores. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Foram analisadas as seguintes variáveis: número de folhas, altura do caule, nota para desenvolvimento do caule (sendo atribuídas notas de 1 a 4), número de raízes, comprimento de raízes, nota para desenvolvimento das raízes, (sendo atribuídas notas de 1 a 4) e sobrevivência. Foi verificada interação entre substrato e tempo de permanência em meio de enraizamento somente para comprimento de raízes, sendo que a combinação entre o substrato casca de arroz carbonizada com a permanência *in vitro* por 10 dias apresentou o menor comprimento das raízes. Para os demais fatores não houve interação. O melhor tempo de permanência no meio de enraizamento foi de 30 dias para todas as variáveis analisadas. As misturas dos substratos foram mais eficientes do que a utilização de um substrato único para as seguintes variáveis analisadas: número de folhas, nota para desenvolvimento do caule, número e nota para desenvolvimento de raízes. A aplicação de adubação foliar influenciou positivamente duas variáveis: número de folhas e altura do caule. Após a avaliação, as plantas foram transferidas para embalagens de polietileno de 10x15cm e volume de 1L, em três diferentes substratos: 1) Plantmax[®], 2) Plantmax[®](3/4) + Casca de arroz carbonizada (1/4), 3) Plantmax[®](1/2) + casca de arroz carbonizada (1/2), onde permaneceram por 90 dias. O delineamento foi inteiramente ao acaso com 4 repetições e 20 plantas por unidade experimental. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Foram analisadas as seguintes variáveis: número de folhas, comprimento de caule, número e comprimento de raízes, massa fresca e sobrevivência. Os substratos 1) Plantmax[®] e 3) Plantmax[®](1/2) + casca de arroz carbonizada (1/2) promoveram maior número de folhas, comprimento de caule e massa fresca, sendo que o número e comprimento de raízes e sobrevivência diferiram entre os tratamentos. Observou-se uma retomada de crescimento em todas as variáveis após a transferência para recipientes de maior volume.

Palavras-chave: micropropagação, substrato, produção de mudas, tamanho de recipiente.

ABSTRACT

ROOTING AND ACCLIMATATION IN DIFFERENT SUBSTRATES OF MICROPROPAGATED APPLE ROOTSTOCKS 'MARUBAKAIDO' (*Malus prunifolia* Borkh)

The propagation methods *in vitro* are very efficient for the multiplication of rootstocks, offering phytosanitary security to the plants produced. However, the rooting and acclimation are critical points for the micropropagation. The present work was done at the Laboratório de Micropropagação of the Departamento de Fitotecnia and Fitossanitarismo, and also at the greenhouse at the Universidade Federal do Paraná (UFPR), from June 2002 to December 2003. The aim of this research was finding a protocol for the rooting and acclimation of the micropropagated apple rootstock Marubakaido. The plants were transferred from the laboratory to the greenhouse in containers of 50cm³. Three factors were evaluated: (1) period of the permanence in the rooting media, during 10 or 30 days; (2) different substrates: a) Plantmax[®], b) Plantmax[®](3/4) + carbonized rice hulls (1/4), c) Plantmax[®](1/2) + carbonized rice hulls (1/2), d) Plantmax[®](1/2) + carbonized rice hulls (3/4), e) carbonized rice hulls; (3) Application or non-application of leaf fertilization. The delineation was completely at random with 4 repetitions and 8 plants per experimental unit in a factorial arrangement of three factors. The averages were compared at the test of Tukey at 5% of significance. The following variables were analyzed: number of leaves, stem's high, mark for the stem's development (the marks ranged from 1 to 4), number of roots, roots' length, mark for the roots' development (from 1 to 4) and survival. The interaction between substrate and period of permanence in the rooting media was verified only for the roots length, and the combination of the carbonized rice hulls with the permanence *in vitro* during 10 days corresponded to the roots' smallest length. For the other factors, there was no interaction. The best period of permanence in the rooting media was 30 days for all the variables analyzed. The mixtures of the substrates were more efficient than the utilization of one substrate only for the following variables analyzed: number of leaves, mark for the stem's development number and mark for the roots' development. The application of leaf fertilization influenced positively two variables: number of leaves and stem's high. After the evaluation, the plants transferred to containers of 10 x 15cm and vol/1 L, in three different substrates: a) Plantmax[®], b) Plantmax[®](3/4) + carbonized rice hulls (1/4), c) Plantmax[®](1/2) + carbonized rice hulls (1/2), where they were kept 90 days. The delineation was completely at random with 4 repetitions and 20 plants per experimental unit. The averages were compared at the test of Tukey at 5% of significance. The following variables were analyzed: number of leaves, stem's length, number length of roots, fresh mass and survival. The substrates a) Plantmax[®] and c) Plantmax[®](1/2) + carbonized rice hulls (1/2) furthered the increase of the number of leaves, of the stem's length and of the fresh mass, and the number and length of roots and survival were different in both treatments. It was observed that there was a retake of growth in all the variables after the transfer to recipients of more volume.

Keywords: micropropagation, substrate, grower, container size.

1 INTRODUÇÃO

A macieira (*Malus spp.*) pertence à família *Rosaceae* e é originária da Europa e da Ásia. Sua exploração comercial no Brasil iniciou em 1960, no estado de Santa Catarina. A macieira é a espécie de clima temperado mais importante comercializada como fruta fresca, tanto no contexto internacional quanto no brasileiro. O cultivo da macieira se estabeleceu no Brasil por meio de grandes empresas atraídas por incentivos de políticas públicas. As empresas instalaram pomares e montaram toda a infra-estrutura de câmaras frigoríficas, transporte a frio e estrutura de comercialização (Mello, 2004). Segundo este autor, a produção brasileira de maçã está concentrada na Região Sul, que é responsável por 98% da produção nacional. A produção de maçã no Brasil, em 1973/74, atingia 1.528 toneladas, havendo aumento significativo a cada safra, atingindo em 2001/2002 a produção de 857.340 toneladas.

A produção de mudas de macieira baseia-se fundamentalmente no uso da enxertia. O porta-enxerto tem fundamental importância, pois este é usado para controlar o vigor da planta, bem como para oferecer resistência a patógenos e adaptação a diferentes tipos de solo. O porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido de origem japonesa é um dos porta-enxertos mais promissores introduzidos no Brasil e caracteriza-se por ser vigoroso, apresentar-se resistente à podridão-do-colo, com relativa resistência à *Rosellinea spp.*, porém, sensível à viroses (Denardi, 1986).

A multiplicação de árvores frutíferas por enxertia é um processo usado há muitos anos. Inicialmente com técnicas rudimentares, que foram evoluindo até a atualidade onde a exploração econômica cada vez mais intensa dos pomares e o sistema de comercialização de frutas exigem que a produção de mudas ofereça garantia de uniformidade e de produção aos pomares implantados.

Os porta-enxertos de macieira são produzidos comercialmente, por via vegetativa, utilizando-se principalmente a mergulhia de cepa e mergulhia contínua (Maciel *et al.*, 2002; Epagri, 2002). Esta técnica apresenta porém, baixo rendimento, uso intensivo de mão-de-obra e considerável espaço físico, além de favorecer a propagação de materiais com problemas fitossanitários (Yui *et al.*, 1993; Fachinello *et al.*, 1995). Os métodos de propagação *in vitro* são bastante eficientes na multiplicação, tanto das matrizes como dos porta-enxertos, oferecendo maior segurança no aspecto fitossanitário das mudas produzidas. A cultura de meristemas é uma técnica viável para propagação massal, pois apresenta bastante eficiência na multiplicação, além da obtenção de mudas livres de vírus, permitindo o estabelecimento de culturas com baixíssimo índice de contaminação, além de

possibilitar a eliminação de outros patógenos, como viróides, organismos semelhantes a micoplasmas e bactérias. Contudo, o enraizamento e a aclimação são pontos críticos na micropropagação sendo, em alguns casos, um fator limitante do processo de micropropagação. Na transferência para casa-de-vegetação as plantas passam de condições de reduzido fluxo transpiratório para um ambiente que demanda um incremento na taxa de transpiração, ficando suscetível ao estresse hídrico. A planta passa de uma condição de alta disponibilidade de nutrientes no meio, para outra onde precisa rapidamente incrementar a concentração de sais, e há transferência de um ambiente asséptico para outro onde a planta está sujeita ao ataque de microorganismos saprofíticos e, eventualmente, patogênicos. Grattapaglia e Machado (1998) relatam que existem poucos trabalhos elucidando os detalhes do procedimento de transplante e aclimação, e das dificuldades e soluções encontradas neste processo.

A definição de um protocolo para propagação vegetativa *in vitro* da macieira, pela possibilidade de produzir plantas idênticas e saudáveis, com economia de espaço e de tempo, poderá estimular os viveiristas mais tecnificados a adotar a metodologia nas condições brasileiras, como já vem ocorrendo em diversas biofábricas no Sul do Brasil. Desta forma, o presente trabalho buscou desenvolver um protocolo para o enraizamento e aclimação do porta-enxerto de macieira Marubakaido micropropagado, testando tempos de permanência no meio de enraizamento *in vitro*, substratos no desenvolvimento em casa-de-vegetação e doses de adubação foliar.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MICROPROPAGAÇÃO

A propagação vegetativa *in vitro* consiste em cultivar assepticamente explantes em meios nutritivos contendo concentrações adequadas de reguladores de crescimento para indução de crescimento, proliferação e enraizamento. Esses meios incluem um suporte semi-sólido (geralmente ágar), elementos inorgânicos, uma fonte de energia e freqüentemente algumas vitaminas suplementares (Hartmann *et al.*, 1997).

Para otimizar o processo de micropropagação, diversas formulações de meios de cultura básicos têm sido utilizadas no cultivo *in vitro*. O meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) têm apresentado bons resultados para várias espécies. Em macieira, o efeito de diferentes composições salinas para multiplicação das brotações do porta-enxerto 'Seleção 69' foi testado por Santa-Catarina *et al.* (2001), que obtiveram o melhor resultado com meio de cultura MS, proporcionando maior número de brotações por explante, em relação aos demais meios testados. O enraizamento *in vitro* das brotações de macieira é realizado com bastante eficiência com a redução dos sais do meio de Murashige e Skoog (1962), os quais podem ser reduzidos a 3/4 (Pasqual *et al.*, 1994), a 1/3 ou a 1/4 (Ribas e Zanette, 1991).

O carboidrato mais utilizado como fonte de energia nos meios nutritivos é a sacarose, sendo que a adição desse açúcar proporciona a obtenção das mais altas taxas de crescimento na maioria das espécies (Grattapaglia e Machado, 1998). Nas fases de isolamento e multiplicação da macieira, têm sido utilizadas a concentração de 3% de sacarose (Barbosa *et al.*, 1986; Oliveira *et al.*, 1999). Na fase de enraizamento é utilizada em concentrações variando entre 2% e 5,2% (Lane, 1978). No entanto, a concentração ideal também pode variar conforme a cultivar, como pode ser observado no trabalho de Pasqual *et al.* (1994), que encontrou melhores resultados de enraizamento com a quantidade de 4,5% para a cultivar MI-793 e 1,5% para a cultivar M-7. Ribas e Zanette (1992), trabalhando com a cultivar Gala e Hoffmann *et al.* (2001), com a cultivar Marubakaido encontraram melhores resultados utilizando 2% de sacarose.

A quantidade de ágar utilizada no meio de cultura é mantida em até 1%, de modo a proporcionar uma consistência adequada (Murashige e Skoog, 1962). No enraizamento *in vitro* da macieira, Lane (1978) e Snir e Erez (1980) obtiveram bons resultados com a utilização de 0,7% de ágar. Concentrações acima desta podem dificultar a operação de transplante devido à quebra de raízes e à dificuldade de lavagem do meio aderido,

principalmente se as raízes formadas forem muito finas e ramificadas (Grattapaglia e Machado, 1998).

A composição e a concentração de reguladores de crescimento no meio são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos (Caldas *et al.*, 1998). É importante que o meio de cultura contenha o tipo correto de regulador de crescimento e a concentração adequada para cada variedade de planta (Kyte e Kleyn, 1999). Auxinas, citocininas e giberelinas são as substâncias mais usadas na cultura de tecidos como reguladores de crescimento (Kyte e Kleyn, 1999). Em geral as auxinas tem efeito no enraizamento e formação de calo, as citocininas são responsáveis pela formação de brotações laterais e as giberelinas têm efeito no alongamento de brotações (Hill, 1996).

As auxinas são sintetizadas nas plantas em regiões de crescimento ativo como os meristemas apicais, gemas axilares, folhas jovens e meristemas de raízes, atuando no local de síntese ou sendo translocadas para diferentes órgãos onde atuam no mecanismo interno de regulação do crescimento, desenvolvimento e morfogênese. Este regulador geralmente causa a divisão celular, alongação e aumento no tamanho dos tecidos, formação de raízes adventícias, inibição da formação de brotos adventícios e axilares (Pierik, 1987). O ácido indol acético (AIA) é a auxina de ocorrência natural capaz de controlar o crescimento e a alongação celular, podendo ser utilizado exogenamente como composto sintético para promover o enraizamento. No entanto, o AIA tende a ser desnaturado no meio de cultura. Nesse sentido faz-se necessário a utilização de compostos que são análogos químicos do AIA e portanto podem ser chamados de auxinas. As auxinas sintéticas mais utilizadas na cultura de tecidos para promover o enraizamento de brotações são o ácido indol butírico (AIB) e o ácido naftaleno acético (ANA) (George, 1993).

As concentrações de AIB que promovem maior enraizamento, número médio de raízes e comprimento médio das raízes de macieira estão entre 0,4 e 1,9 μM (Ribas e Zanette, 1991; Pasqual *et al.*, 1994; Pereira e Fortes, 2001). Outras substâncias, como por exemplo, os carboidratos e compostos nitrogenados são consideradas co-fatores do enraizamento e podem participar do processo, atuando sinergicamente com as auxinas (Raven *et al.*, 1996).

As citocininas são sintetizadas principalmente nos ápices das raízes das plantas. São utilizadas no meio de cultura para promover a proliferação de brotações adventícias, formação de gemas axilares e inibição da formação de raízes. Auxiliam a retardar a senescência e influenciam o transporte de auxinas (George, 1993). A citocinina mais utilizada na multiplicação *in vitro* é o 6-benzilaminopurina (BAP) por induzir alta taxa de

multiplicação e apresentar baixo custo. A concentração ideal depende do genótipo e das condições da cultura (Hartmann *et al.*, 1997). Concentrações entre 0,1 e 0,45 μ M têm sido utilizadas com sucesso em macieira na fase de multiplicação das brotações (Lane, 1978; Snir e Erez, 1980; Santa-Catarina *et al.*, 2001; Hoffmann *et al.*, 2001). Para o porta-enxerto Marubakaido, a concentração de 0,22 μ M mostrou melhores resultados para altura média das plantas, número médio de brotos e número médio de entrenós (Nunes *et al.*, 1999). O estímulo ao crescimento e desenvolvimento, pela divisão e alongamento celular, é aumentado quando se utiliza uma combinação entre auxina e citocinina, que atua no controle da morfogênese e formação de órgãos em cultura de tecidos (Yui, 1990).

2.2 ENRAIZAMENTO E ACLIMATAÇÃO

O enraizamento é o estágio no qual há formação de raízes nas microestacas, podendo ser feito *in vitro* ou *ex vitro*. A fase de enraizamento deve proporcionar qualidade do sistema radicial formado na planta (Grattapaglia e Machado, 1998). Apesar dos avanços nos protocolos, poucos trabalhos foram realizados no sentido de elucidar problemas ligados à aclimatação. O enraizamento e a aclimatação podem comprometer o processo de micropropagação por envolverem a neoformação de um sistema radicial e a passagem para condições *ex vitro*. Após a transferência para a casa-de-vegetação as plantas passam a ser autotróficas, e os carboidratos devem ser produzidos por meio da fotossíntese. Durante as fases da cultura *in vitro*, as plantas crescem sob condições especiais de redução das trocas gasosas, alta umidade do ar, baixa intensidade luminosa e uso de açúcar como fonte de energia. As condições *in vitro* podem causar inibição da fotossíntese, estômatos anormais, maior acúmulo de reservas ou biomassa, dificultando a aclimatação, proporcionando perdas elevadas de plantas na transferência para as condições *ex vitro*. Quando transferidas para condições *ex vitro*, as mudas normalmente apresentam altas taxas de transpiração, em função da alta condutividade hidráulica de suas folhas, o que, na maioria das situações, provoca elevado déficit hídrico, podendo ocorrer a morte das mudas (Pierik, 1987; Díaz-Pérez *et al.*, 1995; Borghezan *et al.*, 2003).

Desta forma, um dos maiores problemas na passagem para condições *ex vitro* é o estresse hídrico. Isso ocorre porque as plantas *in vitro* apresentam uma série de deficiências anatômicas que dificultam o controle da transpiração, permitindo uma rápida perda de água. A camada de cera protetora sobre as folhas é mínima ou inexistente devido a alta umidade relativa que varia entre 90 e 100% e, como consequência, quando se transfere a planta para a casa-de-vegetação, ocorre uma transpiração cuticular extra, já que a umidade do ar em

condições *ex vitro* é mais baixa. A conexão entre o sistema vascular do caule e das raízes adventícias ainda é precário para permitir um fluxo transpiratório adequado. Nesta fase os estômatos não são funcionais e respondem muito lentamente ao estresse hídrico sendo que, em plantas *in vitro*, eles estão relacionados com a capacidade de fotossíntese e o processo de aclimação, uma vez que estes exercem papel na regulação de trocas gasosas e perda de água pela transpiração. As folhas de uma planta produzida *in vitro* são freqüentemente mais finas, com pouco desenvolvimento de absorção e fotossinteticamente pouco ativas, e em conseqüência, mal adaptadas às condições que encontram *ex vitro*. As raízes formadas em meio com ágar são sensíveis e não funcionam de forma adequada *ex vitro* por possuírem menos pêlos radiciais que as formadas em substratos mais porosos, como a vermiculita por exemplo (Pierik, 1987; Grattapaglia e Machado, 1998; Borghezan *et al.* 2003; Gribaudo, *et al.* 2003).

Os aspectos da anatomia foliar de plantas micropropagadas foram estudados por Fráguas (2003), que verificou diferenças entre plantas de figueira que permaneceram *in vitro* e plantas que passaram para condições *ex vitro*. As plantas *in vitro* apresentaram tecidos foliares pouco desenvolvidos e grande número de estômatos, exigindo cuidados na etapa inicial da aclimação. Conforme o autor, o número de estômatos reduz durante a aclimação, auxiliando o processo de adaptação das plantas às novas condições ambientais.

Entretanto, Borghezan *et al.*(2003), trabalhando com avaliação de parâmetros morfofisiológicos de porta-enxertos de videira, verificaram que os teores de clorofila e a densidade de estômatos dos porta-enxertos de videira *in vitro* são comparáveis aos observados em plantas *ex vitro*, indicando que estes não são limitantes para a multiplicação e aclimação de videira. Isto foi observado em alguns cultivares, indicando que as diferenças de aspectos morfofisiológicos entre as fases *in vitro* e *ex vitro* podem depender da espécie.

Para evitar problemas de baixa sobrevivência, é necessário fornecer condições de alta umidade durante os primeiros dias de aclimação para que a planta se adapte a alta demanda evaporativa e a maior luminosidade da casa-de-vegetação. Fatores importantes como tipo de substrato e época do ano também influenciam no sucesso da fase de aclimação (Grattapaglia e Machado, 1998). Pereira *et al.* (1998), trabalhando com a cultivar Gala, observaram uma taxa média de sobrevivência menor (71,2%), quando as plântulas foram aclimatadas durante os meses mais quentes do ano (dezembro e janeiro).

Como recipientes para aclimação, utilizam-se embalagens plásticas e canteiros móveis como bandejas de isopor ou tubetes (Trindade e Oliveira, 1999). O critério de

escolha dos recipientes é definido em função da disponibilidade e custo. Assim, torna-se necessária a execução de trabalhos visando à adequação do melhor recipiente para a propagação das plantas, já que tubetes, bandejas e embalagens plásticas ocupam volumes diferentes de substrato, o que pode influenciar na qualidade final da muda, devido ao volume de substrato a ser explorado pelas raízes para absorção de água e nutrientes. O tamanho do recipiente tem influência direta no custo final, pois resulta na quantidade do substrato a ser utilizado, no espaço que irá ocupar no viveiro, na mão-de-obra utilizada no transporte, remoção para aclimação e retirada para entrega ao produtor, além da influência na quantidade de insumos demandada (Queiroz e Melém Júnior, 2001).

2.2.1 Tempo de permanência no meio de enraizamento

Na aclimação, o tipo e a qualidade do sistema radicial obtidos são importantes para se obter sucesso na sobrevivência. Raízes curtas, em geral, são mais desejáveis, pois, além de facilitarem seu manuseio no momento do plantio, normalmente estão numa fase de crescimento ativo, o que facilita a sobrevivência da planta (Grattapaglia e Machado, 1998). Por este motivo, pesquisadores discutem também os efeitos do tempo de permanência das brotações em meio de enraizamento sobre a percentagem de sobrevivência das plantas durante a aclimação. Sugere-se que o aumento do tempo de permanência das raízes em meio de cultura pode proporcionar um rápido envelhecimento nas mesmas, tornando-as menos funcionais, e prejudicando a sobrevivência das plantas em casa de vegetação (Pereira e Fortes; 2001; Pedrotti e Voltolini, 2001).

Existem vários trabalhos realizados que mostram qual é o melhor tempo de exposição à auxina. Ribas e Zanette (1991), trabalhando com macieira cultivar Gala, concluíram que as brotações de macieira devem permanecer no meio de cultura com auxina por no mínimo 6 dias, já Nunes *et al.* (1999), recomendaram a transferência das plântulas para aclimação a partir do décimo quinto dia em meio MS/3 com $0,49\mu\text{M}$ de AIB.

Estas questões estão relacionadas ao fato de que o ágar provoca redução da disponibilidade de oxigênio às raízes das plantas. Hoffmann *et al.* (1999), estudando diferentes substratos para enraizamento de macieira, observaram melhor qualidade do sistema radicial quando se utilizou 40% ou mais de vermiculita ou areia em comparação ao ágar somente. No mesmo trabalho, os autores não encontraram diferenças para número de raízes, que é uma característica importante para fixação das mudas durante a aclimação, embora sua funcionalidade seja discutível quando estas são emitidas em meio geleificado com ágar (Pierik, 1987). Srisikandarajah *et al.* (1982), trabalhando com indução *in vitro* de

raízes adventícias de macieira, também citam como desvantagem da permanência por período prolongado *in vitro*, a diminuição do diâmetro dos brotos.

2.2.2 Substrato

A seleção do substrato é de fundamental importância para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Substrato é o meio onde as plantas desenvolvem suas raízes, servindo também como suporte, podendo ainda regular a disponibilidade de nutrientes para as raízes. Pode ser formado de solo mineral ou orgânico, de um só ou de diversos materiais em misturas (Kämpf, 2000). O substrato 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.

A planta deve encontrar no substrato condições satisfatórias para seu crescimento e desenvolvimento. Para isso, o substrato deve ter algumas características essenciais, tais como: aeração, permeabilidade, poder de tamponamento para valor de pH e capacidade de retenção de água e nutrientes. O material deve ter também alta estabilidade de estrutura, para evitar compactação, alto teor em fibras resistentes à decomposição, para evitar a compostagem no vaso, e estar livre de agentes causadores de doenças, de pragas e de propágulos de ervas daninhas (Kämpf, 2000). Segundo o autor, dificilmente se encontra um material com todas as características positivas para uso como substrato. Denomina-se condicionador de substratos o componente que irá melhorar, de modo significativo, as propriedades do meio de cultivo. A casca de arroz carbonizada está entre alguns dos principais condicionadores de substratos.

A escolha do condicionador deve estar baseada em uma análise do substrato, que irá indicar qual a propriedade a ser melhorada. Havendo mais de um tipo de condicionador para a mesma propriedade, a seleção do material dá-se por sua disponibilidade, custo, aquisição, transporte e experiência pessoal no seu manejo. Para preparar um substrato, é preciso conhecer a qualidade dos componentes que serão empregados, a partir da avaliação de suas propriedades físicas e químicas (Kämpf, 2000; Silva *et al.*, 2001).

A densidade do substrato é importante por influenciar na penetração das raízes, aeração e circulação de ar e água no solo, afetando diretamente o crescimento das plantas. Valores entre 100 a 300 Kg.m⁻³ são considerados aceitáveis para propagação em células e bandejas. O substrato deve ser suficientemente poroso, a fim de permitir trocas gasosas eficientes – suprimento de oxigênio e rápida remoção de gás carbônico – promovendo a respiração das raízes e a atividade dos microorganismos. O substrato ideal deve ter 85% do

seu volume em poros. Outro fator importante em um substrato é a disponibilidade de água, pois as plantas necessitam de água para manter seu metabolismo, uma vez que por meio dela, as plantas elaboram os carboidratos, mantêm a hidratação do protoplasma, utilizando-a ainda, como solvente e como meio de transporte de nutrientes e elementos minerais. A água é também, indispensável aos organismos vivos que se encontram no solo. A disponibilidade de ar também afeta diretamente a qualidade da muda, pois em condições de baixa aeração, a absorção de água pelas raízes torna-se deficiente. Essa redução da entrada da água na planta é explicada pelo fato de ocorrer, nessa situação de fraca aeração, uma alta pressão parcial de gás carbônico, onde o teor de oxigênio é baixo, dificultando a absorção de nutrientes pelas plantas (Kiehl, 1979; Lima e Lima, 1996; Kämpf, 2000).

Além das propriedades físicas, algumas propriedades químicas são fundamentais para que o substrato tenha boa qualidade. O termo pH refere-se à reação de alcalinidade ou acidez do meio de cultivo, em uma escala de 1 a 14. Valores de 1 a 6 correspondem à pH ácido, pH 7 é neutro e valores de 8 a 14, correspondem à pH alcalino. A importância do conhecimento desta propriedade está relacionada com sua influência na disponibilidade de nutrientes bem como no efeito sobre processos fisiológicos da planta. Valores inadequados de pH podem causar desequilíbrios fisiológicos nas plantas, afetando a disponibilidade de nutrientes. Para substratos com predominância de matéria orgânica, a faixa de pH recomendada é de 5,0 a 5,8; quando for à base de solo mineral, entre 6,0 e 6,5. Em meios com pH abaixo de 5,0 podem aparecer sintomas de deficiência de N, K, Ca, Mg e B, enquanto problemas com a disponibilidade de P e micronutrientes (Fe, Mn, Zn e Cu) são esperados em pH acima de 6,5. Outro fator importante no substrato é a capacidade de troca de cátions (CTC), que é a propriedade de suas partículas sólidas adsorverem e trocarem cátions como Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ e NH_4^+ . Os nutrientes retidos nos pontos de troca estão protegidos contra a fácil lixiviação. Finalmente, pode-se citar o teor total de sais solúveis que refere-se aos constituintes inorgânicos do meio capazes de se dissolver em água. A sensibilidade à concentração de sais varia conforme a espécie e a idade da planta – quanto mais jovem a muda, mais sensível. Na seleção de materiais para substratos busca-se obter sempre a salinidade abaixo de $1,0 \text{ g.L}^{-1}$, a fim de evitar limitações para o cultivo de plantas sensíveis (Kämpf, 2000).

Diversos substratos têm sido utilizados em trabalhos na fase de aclimação do porta-enxerto Marubakaido, com resultados bastante distintos com relação à sobrevivência. Hoffmann *et al.* (2001) utilizaram substrato comercial Plantmax[®] e obtiveram em média 40,5% de sobrevivência. Já Pereira e Fortes (2001), utilizaram terra de mato, casca de arroz

carbonizada e esterco bovino na proporção 3:1:1 (v/v) e obtiveram sobrevivência de até 97%.

A casca de arroz carbonizada (CAC), um dos principais condicionadores de substrato, é obtida pela carbonização de cascas de arroz. O processo é simples, mas lento. É usada pura no enraizamento de estacas ou em misturas com solo mineral, turfa ou composto orgânico. Possui baixa densidade, baixa capacidade de retenção de água, oferece boa aeração (alta percentagem de macroporos), drenagem rápida e eficiente. Apresenta valor de pH próximo à neutralidade (Kämpf, 2000).

O Plantmax[®], um substrato comercial bastante utilizado, é composto de cascas processadas e vermiculita. Possui em torno de 33% de matéria orgânica, apresenta 79% de porosidade total, que fornece boa capacidade de retenção de água e aeração (Mendonça *et al.*, 2003).

2.2.3 Adubação foliar

A aplicação de nutrientes via foliar pode ser realizada como forma de superar algumas dificuldades existentes na produção de mudas em substratos. Quando se utilizam bandejas, o desenvolvimento vegetativo e a qualidade dos porta-enxertos são influenciados pelo volume do substrato colocado em cada célula da bandeja ou tubete (Spomer, 1982¹; Souza, 1983²), citados por Almeida *et al.*, (1999). São José *et al.* (1994) afirmaram que quando os porta-enxertos são produzidos nestes recipientes, são necessárias regas periódicas com nutrientes para possibilitar o bom crescimento. Os autores citaram que a necessidade de suplementação nutricional ocorre devido à quantidade reduzida de substrato que comporta a bandeja de isopor ou tubetes e a intensa lixiviação de nutrientes provocadas pelas irrigações freqüentes.

Quando há disponibilidade de um substrato com boas propriedades físicas, mas com deficiência em alguns nutrientes, a aplicação de adubo foliar pode ser realizada para melhorar a qualidade da planta durante a fase de aclimação (Mortvedt, 1994). Este fato foi confirmado por Mohamed *et al.* (1995), que trabalharam com laranjeira em substrato com pouca disponibilidade de micronutrientes e verificaram maior crescimento, absorção e translocação de nutrientes em plantas que receberam aplicação foliar de sulfato de manganês ou Mn, Fe e Zn do que as plantas controle.

¹ SPOMER, L.A. The effect of container soil volume on plant growth. *HortScience*. Alexandria, v.17, n.4, p.680-681, 1982.

² SOUZA, M. Nutrição e adubação para produzir mudas frutíferas. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 9, n. 102, p. 40-43, 1983.

Para que a adubação foliar seja eficiente alguns fatores devem ser observados, por influenciarem a velocidade de absorção dos elementos aplicados nas folhas. O ângulo de contato é um fator importante, uma vez que, para ocorrer a penetração do elemento é necessário que a superfície foliar seja molhada. Para que ocorra maior absorção dos nutrientes a aplicação de adubo foliar deve ser realizada quando a umidade atmosférica é mais alta, como ocorre pela manhã. Além disso, a composição da solução pode influenciar na absorção. A uréia, por exemplo, pode aumentar a absorção de íons como o Fe, Zn e P. (Malavolta, 1980). Segundo o autor, a aplicação de adubo foliar pode ser realizada para suprir os nutrientes exigidos em pequenas proporções, como única fonte destes nutrientes. Entretanto, os macronutrientes, por serem exigidos em grandes quantidades, devem ser utilizados somente como complemento da adubação feita no solo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Micropropagação e Casa-de-Vegetação do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná – UFPR, no período de junho de 2002 a dezembro de 2003.

3.1 FONTE DO MATERIAL VEGETAL

O porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' foi proveniente da EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Unidade Transferência de Tecnologia de Canoinhas – SC, sendo oriundo de plantas matrizes livres de vírus, que foram indexadas para os vírus ACLSV, APMV, ASPV e SED.

O material inicial constituiu-se de brotações em fase de multiplicação sem raízes com uma repicagem, que estavam em frascos de vidro.

3.2 MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

O meio de cultura utilizado para a multiplicação do material vegetal foi o MS (Murashige e Skoog, 1962), com a concentração de sais reduzida a 2/3 do total, 3% de sacarose e 0,6% de ágar Vetec[®], suplementado com 2,2µM de BAP. Os explantes foram repicados a cada 30 dias, até a obtenção da quantidade suficiente para a instalação do experimento, totalizando seis repicagens.

Após esse período as brotações foram transferidas para meio de cultura de enraizamento MS (Murashige e Skoog, 1962), com a concentração de sais reduzida à metade, suplementado com 1µM de AIB, sendo que uma parte das brotações permaneceu por 10 dias e outra parte permaneceu por 30 dias no meio de cultura, para posterior instalação do experimento testando dois tempos de permanência no meio de enraizamento. As brotações foram conduzidas de forma a ficarem preparadas ao mesmo tempo.

Preliminarmente foram realizados testes com o tipo e a concentração do regulador de crescimento no enraizamento das brotações, indicando que o AIB na concentração de 1µM produziu mais de três raízes sem formação de calo, razão pela qual foi feita opção por esta concentração do regulador.

A instalação do experimento no laboratório foi realizada nos dias 8 e 28 de junho de 2003, para que as plantas permanecessem por 30 dias e 10 dias no meio de enraizamento,

respectivamente. O material vegetal foi conduzido em frascos de vidro com 30 mL de meio de cultura onde foram desenvolvidos cinco explantes. Após a adição do meio de cultura, os frascos foram fechados com papel alumínio, identificados e autoclavados a 121°C durante 20 minutos.

Os ensaios foram instalados em sala asséptica, utilizando-se câmara de fluxo laminar. O material foi mantido em sala de crescimento sob temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossinteticamente ativa em torno de $60\mu\text{Mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ utilizando-se seis lâmpadas fluorescentes de 40w do tipo branca fria (General Electric Universal Duramax), por bancada revestida com isopor.

3.3 EXPERIMENTO DE ENRAIZAMENTO E ACLIMATAÇÃO

No dia 8 de julho as plantas foram transferidas para casa-de-vegetação, sendo repicadas para tubetes com 3cm de diâmetro, 12cm de altura e 50cm^3 de volume, em bandejas alveoladas de isopor com 96 orifícios, onde permaneceram por 40 dias em nebulização intermitente e 45 dias sem nebulização, sendo irrigadas com regador manual em torno de três vezes por semana ou quando houvesse necessidade. Foram testadas formas de aclimatar de acordo com três fatores:

a) Fator A: Efeito do tempo de permanência no meio de enraizamento na aclimatação das mudas

1- Permanência por 10 dias em meio de cultura MS/2 (MS, com a concentração de sais reduzida pela metade), suplementado com $1\mu\text{M}$ de AIB.

2- Permanência por 30 dias em meio de cultura MS/2, suplementado com $1\mu\text{M}$ de AIB.

b) Fator B: Efeito da composição de substratos na aclimatação das mudas

1) Plantmax®

2) Plantmax®(3/4) + Casca de arroz carbonizada (1/4)

3) Plantmax®(1/2) + Casca de arroz carbonizada (1/2)

4) Plantmax®(1/4) + Casca de arroz carbonizada (3/4)

5) Casca de arroz carbonizada

A análise química dos substratos está apresentada na Tabela 1.

TABELA 1 - Análise química dos substratos - 1) Plantmax[®], 2) Plantmax[®](3/4) + Casca de arroz carbonizada (1/4), 3) Plantmax[®](1/2) + Casca de arroz carbonizada (1/2), 4) Plantmax[®] (1/4) + Casca de arroz carbonizada (3/4), 5) Casca de arroz carbonizada

Substrato	PH	H	Ca ⁺²	Ca ⁺²	K ⁺	T	P	C	pH	V
	CaCl ₂	+	+				mg/d ³	g/dm ³	SMP	%
		Al	Mg ²							
1	5,1	4,6	19,85	13,10	1,65	26,10	620,8	123,5	6,10	82,38
2	5,4	3,8	14,69	9,80	1,29	19,78	492,8	82,8	6,30	80,79
3	5,5	3,5	11,62	7,55	1,09	16,21	451,2	55,8	6,40	78,41
4	5,6	3,0	6,97	4,50	0,92	10,89	380,8	31,7	6,70	72,46
5	5,7	2,5	1,51	0,73	0,57	4,58	252,8	12,4	6,90	45,41

A quantidade de Al₃ foi igual a zero para os substratos analisados.

c) Fator C: Efeito da adubação foliar na aclimação das mudas

Foram feitos tratamentos com e sem adubação foliar, com pulverizador manual. Foi utilizado adubo foliar contendo micronutrientes Boutin Envy Micros[®] (B=0,36%; Co=0,009%; Cu=0,9%; Zn=0,9%; Fe=1,8%; Mn=0,9%; Mo=0,0009%), aplicado na dose de 2mL.L⁻¹, e uréia diluída a 12g.L⁻¹ sendo que a partir desta solução foi aplicada na dose de 2mL.L⁻¹. As aplicações foram realizadas na primeira, terceira e quinta semanas, totalizando três aplicações após a transferência das plantas para o lado sem nebulização da casa-de-vegetação.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso em arranjo fatorial de três fatores (2x5x2):

A) dois tempos de permanência no meio de enraizamento: 10 dias e 30 dias;

B) cinco substratos: 1) Plantmax[®], 2) Plantmax[®](3/4) + Casca de arroz carbonizada (1/4), 3) Plantmax[®](1/2) + Casca de arroz carbonizada (1/2), 4) Plantmax[®] (1/4) + Casca de arroz carbonizada (3/4), 5) Casca de arroz carbonizada;

C) duas adubações foliares: com e sem adubação foliar, com 4 repetições e 8 plantas por unidade experimental, totalizando 640 plantas.

As variâncias dos tratamentos foram testadas quanto a sua homogeneidade pelo teste de Bartlett. As variáveis cujas variâncias se mostraram homogêneas foram submetidas à análise de variância pelo teste F, e então, suas médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Aos 40 dias em nebulização intermitente, as plantas foram transferidas para o lado da casa-de-vegetação sem nebulização, onde permaneceram por 45 dias, até a primeira

avaliação, que ocorreu nos dias 3 e 4 de outubro de 2003. Foram avaliadas as seguintes variáveis: número de folhas, comprimento do caule (da base até a inserção da última folha), número de raízes primárias, comprimento de raízes e nota para desenvolvimento do caule e das raízes (foram atribuídas notas de 1 a 4, sendo nota 1 para o menor desenvolvimento e nota 4 o maior desenvolvimento (Figura 1).



FIGURA 1 - Critério de avaliação para desenvolvimento do sistema caulinar e radicial do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido', após a avaliação realizada em casa-de-vegetação, com notas de 1 a 4, em ordem decrescente.

3.4 EXPERIMENTO COM AS MUDAS DE MACIEIRA EM EMBALAGEM DE POLIETILENO

Após as avaliações do primeiro experimento, nos dias 3 e 4 de outubro de 2003, as plantas foram transferidas para embalagens de polietileno com 10cm de largura, 15cm de altura e 1178cm³ de volume (aproximadamente 1L), contendo três diferentes substratos: 1) Plantmax[®], 2) Plantmax[®](1/2) + Casca de arroz carbonizada (1/2), 3) Plantmax[®](3/4) + Casca de arroz carbonizada (1/4). Foi feita uma seleção entre as plantas do primeiro experimento de modo a se obter plantas homogêneas para realização deste experimento. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso com quatro repetições e 20 plantas por unidade experimental, totalizando 240 plantas. As variâncias dos tratamentos foram testadas quanto a sua homogeneidade pelo teste de Bartlett. As variáveis cujas

variâncias se mostraram homogêneas foram submetidas à análise de variância pelo teste F, e então, suas médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Nos dias 29, 30 e 31 de dezembro de 2003 foi realizada a avaliação das seguintes variáveis: número de folhas, comprimento de caule, número e comprimento de raízes, massa fresca e sobrevivência das plantas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXPERIMENTO DE ENRAIZAMENTO E ACLIMATAÇÃO

Na apresentação dos resultados e discussão as variáveis analisadas foram agrupadas em número de folhas, comprimento de caule e nota para desenvolvimento de caule; número, comprimento e nota para desenvolvimento de raízes; e sobrevivência das plantas de macieira. Os resultados estatísticos apresentados foram da análise de variância e do teste de Tukey para comparação de médias.

4.1.1 Número de folhas, Comprimento de caule e Nota para desenvolvimento de caule

Os resultados da análise de variância para número de folhas, comprimento de caule e nota para desenvolvimento de caule são apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 - Resultados da análise de variância para o número de folhas, comprimento de caule e nota para desenvolvimento de caule do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos 85 dias em casa-de-vegetação.

Fator de variação	G.L	QUADRADO MÉDIO		
		Número de folhas	Comprimento de caule	Nota para desenvolvimento de caule
TPME	1	18,050**	2,312**	5,000**
S	4	6,195*	0,037 ^{ns}	2,046**
TPME x S	4	1,068 ^{ns}	0,118 ^{ns}	0,144 ^{ns}
A	1	9,385*	0,264*	0,264 ^{ns}
TPME x A	1	0,145 ^{ns}	0,013 ^{ns}	0,002 ^{ns}
S x A	4	2,177 ^{ns}	0,025 ^{ns}	0,108 ^{ns}
TPME x S x A	4	1,919 ^{ns}	0,052 ^{ns}	0,033 ^{ns}
Erro	60	1,794	0,063	0,153
Coefficiente de Variação(%)		14,87	16,05	18,26
Teste de Bartlett		0,82 ^{ns}	0,81 ^{ns}	0,26 ^{ns}

^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade

* significativo ao nível de 5% de probabilidade

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

(TPME - Tempo de permanência no meio de enraizamento; S - Substratos; TPME x S - Tempo de permanência no meio de enraizamento x Substratos; A - Adubação; TPME x A - Tempo de permanência no meio de enraizamento x Adubação; S x A - Substratos x Adubação; TPME x S x A - Tempo de permanência no meio de enraizamento x Substratos x Adubação)

A análise de variância mostrou que não houve interação entre nenhum dos fatores analisados, indicando que os fatores são independentes (Tabela 2). Pode-se observar na Tabela 3 que a permanência por 30 dias no meio de enraizamento promoveu os melhores resultados. Foi observada diferença estatística significativa para número de folhas e nota

para desenvolvimento do caule nos diferentes substratos (Tabela 4). O substrato 3 (1/2 Plantmax[®] + 1/2 C.A.C.) promoveu maior número de folhas, não diferindo dos substratos 1 (Plantmax[®]), 2 (3/4 Plantmax[®] + 1/4 C.A.C.) e 4 (1/4 Plantmax[®] + 3/4 C.A.C.). O substrato 5 (C.A.C.) apresentou o menor número de folhas, diferindo somente do substrato 3 (1/2 Plantmax[®] + 1/2 C.A.C.).

Para a variável nota para desenvolvimento do caule, os substratos 2 (3/4 Plantmax[®] + 1/4 C.A.C) e 3 (1/2 Plantmax[®] + 1/2 C.A.C) mostraram os melhores resultados, seguidos pelos substratos 1(Plantmax[®]) e 4 (1/4 Plantmax[®] + 3/4 C.A.C), que não diferiram significativamente. O substrato 5 (C.A.C.) apresentou a menor nota para desenvolvimento de caule.

O comprimento de caule não foi influenciado pelos diferentes substratos utilizados (Tabela 4).

TABELA 3 - Resultados da avaliação do número de folhas, comprimento do caule e nota para desenvolvimento do caule do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos 85 dias em casa-de-vegetação, em diferentes tempos de permanência no meio de enraizamento.

TRATAMENTOS	NÚMERO DE FOLHAS	COMPRIMENTO DO CAULE (cm)	NOTA PARA DESENVOLVIMENTO DO CAULE
10 dias	8,53 B	1,39 B	1,80 B
30 dias	9,48 A	1,73 A	2,30 A
Média Geral	9,00	1,56	2,05

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

TABELA 4 - Resultados da avaliação do número de folhas, comprimento do caule e nota para desenvolvimento do caule do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos 85 dias em casa-de-vegetação, em diferentes substratos.

TRATAMENTOS	NÚMERO DE FOLHAS	COMPRIMENTO DO CAULE (cm)	NOTA PARA DESENVOLVIMENTO DO CAULE
1) Plantmax [®]	8,85 AB	1,58 A	2,04 B
2) 3/4 Plantmax [®] +1/4 C.A.C.	9,36 AB	1,50 A	2,51 A
3) 1/2 Plantmax [®] +1/2 C.A.C.	9,87 A	1,63 A	2,46 A
4) 1/4 Plantmax [®] +3/4 C.A.C.	8,67 AB	1,57 A	2,04 B
5) C.A.C.	8,27 B	1,54 A	1,64 C
Média Geral	9,00	1,56	2,14

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

A aplicação de adubo foliar resultou em maior número de folhas e maior comprimento de caule e não interferiu na nota para desenvolvimento do caule (Tabela 5).

TABELA 5 - Resultados da avaliação do número de folhas e comprimento do caule do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos 85 dias em casa-de-vegetação, com e sem adubação foliar.

TRATAMENTOS	NÚMERO DE FOLHAS	COMPRIMENTO DO CAULE (cm)	NOTA PARA DESENVOLVIMENTO DO CAULE
Com adubação	9,34 A	1,62 A	2,20 A
Sem adubação	8,66 B	1,50 B	2,00 A
Média Geral	9,56	1,56	2,10

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

Como as plantas que permaneceram mais tempo no meio de enraizamento se desenvolveram melhor após a aclimação (Tabela 3), pode-se observar a importância da formação de raízes *in vitro*. Estas são responsáveis pela absorção de água e nutrientes do substrato, então, as plantas retiradas do frasco com raízes formadas, têm maior capacidade de crescer e se desenvolver do que as plantas que ainda não formaram raízes. Resultados semelhantes foram obtidos por Pereira e Fortes (2001) que estudaram a micropropagação de porta-enxertos de macieira, e encontraram melhores resultados de tamanho do caule, além de plantas com mais vigor, quanto maior o tempo de permanência (30 dias) em meio de enraizamento. Resultados positivos com aumento do tempo de permanência no meio de enraizamento são obtidos até certo ponto, a partir do qual, o desenvolvimento da planta começa a diminuir. Este fato foi observado por Bosa *et al.* (2003), que trabalharam com enraizamento de gipsofila aos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias no meio de enraizamento e observaram maior acúmulo de biomassa aos 28 dias, pelo ajuste na equação de regressão, a partir dos quais começam a reduzir matéria e reservas de energia.

Quanto aos resultados obtidos neste trabalho para os substratos (Tabela 4), pode-se observar que as misturas de substratos se destacaram quando comparadas com a utilização de um substrato único. Maciel *et al.* (2000), também observaram esta vantagem quando trabalharam com aclimação de plantas de violeta obtidas *in vitro* e encontraram maiores ganhos em biomassa com a mistura de substratos (terra, composto orgânico, casca da arroz carbonizada e areia), e afirmaram que este resultado ocorreu certamente por melhorarem as características físicas, químicas e biológicas, superando assim, os resultados com a utilização de cada substrato separado.

Schmitz *et al.* (2002), estudaram as propriedades químicas e físicas de vários substratos, e concluíram que a casca de arroz carbonizada pode ser considerada um bom condicionador de substrato. Os autores encontraram valores de salinidade abaixo da faixa ideal para o cultivo de plantas em recipientes, com fornecimento esporádico de nutrientes. Verificou-se baixa retenção de água, baixa densidade e pequena quantidade de carbono, entretanto o volume de ar é superior ao considerado ideal. Dessa forma, seu uso fica

limitado como substrato único, contudo, é uma boa opção na melhoria do volume de ar dos substratos.

Para a variável comprimento de caule (Tabela 4), os resultados deste trabalho foram semelhantes aos obtidos por Schiavo e Martins (2003), que testaram diferentes substratos para produção de mudas de acácia, e não obtiveram diferenças significativas quando utilizaram diferentes substratos.

Com relação à aplicação de adubo foliar (Tabela 5), o maior suprimento de nutrientes às plantas que receberam adubo foliar pode explicar porque o número de folhas e o comprimento de caule apresentaram melhores resultados. Resultados semelhantes foram obtidos por Alphonse e Saad (2000) que trabalharam com plantas de pepino em casa-de-vegetação pulverizadas com Fe, Mn e B e verificaram maior incremento em altura nestas do que nas plantas controle, e a aplicação de Mn e Zn promoveu biomassa total maior do que aquelas pulverizadas com B. Entretanto, o mesmo não foi verificado por Neto *et al.* (1999), trabalhando com produção de mudas de cafeeiro, onde a adubação foliar com micronutrientes e uréia não teve efeito, quanto ao incremento em altura, somente para biomassa seca do caule. Os autores encontraram esses resultados porque os substratos utilizados no trabalho possuíam quantidade suficiente de nutrientes para suprir a necessidade das plantas.

4.1.2 Número, comprimento e nota para desenvolvimento de raízes

Os resultados da análise de variância para número, comprimento e nota para desenvolvimento de raízes são apresentados na Tabela 6.

TABELA 6 - Resultados da análise de variância para número, comprimento e nota para desenvolvimento de raízes do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos 85 dias em casa-de-vegetação.

Fator de variação	G.L.	QUADRADO MÉDIO		
		Número de raízes	Comprimento de raízes	Nota para desenvolvimento de raízes
TPME	1	4,950**	10,878*	5,304**
S	4	0,719*	3,107 ^{ns}	2,618**
TPME x S	4	0,144 ^{ns}	5,357*	0,198 ^{ns}
A	1	0,190 ^{ns}	0,946 ^{ns}	0,313 ^{ns}
TPME x A	1	0,003 ^{ns}	0,231 ^{ns}	0,841 ^{ns}
S x A	4	0,44 ^{ns}	1,953 ^{ns}	0,056 ^{ns}
TPME x S x A	4	0,205 ^{ns}	0,401 ^{ns}	0,028 ^{ns}
Erro	60	0,273	1,743	0,246
Coeficiente de Variação (%)		17,58	10,25	17,29
Teste de Bartlett		0,06 ^{ns}	0,54 ^{ns}	0,23 ^{ns}

^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade

* significativo ao nível de 5% de probabilidade

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

(TPME - Tempo de permanência no meio de enraizamento; S - Substratos; TPME x S - Tempo de permanência no meio de enraizamento x Substratos; A - Adubação; TPME x A - Tempo de permanência no meio de enraizamento x Adubação; S x A - Substratos x Adubação; TPME x S x A - Tempo de permanência no meio de enraizamento x Substratos x Adubação)

A análise de variância mostrou que houve interação somente para comprimento de raízes entre tempo de permanência no meio de enraizamento e substratos (Tabela 6). A aplicação de adubo foliar foi independente para esta variável. Para número de raízes e nota para desenvolvimento de raízes não houve interação entre os fatores, indicando que estes são independentes.

Na Tabela 7 pode-se observar que as plantas que permaneceram 30 dias no meio de enraizamento não apresentaram diferença estatística para comprimento de raízes, independente do substrato utilizado. Porém, o substrato 5 (C.A.C.) apresentou menor resultado para comprimento de raízes para as plantas permaneceram por 10 dias no meio de enraizamento.

O melhor tempo de permanência no meio de enraizamento para número de raízes e nota para desenvolvimento de raízes foi de 30 dias (Tabela 8). Para número de raízes, o melhor resultado obtido foi com o substrato 2 (3/4 Plantmax[®] + 1/4 C.A.C.), em comparação ao substrato 5 (C.A.C.), sendo que estes não diferiram dos demais (Tabela 9). Os tratamentos que proporcionaram melhor desenvolvimento de raízes foram os substratos 2) 3/4 Plantmax[®] + 1/4 C.A.C.), 3) 1/2 Plantmax[®] + 1/2 C.A.C. e 4) 1/4 Plantmax[®] + 3/4 C.A.C. A aplicação de adubo foliar não interferiu nenhuma destas variáveis (Tabela 10).

TABELA 7 - Resultados da avaliação do comprimento de raízes (cm) do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos 85 dias em casa-de-vegetação, na interação entre tempo de permanência no meio de enraizamento e substratos.

SUBSTRATOS	TEMPO DE PERMANÊNCIA NO MEIO DE ENRAIZAMENTO	
	10 dias	30 dias
1) Plantmax [®]	12,45 A	12,51 A
2) 3/4 Plantmax [®] + 1/4 C.A.C.	13,05 A	13,51 A
3) 1/2 Plantmax [®] + 1/2 C.A.C.	13,44 A	13,10 A
4) 1/4 Plantmax [®] + 3/4 C.A.C.	12,61 A	13,46 A
5) C.A.C.	11,02 B	13,58 A
Média Geral	12,51	13,32

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

TABELA 8 - Resultados da avaliação do número e nota para desenvolvimento de raízes do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos 85 dias em casa-de-vegetação, em diferentes tempos de permanência no meio de enraizamento.

TRATAMENTO	NÚMERO DE RAÍZES	NOTA PARA DESENVOLVIMENTO DE RAÍZES
10 dias	2,72 B	2,61 B
30 dias	3,22 A	3,12 A
Média Geral	2,97	2,80

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

TABELA 9 - Resultados da avaliação do número de raízes e nota para desenvolvimento de raízes do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos 85 dias casa-de-vegetação, em diferentes em diferentes substratos.

TRATAMENTOS	NÚMERO DE RAÍZES	NOTA PARA DESENVOLVIMENTO DE RAÍZES
1) Plantmax [®]	2,83 AB	2,76 B
2) 3/4 Plantmax [®] +1/4 C.A.C.	3,25 A	3,26 A
3) 1/2 Plantmax [®] +1/2 C.A.C.	3,06 AB	3,11 AB
4) 1/4 Plantmax [®] +3/4 C.A.C.	3,00 AB	2,95 AB
5) C.A.C	2,70 B	2,22 C
Média Geral	2,96	2,85

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

TABELA 10 - Resultados da avaliação do número, comprimento (cm) de raízes e nota para desenvolvimento de raízes do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos 85 dias em casa-de-vegetação, com e sem adubação foliar.

TRATAMENTOS	NÚMERO DE RAÍZES	COMPRIMENTO DE RAÍZES	NOTA PARA DESENVOLVIMENTO DE RAÍZES
Com adubação	2,90 A	12,77 A	2,93 A
Sem adubação	3,00 A	12,99 A	2,80 A
Média Geral	2,95	12,88	2,86

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

Verificou-se que, para comprimento de raízes houve interação entre substratos e tempo de permanência no meio de enraizamento (Tabela 7). Quando as plantas permaneceram por 10 dias no meio de enraizamento, o substrato C.A.C. resultou em menor comprimento de raízes. No entanto, quando as plantas permaneceram por 30 dias no meio de enraizamento, o substrato não interferiu, resultando em mesmo comprimento de raízes. As plantas que ainda não tinham formado raízes tiveram maior dificuldade de se desenvolver em um substrato com menor disponibilidade de nutrientes, do que aquelas que estavam com raízes já formadas e, portanto em melhores condições de explorar o substrato. Dessa forma, pode-se observar que se raízes estiverem formadas, a planta consegue se desenvolver melhor, buscando explorar os nutrientes do substrato.

Os melhores resultados obtidos no tempo de 30 dias no meio de enraizamento para número e nota para desenvolvimento radicial (Tabela 8) podem ser explicados pelo fato de que as plantas já produziram raízes *in vitro*, então, elas teriam vantagem sobre aquelas que foram retiradas do frasco com raízes começando a se formar. Estes resultados estão de acordo com Pereira e Fortes (2001) que encontraram maior tamanho do sistema radicial de porta-enxertos de macieira, no tempo de 30 dias no meio de enraizamento, sendo este, o maior tempo de permanência utilizado no trabalho. Carvalho *et al.* (1999), trabalhando com aclimação de mudas de cafeeiro, também concluíram que a formação de raízes *in vitro* contribui para o desenvolvimento do sistema radicial. Hoffmann *et al.* (1999) afirmaram que uma boa condição de enraizamento e desenvolvimento da muda *in vitro* tem conseqüências sobre o crescimento da muda durante a aclimação. Os autores trabalharam com enraizamento e aclimação do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' e observaram maior comprimento e número de raízes, em plantas que já estavam melhor desenvolvidas *in vitro* do que aquelas que estavam com raízes pouco desenvolvidas na passagem para condições *ex vitro*. Apesar da obtenção de melhores resultados com enraizamento *in vitro* neste trabalho, alguns autores discutem a qualidade das raízes formadas em meio solidificado com ágar, pois a regeneração de raízes diretamente no substrato tende a produzir um sistema radicial completo e funcional, com maior número de raízes secundárias e maior formação de pêlos, sem a formação intermediária de calos, que dificulta a conexão do sistema vascular entre caule e raiz (Grattapaglia e Machado, 1998; Hoffmann *et al.*, 1999).

Um dos fatores que pode ter contribuído para os bons resultados do enraizamento *in vitro* observado neste trabalho pode estar relacionado à auxina utilizada para promover a formação de raízes, o AIB, que proporciona enraizamento sem formação de calo na concentração de 1 μ M. Este fato foi observado em ensaios preliminares, onde se testou AIB

e ANA no enraizamento das brotações e verificou-se que a utilização de ANA no meio de cultura promoveu a formação de calos, enquanto que a adição de AIB ao meio formou somente raízes.

Apesar da qualidade das raízes formadas em meio geleificado com ágar ser questionada por alguns autores, pode-se obter bons resultados com a utilização do mesmo, como ocorreu com Afonso *et al.* (2002). Os autores testaram diferentes substratos no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto Marubakaido, sendo eles: ágar, ágar + vermiculita, ágar + Plantmax[®], vermiculita e Plantmax[®], acrescidos de 3/4 de solução do meio MS (Murashige e Skoog, 1962), e encontraram bons resultados com a utilização de ágar, entretanto, não diferindo da vermiculita na maioria das variáveis analisadas.

O objetivo da realização de diversos trabalhos buscando novas alternativas, substituindo o ágar ou eliminando a fase de enraizamento *in vitro*, é baixar o custo de produção, uma vez que o ágar é o componente de custo mais alto do meio de cultura. Como os resultados deste trabalho mostraram a importância da formação de raízes antes da transferência para a casa-de-vegetação, é fundamental o desenvolvimento de protocolos alternativos para o enraizamento das mudas, pois a substituição da fase de enraizamento *in vitro* pelo enraizamento *ex vitro*, poderia formar plantas pouco desenvolvidas. Este fato foi observado em ensaios preliminares, onde se testou o enraizamento *ex vitro* e pode-se observar que a sobrevivência das plantas foi de 10%, tornando inviável o método nas condições em que o trabalho foi realizado. Contudo, alguns trabalhos de enraizamento *ex vitro* estão sendo realizados com sucesso. Pedrotti e Voltolini (2001) desenvolveram um protocolo para enraizamento *ex vitro* do porta-enxerto de macieira M.9 com obtenção de até 95% de sobrevivência. Os autores utilizaram bandejas de isopor com 50 mL de substrato composto por casca de arroz carbonizada e vermiculita média 1:1 (v:v). As bandejas foram colocadas dentro de caixas plásticas com uma lâmina de água de 5 mm, para manter elevada a umidade relativa do ar. As caixas foram cobertas com uma lâmina de vidro. As plantas permaneceram por 30 dias com temperatura em torno de 27°C e fotoperíodo de 16 horas. Essa metodologia permitiu altos índices de sobrevivência, mostrando que as condições experimentais podem trazer resultados bastante distintos.

Com relação aos substratos pode-se observar que as misturas se destacaram em relação aos substratos únicos (Tabela 9). Estes resultados estão de acordo com Mendonça *et al.* (2003) que afirmaram que a qualidade físico-química dos substratos teve grande influência no desenvolvimento das mudas de mamoeiro, uma vez que as misturas de substratos apresentaram melhores resultados que os substratos puros. Portanto, para estas variáveis, a qualidade química do substrato sozinha não foi suficiente para obtenção de

melhores resultados, significando que a qualidade física também exerce grande influência. A adição de 1/2 e 1/4 de C.A.C ao Plantmax[®] proporcionou aumento de boas características físicas presentes na casca de arroz carbonizada, citadas por Kämpf, (2000) como: baixa densidade, boa aeração (alta percentagem de macroporos), drenagem rápida e eficiente.

Hoffmann *et al.* (1999) também destacaram a importância da quantidade de macroporos, pois afirmaram que a baixa aeração prejudica o enraizamento, uma vez que, nestas condições, a absorção de água pelas raízes torna-se deficiente. A casca de arroz carbonizada possui alta porosidade (Kämpf, 2000), então, a adição desta ao Plantmax[®], oferece boa qualidade físico-química ao substrato, trazendo como consequência, melhor qualidade da muda produzida.

Uma vez que as misturas de substratos se destacaram, promovendo melhores características entre as variáveis analisadas, a escolha por uma das misturas, deverá ser realizada levando-se em consideração o aspecto econômico. Pode-se observar na Tabela 11, que, entre as misturas, o substrato 4 (1/4 Plantmax[®] +3/4 C.A.C.) apresentou o menor custo. Esta característica é muito importante, pois, baixando-se o custo em todas as etapas de produção de macieira por meio da propagação *in vitro*, esta técnica poderá trazer maior retorno econômico.

O fato de que os resultados obtidos para aplicação de adubo foliar não apresentaram diferenças para variáveis de sistema radicial, foi também observado por Neto *et al.* (1999). Os autores trabalharam com produção de mudas de cafeeiro e realizaram tratamentos com e sem aplicação de uréia e micronutrientes e verificaram que a matéria seca das raízes não apresentou diferenças quando se utilizou adubação foliar. Esse resultado pode ter ocorrido pelo fato que os substratos utilizados possuíam quantidade suficiente de nutrientes para suprir a necessidade das plantas.

TABELA 11 - Custos de produção do substrato para produção de 1000 mudas de macieira, em tubetes.

Descrição	Custo (R\$)
Plantmax [®]	13,75
3/4 Plantmax [®] +1/4 C.A.C.	10,40
1/2 Plantmax [®] +1/2 C.A.C.	7,00
1/4 Plantmax [®] +3/4 C.A.C.	3,75
C.A.C.	0,40

4.1.3 Sobrevivência

Os resultados da análise de variância para sobrevivência das plantas de macieira são apresentados na Tabela 12.

TABELA 12 - Resultados da análise de variância para porcentagem de sobrevivência do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos 85 em casa-de-vegetação.

Fator de variação	G.L.	Sobrevivência
TPME	1	5080.078**
S	4	581.055**
TPME x S	4	280.273 ^{ns}
A	1	95.703 ^{ns}
TPME x A	1	95.703 ^{ns}
S x A	4	32.227 ^{ns}
TPME x S x A	4	12.695 ^{ns}
Erro	60	140.339 ^{ns}
Coeficiente de Variação (%)		6,43
Teste de Bartlett		0,98 ^{ns}

^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade

* significativo ao nível de 5% de probabilidade

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

(TPME - Tempo de permanência no meio de enraizamento; S - Substratos; TPME x S - Tempo de permanência no meio de enraizamento x Substratos; A - Adubação; TPME x A - Tempo de permanência no meio de enraizamento x Adubação; S x A - Substratos x Adubação; TPME x S x A - Tempo de permanência no meio de enraizamento x Substratos x Adubação).

A análise de variância mostrou que não houve interação entre nenhum dos fatores analisados, indicando que os fatores são independentes (Tabela 12). A permanência por 30 dias no meio de enraizamento promoveu maior sobrevivência das plantas (Tabela 13). O melhor substrato para esta variável foi o 4 (1/4 Plantmax[®] +3/4 C.A.C.), (Tabela 14). A aplicação de adubo foliar não afetou a sobrevivência das plantas (Tabela 15).

TABELA 13 - Resultados da avaliação da sobrevivência do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos 85 dias em casa-de-vegetação, em diferentes tempos de permanência no meio de enraizamento.

Tratamento	Sobrevivência (%)
10 dias	77,18 B
30 dias	93,12 A
Média Geral	85,15

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

TABELA 14 - Resultados da avaliação da sobrevivência do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos 85 dias em casa-de-vegetação, em diferentes substratos

Tratamentos	Sobrevivência
1) Plantmax [®]	76,56 B
2) 3/4 Plantmax [®] +1/4 C.A.C	86,72 AB
3) 1/2 Plantmax [®] +1/2 C.A.C.	82,03 AB
4) 1/4 Plantmax [®] +3/4 C.A.C.	92,19 A
5) C.A.C	88,28 AB
Média Geral	85,15

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

TABELA 15 - Resultados da avaliação da sobrevivência do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos 85 dias em casa-de-vegetação, com e sem adubação foliar.

Tratamento	Sobrevivência (%)
Com adubação	86,25 A
Sem adubação	84,06 A
Média Geral	85,15

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

O aumento do tempo no meio de enraizamento trouxe maior sobrevivência para as plantas (Tabela 13), pois estas já haviam formado raízes, enquanto que as plantas que permaneceram 10 dias no meio de enraizamento estavam com as raízes na forma de primórdios, e conforme Grattapaglia e Machado (1998), quando as raízes não estão completamente formadas o sistema caulinar transpira numa taxa muito acima da capacidade de absorção do sistema radicial, e devido a isto, a planta pode desidratar e morrer. Além disso, um pequeno desenvolvimento das plantas micropropagadas gera plantas com baixa sobrevivência durante a aclimação (Tahmatsidou, *et al.* 2002).

Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho foram encontrados por Bosa *et al.* (2003), que trabalharam com enraizamento e aclimação de plantas de gipsofila micropropagadas e verificaram que o período de 30 dias em meio de enraizamento resultou em 98% de sobrevivência, enquanto que 10 dias em meio de enraizamento reduziu a sobrevivência para 90%. Os autores ressaltaram a importância da permanência *in vitro*, devido à formação de raízes, porém afirmaram que este resultado pode ter ocorrido pelo maior acúmulo de carboidratos nos tecidos, conferindo maior resistência às folhas.

A importância da composição do substrato para sobrevivência das plantas foi observada neste trabalho. A menor taxa de sobrevivência foi obtida com o Plantmax[®] (Tabela 14), sendo este menos poroso que os demais. Estes resultados estão de acordo com Maciel *et al.*, (2002) que trabalharam com enraizamento e aclimação do porta-enxerto de macieira Marubakaido. Os autores observaram que aos 30 dias após a transferência *ex vitro*, a percentagem de enraizamento, que coincidiu com a sobrevivência das plantas, foi maior nas mudas que foram aclimatadas em substrato mais poroso, provavelmente devido às suas características físicas. O substrato com menor porosidade e maior retenção de água, pode diminuir o espaço de aeração e, por conseguinte, a percentagem de enraizamento e sobrevivência. Fernandez *et al.* (2002) afirmaram que a alta capacidade de retenção de água pode proporcionar deficiência de oxigênio, dificultando a absorção de água e nutrientes. Os autores ressaltaram que o substrato deve guardar proporção

adequada de macro e microporos, favorecendo assim, a atividade fisiológica das raízes e conseqüentemente, o desenvolvimento das plantas.

Uma vez que não houve diferença para sobrevivência com e sem adubação foliar (Tabela 15), pode-se afirmar que a quantidade de nutrientes do substrato, para as condições deste trabalho, não foi limitante e a concentração de adubo foliar aplicada não foi excessiva, a ponto de causar a mortalidade das plantas, sendo que, concentrações muito elevadas podem causar queima das folhas (Camargo e Silva, 1975).

4.2 EXPERIMENTO COM AS MUDAS DE MACIEIRA COLOCADAS EM EMBALAGENS DE POLIETILENO

Na apresentação dos resultados e discussão as variáveis analisadas foram agrupadas em número de folhas e comprimento de caule; número e comprimento de raízes; e massa fresca e sobrevivência. Os resultados estatísticos apresentados foram da análise de variância e do Teste de Tukey para comparação de médias.

4.2.1 Número de folhas e Comprimento de caule

Os resultados da análise de variância para número de folhas e comprimento de caule são apresentados na Tabela 16.

TABELA 16 - Resultados da análise de variância para número de folhas e comprimento de caule do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos seis meses em casa-de-vegetação.

Fator de variação	G.L.	QUADRADO MÉDIO	
		Número de folhas	Comprimento de caule
Substratos	2	11,069**	11,465**
Erro	9	0,807	0,526
Total	11		
Coefficiente de Variação (%)		4,30	6,06
Teste de Bartelett		0,16 ^{ns}	0,88 ^{ns}

** significativo ao nível de 1% de probabilidade

A análise de variância mostrou que os substratos foram diferentes estatisticamente diferentes para número de folhas e comprimento de caule. Os substratos 1(Plantmax[®]) e 3 (1/2 Plantmax[®] +1/2 C.A.C.) apresentaram os melhores resultados para estas variáveis (Tabela 17).

TABELA 17 - Resultado da avaliação do número de folhas, comprimento de caule e massa fresca do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos seis meses em casa-de-vegetação, em diferentes substratos.

TRATAMENTOS	NÚMERO DE FOLHAS	COMPRIMENTO DE CAULE (cm)
1) Plantmax [®]	21,61 A	12,50 A
2) 3/4 Plantmax [®] +1/4 C.A.C.	18,98 B	10,07 B
3) 1/2 Plantmax [®] +1/2 C.A.C.	22,05 A	13,34 A
Média Geral	20,88	11,97

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

Pode-se observar que o substrato 3(1/2 Plantmax[®] +1/2 C.A.C.) que proporcionou maior número de folhas e maior comprimento de caule no primeiro experimento também apresentou esta característica no segundo experimento, apesar de não ter diferido do substrato 1(Plantmax[®]) (Tabela 17). Neste caso, deve-se levar em consideração o aspecto econômico e destacar vantagem da mistura de 1/2 Plantmax[®] +1/2 C.A.C que apresentou menor custo em relação ao Plantmax[®] sozinho (Tabela 11).

Neste experimento foi observado crescimento do número de folhas e do comprimento de caule (Figuras 2 e 3), portanto, a transferência das plantas para recipientes de maior volume mostrou a retomada de crescimento das plantas (Figuras 4 e 5). A importância do volume do recipiente foi destacada em alguns trabalhos. Mendonça *et al.* (2003), concluíram que, entre os recipientes com diferentes volumes utilizados (750mL, 70mL e 50mL) para produção de mudas de mamoeiro, o grande responsável pelo melhor desenvolvimento das mudas de mamoeiro, foi aquele de maior volume. Melo *et al.* (2002), trabalharam com diferentes tamanhos de recipientes (15x23cm e 23x35cm) para formação de porta-enxerto de gravioleira e observaram incremento no comprimento e diâmetro do caule, número de folhas e área foliar quando utilizaram recipientes com volume maior volume. Os autores ressaltaram a importância do maior desenvolvimento das plantas, pois afirmaram que estas demonstram maior vigor vegetativo e maior capacidade fotossintética, que deve contribuir para formação de pomares mais uniformes e produtivos.

Na primeira avaliação a média geral foi de 9 folhas e 1,56cm de caule (Tabela 3), enquanto que na segunda avaliação as plantas atingiram 20,88 folhas e 11,88cm de caule (Tabela 17) em média, observando-se uma parada de crescimento durante a aclimação de macieira também verificada por Ribas (1991), que determina um atraso na produção das mudas, podendo neste trabalho ser atribuída ao pequeno volume disponível quando as plantas estavam em tubetes. São José *et al.* (1994), detectaram problemas na produção de mudas em tubetes, relacionados ao substrato, cujos nutrientes são reduzidos e/ou esgotados em poucas semanas.

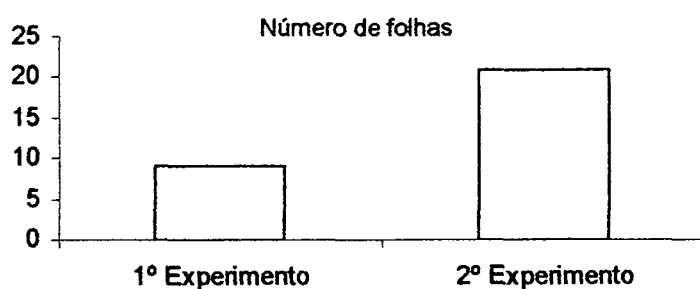


FIGURA 2 - Comparação dos resultados das avaliações do número de folhas do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, no primeiro experimento com as mudas em tubetes de 50cm^3 de volume, e no segundo experimento com as mudas em embalagens de 1178cm^3 de volume, aos 85 dias e aos seis meses em casa-de-vegetação, respectivamente.

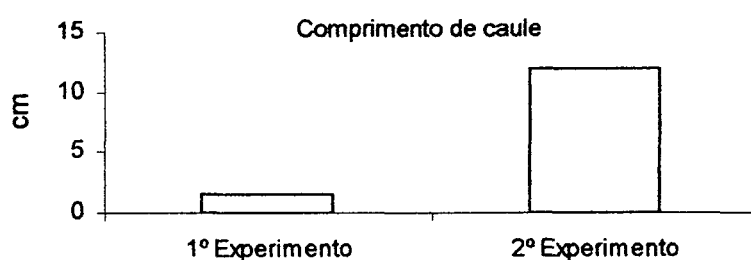


FIGURA 3 - Comparação dos resultados das avaliações de comprimento de caule do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, no primeiro experimento com as mudas em tubetes de 50cm^3 de volume, e no segundo experimento com as mudas em embalagens de 1178cm^3 de volume, aos 85 dias e aos seis meses em casa-de-vegetação, respectivamente.



FIGURA 4 - Porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos 85 dias em casa-de-vegetação, com as mudas em tubetes de 3cm de diâmetro, 12cm de altura e de 50cm³ de volume.



FIGURA 5 - Porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos seis meses em casa-de-vegetação, em embalagens de polietileno de 10cm de largura, 15cm de altura e 1178cm³ de volume.

4.2.2 Número e comprimento de raízes

Os resultados da análise de variância para número comprimento de raízes são apresentados na tabela 18.

TABELA 18 - Resultados da análise de variância para número de raízes do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos seis meses em casa-de-vegetação.

Fator de variação	G.L.	QUADRADO MÉDIO	
		Número de raízes	Comprimento de raízes
Substratos	2	0,013 ^{ns}	2,553 ^{ns}
Erro	9	0,071	11,605
Total	11		
Coeficiente de Variação (%)		8,68	5,46
Teste de Bartlett		0,62 ^{ns}	0,68 ^{ns}

^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade

A análise de variância mostrou que os diferentes substratos não foram estatisticamente diferentes entre si para número e comprimento de raízes. A Tabela 19 mostra o resultado do teste de comparação de médias para estas variáveis.

TABELA 19 - Resultado da avaliação do número e comprimento de raízes do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos seis meses em casa-de-vegetação, em diferentes substratos

TRATAMENTOS	NÚMERO DE RAÍZES	COMPRIMENTO DE RAÍZES (cm)
1) Plantmax [®]	3,00 A	21,30 A
2) 3/4 Plantmax [®] +1/4 C.A.C.	3,06 A	19,79 A
3) 1/2 Plantmax [®] +1/2 C.A.C.	3,14 A	21,24 A
Média Geral	3,06	20,77

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

Verificou-se aumento no número de raízes (de 2,95 para 3,06) e comprimento das raízes, em relação à primeira avaliação, realizada no mês de outubro de 2003, em que a média para comprimento foi de 12,88cm e após a transferência para recipientes de maior volume a média aumentou para 20,77cm (Figuras 6 e 7). Portanto, pode ser observado neste trabalho uma ecodormência, que ocorre quando há ausência de desenvolvimento da gema devido a um fator ambiental, extrínseco à planta, afetando-a como um todo. Neste tipo de dormência, assim que as condições normais de crescimento sejam estabelecidas, um novo fluxo de crescimento se restabelece. Neste caso, todas as condições intrínsecas à gema são favoráveis ao seu crescimento e não há nenhum sinal a longa ou curta distância que a impeça de se desenvolver. Os fatores ambientais que podem influenciar na atividade

do crescimento das plantas são: temperatura, fotoperíodo, qualidade da luz, suprimento de água e condições nutritivas (Lang *et al.*, ³1987, citados por Ribas, 1991).

No presente trabalho, a restrição dos nutrientes que ocorreu nos tubetes, devido ao pequeno volume, pode ter causado a parada de crescimento. Com a transferência das plantas para embalagens de maior volume, houve um grande crescimento, uma vez que as raízes puderam explorar um maior volume de substrato, que beneficiou a planta, promovendo um maior crescimento do sistema radicial. Além disso, a capacidade de absorção de nutrientes aumenta, pois as raízes já estão maiores e mais adaptadas nesta fase, que as plantas estão há seis meses em casa-de-vegetação. Queiroz e Melém Júnior (2001), trabalhando com diferentes tamanhos de recipientes para produção de mudas de açaí, verificaram que os de tamanho pequeno (12x17,5cm) não são apropriados para as mudas da espécie, e os de tamanho médio (17x22cm) e grande (20x27cm) não diferiram entre si. Neste caso os autores recomendaram os recipientes de tamanho médio, que utilizam menos substrato e horas de trabalho e propiciam mudas com o mesmo desenvolvimento que as obtidas com os de tamanho grande. Pelo exposto, verifica-se a importância de se determinar o tamanho adequado do recipiente para obtenção de plantas com qualidade e baixo custo.

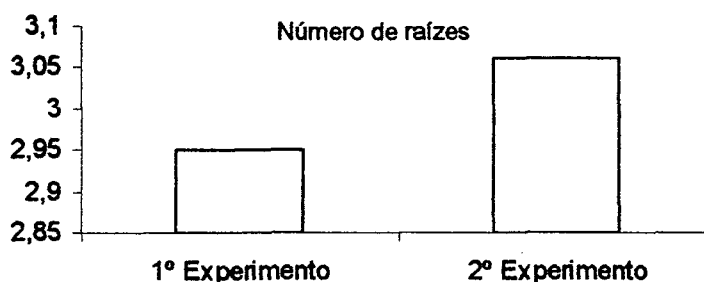


FIGURA 6 - Comparação dos resultados das avaliações do número de raízes do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, no primeiro experimento com as mudas em tubetes de 50cm³ de volume, e no segundo experimento com as mudas em embalagens de 1178cm³ de volume, aos 85 dias e aos seis meses em casa-de-vegetação, respectivamente.

³ LANG, A. G. *et al.* Endo-, para-, and ecodormancy, physiological terminology and classification for dormancy research. *Hortscience*, Alexandria, v.22, n.3, p.371-377, 1987.

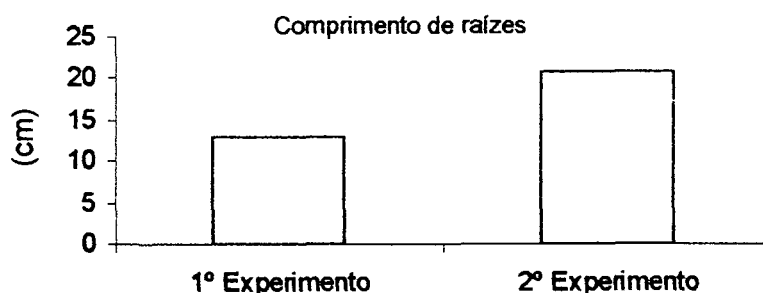


FIGURA 7 - Comparação dos resultados das avaliações de comprimento de raízes do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, no primeiro experimento com as mudas em tubetes de 50cm³ de volume, e no segundo experimento com as mudas em embalagens de 1178cm³ de volume, aos 85 dias e aos seis meses em casa-de-vegetação, respectivamente.

4.2.3 Massa fresca e sobrevivência

Os resultados da análise de variância para massa fresca e sobrevivência são apresentados na Tabela 20.

TABELA 20 - Resultados da análise de variância massa fresca e sobrevivência do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido'

Fator de variação	G.L.	QUADRADO MÉDIO	
		Massa fresca(g)	Sobrevivência(%)
Substratos	2	7,601*	1,000 ^{ns}
Erro	9	1,051	3,55
Total	11		
Coeficiente de Variação (%)		10,35	2,01
Teste de Bartlett		0,19 ^{ns}	0,62 ^{ns}

^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade

* significativo ao nível de 5% de probabilidade

A análise de variância mostrou que os tratamentos foram estatisticamente diferentes para massa fresca e não foram significativos para sobrevivência. A Tabela 21 mostra os testes de Tukey para comparação das médias de massa fresca e sobrevivência. Pode-se observar que a massa fresca foi maior no tratamento 3(1/2 Plantmax[®] +1/2 C.A.C.), que não diferiu do tratamento 1(Plantmax[®]).

TABELA 21 - Resultado da avaliação da massa fresca e sobrevivência do porta enxerto de macieira 'Marubakaido' em diferentes substratos

TRATAMENTO	MASSA FRESCA (g)	SOBREVIVÊNCIA (%)
1) Plantmax [®]	10,33 AB	94,5 A
2) 3/4 Plantmax [®] +1/4 C.A.C.	8,370 B	93,5 A
3) 1/2 Plantmax [®] +1/2 C.A.C.	11,03 A	94,0 A
Média Geral	9,91	94,00

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

É importante ressaltar que a escolha por um dos substratos deve-se basear no custo uma vez que estes não diferiram. Neste caso, a mistura 1/2 Plantmax[®] +1/2 C.A.C. apresenta vantagem.

Observou-se uma alta taxa da sobrevivência das plantas (Tabela 21), maior do que aquela observada no primeiro experimento em que a média foi de 85,15% (Tabela 13). Este fato pode ser atribuído ao estabelecimento das plantas, que estão na casa-de-vegetação há seis meses, portanto, os sistemas radicial e caulinar já se adaptaram às condições *ex vitro*. Conforme Fráguas (2003), com dois meses de aclimação as novas folhas produzidas possuem alguns aspectos anatômicos que podem conferir maior eficiência fotossintética e maior capacidade de regulação hídrica das plantas.

5 CONCLUSÕES

1. A permanência das microestacas do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' no meio de enraizamento até o completo desenvolvimento das raízes, promoveu melhor crescimento das plantas após o transplante, do que aquelas que permaneceram no meio apenas para indução da rizogênese.
2. As diferentes misturas de Pantmax[®] com casca de arroz carbonizada promoveram maior desenvolvimento do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido', sendo a proporção 50%/50% foi a melhor nos dois experimentos.
3. A aplicação de adubo foliar promoveu maior número de folhas e comprimento de caule no porta-enxerto de macieira 'Marubakaido', transplantado em tubetes.
4. O transplante das mudas do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' com crescimento estacionado em tubetes, para embalagens de polietileno, promoveu a retomada do crescimento das plantas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As pesquisas na área de aclimatação de plantas micropropagadas estão se desenvolvendo cada vez mais no sentido de baixar os custos de produção para que novos produtores de mudas possam investir na área. Uma das formas de diminuir esses custos é eliminar a etapa de enraizamento *in vitro*, transferindo a planta diretamente da fase de multiplicação para a casa-de-vegetação. Outra opção seria fazer o enraizamento *in vitro*, porém substituindo o ágar, que possui custo muito elevado, por vermiculita ou outro substrato, por exemplo. Na fase de aclimatação essa redução nos custos pode ser feita utilizando-se condicionadores de substratos de baixo custo.

Nesse sentido é importante que se busque respostas por meio de pesquisas, para encontrar formas alternativas de baixar os custos de produção em todas as fases da micropropagação, uma vez que existem diferentes condições experimentais e diferentes respostas dependendo da espécie ou cultivar, o que irá ocorrer também em produções comerciais.

A influência da dormência no desenvolvimento de mudas de macieira 'Marubakaido' em aclimatação necessita de novos trabalhos de pesquisa, pois não está claro se houve uma parada de crescimento devido somente à ecodormência, pelo pequeno volume do substrato ou se também houve uma endodormência devido ao fotoperíodo. Nesse sentido é importante que se pesquise sobre transferência das mudas de recipientes de pequeno volume para recipientes de maior volume, utilizando tratamento testemunha para que se possa confirmar o fator que causa parada de crescimento.

Nas condições em que o trabalho foi realizado não foi feito controle de temperatura, umidade ou quantidade de radiação, portanto sugere-se para futuras pesquisas estudar esses fatores.

Com relação à adubação foliar seria importante fazer uma análise química foliar antes de pulverizar, para verificar qual a quantidade necessária a ser aplicada e quais nutrientes são deficientes na planta. Essa medida, se realizada juntamente com a análise química do substrato, pode indicar qual a forma mais adequada de fornecimento de nutrientes para as plantas, se via foliar ou via substrato, e qual tem custo mais baixo. Na literatura praticamente não se encontram trabalhos de pesquisa com estudos relacionados à necessidade de nutrientes em plantas na passagem de condições *in vitro* para condições *ex vitro*.

Uma vez que as mudas produzidas por cultura de meristemas não apresentam problemas fitossanitários, pela eliminação de vírus que a técnica permite, promovendo altas taxas de multiplicação, é fundamental que as pesquisas visem o aspecto econômico para que mais produtores tenham interesse em investir no setor.

REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA, P.L.; LOPES, P. S. N.; HOFFMANN, A.; ANTUNES, L. E. C.; RAMOS, F. D. Crescimento de seedlings do limoeiro 'cravo' em resposta a adubações via substrato e foliar. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.2. p. 441- 445, abril/junho, 1999.
2. AFONSO, A. P.; MACHADO, N. P.; FRANZON, R. C.; TIBOLA, C. S.; ROCHA, M. S.; FORTES, G. R. L. Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido em diferentes substratos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2002, Belém. **Anais**. Belém, 2002.
3. ALPHONSE, M.; SAAD, E. M. Growing greenhouse cucumber in farmyard and chicken manure media in combination with foliar application of zinc, manganese and boron. **Egyptian Journal of Horticulture**, Cairo, v.27, n.3, p.315-336, 2000.
4. 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, v.45, n.1, p.143-154, 1986.
5. BOSA, N.; CALVETE, E. O.; NIENOW, A. A.; SUZIN, M. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de gipsofila. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.21, n.2, p.207-210, abril/junho, 2003.
6. BORGHEZAN, M.; MORAES, L. K. A. ; MOREIRA, F.M. ; SILVA, A. P. Propagação *in vitro* e avaliação de parâmetros morfofisiológicos de porta-enxertos de videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.7, p.783-789, julho, 2003.
7. CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P; FERREIRA, M. E. **Meios nutritivos**. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. v.1 Brasília: EMBRAPA – CNPJ, 1998.
8. CAMARGO, P. N.; SILVA, O. **Manual de adubação foliar**. São Paulo. Ed. La Libreria e Editora e Distribuidora Herba Ltda, 1975. 258 p.
9. CARVALHO, G. R.; PASQUAL, M.; RESENDE, E.; SCARANTE, M. J.; CARVALHO, G. R. Aclimatização de plântulas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) propagadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.3, p. 483-490, 1999.
10. DENARDI, F. Porta-enxertos. In: EMPASC. **Manual da cultura da macieira**. Florianópolis: EMPASC, 1986, p.92-132.
11. DÍAZ-PÉREZ, J.C.; SUTTER; E.G.; SHACKEL, K.A.. Acclimatization and subsequent gas-exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.95, p.225-232, 1995.
12. EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis, 2002. 743p.
13. FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E.; FORTES, G. R. L. **Propagação de Plantas Frutíferas de clima temperado**. Ed. Univers. Pelotas, 1995. 178p.

14. FERNANDEZ, C.; ARAÚJO, J. A. C.; CORÁ, J. E. Impacto de quatro substratos e parcelamento da fertirrigação na produção de tomate em sob cultivo protegido. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.4, dezembro, 2002.
15. FRÁGUAS, C. B. **Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira 'Roxo de Valinhos' em diferentes ambientes**. Lavras, 2003. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Fitotecnia) Escola Superior de Agricultura de Lavras - MG.
16. GEORGE, E. F. **Plant Propagation by tissue culture**. Exegeties, 2nd Edition, 1993
17. GRIBAUDO, I.; VALLANIA, R.; NOVELLO, V. Anatomical and histological characteristics of the leaves of *Vitis vinifera* cv. Nebbiolo plants cultivated *in vitro* e *ex vitro*. **Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura**. v.65, n.2, p.65-66, 2003.
18. GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. v.1 Brasília: EMBRAPA – CNPJ, 1998.
19. HARTMANN, H. T.; KESTER D. E.; DAVIS JR., F. T. et al. **Plant Propagation: principles and practices**. 6 ed. New York: Englewood Clippis/Prentice Hall, 1997. 770p.
20. HILL, L. **Segredos da Propagação de Plantas**. São Paulo: Nobel, 1996.
21. HOFFMANN, A.; CHALFUN, N. N. J.; PASQUAL, M.; VEIGA, R.D. Efeito do substrato no enraizamento e aclimatização de mudas micropropagadas do porta-enxerto de macieira Marubakaido. **Agropecuária de Clima Temperado**, Pelotas, v.2, n.2, p.189-197, 1999.
22. HOFFMANN, A.; PASQUAL, M., CHALFUN, N. N. J.; FRÁGUAS, C. B. Efeito da sacarose e do selamento do frasco no enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas do porta-enxerto de macieira Marubakaido. **Revista Científica Rural**, Bagé, v.6, n.1, p. 65-70, 2001.
23. KÄMPF, A. N. **Produção comercial de plantas ornamentais**. Guaíba: Agropecuária, 2000, 254p.
24. KIEHL, E. J. **Manual de Edafologia – relações solo – planta**. São Paulo. Agronômica Ceres. 1979, 264p.
25. KYTE, L., KLEYN, J. **Plants from test tubes: a introduction to micropropagation**. 3 ed. Oregon, 1999.
26. LANE, W. D. Regeneration of apple plants from shoot meristem tips. **Plant Science Letters**, Limerik, v. 13, n. 13, p. 281-285. 1978.
27. LIMA, V. C. ; LIMA, J. M. J. C. **Fundamentos de Pedologia**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 1996.
28. MACIEL, A. L. R.; SILVA, A. B.; PASQUAL, M. Aclimação de plantas de violeta (*Saintpaulia ionantha* Wendl) obtidas *in vitro*: efeitos do substrato. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.1, p.9-12, janeiro/março, 2000.

29. MACIEL, S. C. VOLTOLINI, J. A.; PEDROTTI, E. L. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização do porta-enxerto de macieira Marubakaido micropropagado. *Revista Brasileira de fruticultura*, Jaboticabal, v.24, n.2, agosto, 2002.
30. MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres Ltda. 1980.
31. MELLO, L. M. R. Artigos Técnicos. Produção e mercado brasileiro de maçã. Disponível em <<http://www.cnpuv.embrapa.br/prodmaca.html>>. Acessado em 7 jan. 2004.
32. MELO, J. L. F.; MENDONÇA, V.; SILVA, A. V. C.; TAVARES, J. C. Tempo de permanência da muda no substrato e tamanho do recipiente para a formação de porta-enxerto de gravioleira. *Revista Ciência Agrária*, Belém, n.37, p.155-166, janeiro- junho, 2002.
33. MENDONÇA, V.; NETO, S. E. A.; RAMOS, J. A.; PIO, R.; GONTIJO, T. C. A. Diferentes substratos e recipientes na formação de mudas de mamoeiro 'sunrise solo'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.25, n.1, p.127-130, 2003.
34. MOHAMED, F. A.; SHARAF, A. N. M.; MOHSEN, A. M. Response of orange plants to foliar application of manganese using ⁵⁴Mn. *Nuclear techniques in soil plant*, Cairo, p.507-517, 1995.
35. MORTVEDT, J. J. Needs for controlled-availability micronutrient fertilizers. *Fertilizer Research*, Alabama, v.38, n.3, p.213-221, 1994.
36. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.
37. NETO, A. A.; MENDES, A. N. G.; GUIMARÃES, P. T. G. Avaliação de substratos alternativos e tipos de adubação para produção de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) em tubetes. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.23, p.270- 280, abril/junho, 1999.
38. NUNES, J.C.O.; BARPP, A.; SILVA, F.C.; PEDROTTI, E.L. Micropropagação do porta-enxerto 'Marubakaido' (*Malus prunifolia*) a partir da cultura de meristemas. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal, v.21, n.2, p.191-195, 1999.
39. OLIVEIRA, M. F.; FORTES, G. R. L.; CAMARGO, L. B. A.; FLORES, R. Calogênese e organogênese de internódios de macieira cv. 'Marubakaido' induzida por picloram e alumínio. *Revista Científica Rural*, Bagé, v.4, n.2, p.43- 48, 1999.
40. PASQUAL, M.; CORREA, D. M. ; CHALFUN, N. J. ; RAMOS, J. D.; ALVARENGA, A.. A. Enraizamento *in vitro* dos porta-enxertos de macieira MI- 793 e M- 7. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Cruz das Almas, v. 16, n.1, p. 25-30, 1994.
41. PEDROTTI, E.L.; VOLTONI, J.A. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização do porta enxerto de macieira M.9. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.23, n.2, p.234-239, 2001.
42. PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G.R.L.; SILVA, J. B. Efeito do frio em brotações *in vitro* de macieira sobre o alongamento dos entrenós na aclimatização. In: X REUNIÃO ESTADUAL DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, Passo Fundo, 1998. *Anais*: Passo Fundo, 1998.

43. PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L.; SILVA, J. B. Efeito da aplicação de baixa temperatura em plantas de macieira sobre o crescimento durante a aclimatização. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.36, n.1, p.89-95, janeiro, 2001.
44. PEREIRA, J.E.S.; FORTES, G. R. L. Multiplicação e aclimatização da macieira influenciada pelo tipo de explante e pelo tempo de permanência em meio de cultura de enraizamento. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal, v.23, n.2, p.417-420, 2001.
45. PIERIK, R.L.M. *Cultivo in vitro de las plantas superiores* (versão espanhola de MATEO-SAGASTA, L. A.). Madri: Ediciones Mundi- Prensa, 1987. 326p.
46. QUEIROZ, J. A. L.; MELÉM JÚNIOR, N. J.; Efeito do tamanho do recipiente sobre o desenvolvimento de mudas de acaí (*Euterpe oleracea* Mart.). *Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal, v. 23, n.2, p. 460-462, 2001.
47. RAVEN, P. H.; EVERT, R. F. ; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. 2. ed. Rio de Janeiro : Guanabara, 1996. 729p.
48. RIBAS, L.L. *Micropropagação e estudo do parada de crescimento durante a aclimatização de mudas de macieira (Malus domestica Borkh.) cv. Gala, Clone FZ*. 1991.142 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.
49. RIBAS, L.L.F.; ZANETTE, F. Enraizamento *in vitro* de brotações de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cv. Gala, clone FZ. *Revista Setor Ciências Agrárias*. Curitiba. v.11, n.1, 1991.
50. RIBAS, L.L.F.; ZANETTE, F. Propagação da macieira cv Gala através da cultura de meristemas. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.4, n.1, p.39-43, 1992.
51. SANTA-CATARINA, C.; MACIEL, S.C.; DENARDI, F.; PEDROTI, E.L. Micropropagação do porta-enxerto de macieira 'Seleção 69' tolerante à podridão do colo (*Phytophthora cactorum*). *Ciência Rural*, Santa Maria, v.31, n.5, p.757-762, 2001.
52. SÃO JOSÉ, A. R.; SOUZA, I. V. B.; FILHO, D. J.; LEITE, M. J. N. *Formação de Mudanças de Maracujazeiros*. In: SÃO JOSÉ, A. R. *Maracujá: Produção e Mercado*. Vitória da Conquista. UESB, 1994. p. 255.
53. SCHIAVO, J. A.; MARTINS, M.A. Produção de mudas de acácia colonizadas com micorizas e rizóbio em diferentes recipientes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.38, n.2, p. 173-178, fevereiro, 2003.
54. SCHMITZ, J. A. K.; SOUZA, P.V.D.; KÄMPF, A. N. Propriedades químicas e físicas de substratos de origem mineral e orgânica para o cultivo de mudas em recipientes. *Ciência Rural*, v.32, n.6, 2002.
55. SILVA, R. P.; PEIXOTO, J. R.; JUNQUEIRA, N. T. V. Influência de diversos substratos no desenvolvimento de mudas de maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* DEG). *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.23, n.2, p.377-381, 2001.

56. SNIR, I.; EREZ, A. *In vitro* propagation of malling merton apple rootstocks. *Hortscience*, Alexandria, v.15, n.5, p. 597-8, 1980.
57. SRISKANDARAJAH, S; MULLINS, M. G.; NAIR, Y. Induction of Adventitious Rooting *in vitro* in Difficult-to-Propagate Cultivars of Apple. *Plant Science Letters*. v.24, p.1-9, 1982.
58. TAHMATSIDOU, V. I.; VOVIATZIS, D.; PAROUSSI, G. A modified method for the *in vitro* rooting and subsequent growth of strawberry microcuttings. *Acta Horticulturae*, 2002, n.579, p.227-231.
59. TRINDADE, A. V.; OLIVEIRA, J. R. P. **Propagação e plantio**. In: SANCHES, N.F.; DANTAS, J.L.L. **O Cultivo do mamão**. Cruz das almas: EMBRAPA, 1999. p. 17-26.
60. YUI, E. **Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de macieira (*Malus doméstica* Borkh.)**. Lavras, 1990. 69p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura de Lavras - MG.
61. YUI, E.; PASCOAL, M.; RAMOS, J.D.; NAGIG,N.; CHALFUN, J.; ISHIDA, J.S. Influência de reguladores de crescimento na proliferação *in vitro* de brotos do porta- enxerto de macieira M-7. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.28, n.5, p.597-602, maio 1993.

ANEXOS

ANEXO 1 – Porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido’ micropropagado, aos seis meses em casa-de-vegetação, em embalagens de polietileno de 10cm de largura, 15cm de altura e 1178cm³ de volume.



ANEXO 2 – Detalhe do porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido’ micropropagado, aos 85 dias em casa-de-vegetação, retirado do tubete de 3cm de diâmetro, 12cm de altura e 50cm³ de volume.



ANEXO 3 – Porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos 85 dias em casa-de-vegetação, com as mudas em tubetes de 3cm de diâmetro, 12cm de altura e de 50cm³ de volume.



ANEXO 4 – Porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' micropropagado, aos seis meses em casa-de-vegetação, em embalagens de polietileno de 10cm de largura, 15cm de altura e 1178cm³ de volume.

