

Micropropagação de Macieira

Avanços nos protocolos de micropropagação

Monita Fiori de Abreu

Acadêmica do curso de Agronomia,
Bolsista PIBIC/BIP/CNPq - Laboratório de
Morfogênese e Bioquímica Vegetal - CCA/UFSC.
monitaf@yahoo.com

Enio Luiz Pedrotti

Pb.D., Prof. Adjunto IV, Departamento de
Fitotecnia - Laboratório de Morfogênese e
Bioquímica Vegetal - CCA/UFSC.
pedrotti@cca.ufsc.br

Ilustrações cedidas pelos autores

Introdução

A cultura da macieira possui papel de destaque no cenário frutícola brasileiro. Atualmente, a área cultivada no Brasil está estimada em 30 mil hectares, com uma produção aproximada de 967 mil toneladas (ABPM, 2003). Visando atender às demandas de mudas da pomicultura nacional, faz-se necessária a aplicação de métodos eficientes para garantir grande quantidade de material vegetal de alta qualidade genética e fitossanitária.

A produção de mudas da macieira tradicionalmente é efetuada através de técnicas de propagação vegetativa, como a enxertia de cultivares copa sobre um porta-enxerto. Tradicionalmente a muda é obtida através de mergulhia de cepa (Driessen & Souza Filho, 1986). Porém, esse método restringe o número de mudas obtidas, requer muito tempo, além de poder resultar em mudas de baixa qualidade fitossanitária.

Diante da problemática relacionada às técnicas convencionais de propagação, a biotecnologia através do aperfeiçoamento das técnicas de cultivo *in vitro*, tem sido uma excelente opção para a multiplicação desta frutífera (Figura 1). Possibilita a produção de mudas de alta qualidade sanitária oriundas da cultura de meristemas livres de vírus, evitando, desta forma, os problemas de disseminação de vírus e outros patógenos durante a fase de propagação.

Diversos trabalhos vêm sendo conduzidos no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (CCA/UFSC) a partir de projetos fi-

nanciados pelo CNPq e FINEP. As principais linhas de pesquisa foram no sentido de desenvolver metodologias que abrangem desde o isolamento e inoculação *in vitro* de meristemas, até a aclimatização das plantas micropropagadas.

Metodologia

1 - Isolamento e Inoculação *in vitro*

A introdução e o estabelecimento de meristemas *in vitro* é uma das fases mais delicadas da micropropagação. O isolamento de meristemas é um processo oneroso (Nunes *et al.*, 1999) mas é primordial, pois é uma condição que garante a produção de brotações livres de patógenos. A oxidação e a contaminação provocam grandes perdas do material. Os meristemas extraídos das gemas apicais apresentam taxas de oxidação acima de 40%. A porcentagem de contaminação é constatada em cerca de 35% dos explantes. Num trabalho conduzido com o porta-enxerto M.9, todos os tubos de ensaio com meio de cultura contaminado apresentaram oxidação (Tabela 1). Os agentes contaminantes como fungos e bactérias liberam compostos que causam a oxidação. O estabelecimento *in vitro* é executado segundo metodologias consideradas clássicas para esta fase (Pedrotti, 1993; Nunes *et al.* 1999). As gemas são extraídas com o auxílio de um bisturi e estas, são submetidas à lavagem com água destilada/autoclavada e detergente Tween

Tabela 1. Contaminação, oxidação, números de gemas e brotos e percentual de calos no porta-enxerto de macieira 'M-9' (*Malus pumilla* M.), a partir da cultura de meristemas e gemas axilares.

Parâmetros Analisados	Tratamentos		
	Meristemas	Gemas	CV (%)
Contaminação (%)	38,6 a	32,2 a	14,1
Oxidação (%)	42,3 b	58,4 a	12,5
Nº médio de gemas por broto	3,0 b	5,0a	12,6
Nº médio de brotos formados	3,0 a	4,0 a	9,6
Calos (%)	62,3 a	12,4 b	14,1



Figura 1: Frascos do cultivo *in vitro* de macieira

20@por 20 minutos. Em seguida, as gemas são imersas em solução de Anfotericina B@ (25 mg.L⁻¹) por 10 minutos. Em câmara de fluxo laminar, as gemas são imersas em etanol 70% por 1 minuto, seguida de solução de hipoclorito de sódio 4%, por 10 minutos. Durante este processo os frascos são mantidos sob agitação contínua. Posteriormente, faz-se uma triplíce lavagem com água destilada/autoclavada e as gemas permanecem em uma solução de ácido ascórbico 15% por 10 minutos até serem inoculadas em sais e vitaminas de MS (Murashige e Skoog, 1962), sacarose (30 g.L⁻¹), ágar (6 g.L⁻¹) sem

suplementação de fitorreguladores (Souza *et al.*, 2003).

As gemas axilares introduzidas *in vitro* têm apresentado oxidação acima de 50%, enquanto que os meios de cultura contaminados com fungos e bactérias são normalmente acima de 30% (Tabela 1). Da mesma forma, todos os tubos contendo meio de cultura contaminados apresentaram oxidação. Quando os explantes não apresentam oxidação nem contaminação, são transferidos de tubos de ensaio com novos meios de cultura para eliminar resíduos fenólicos liberados pelas plantas no meio de cultura inicial (Zanol, 1996). Nos tra-

balhos conduzidos no laboratório, após a transferência dos meristemas provenientes de gemas apicais e segmentos nodais com gemas axilares, não ocorrem mais problemas de contaminação nem oxidação.

O crescimento e desenvolvimento dos meristemas e gemas axilares são normalmente lentos até 30 dias após a inoculação, não sendo observado o crescimento de brotações. Aos 60 dias, é possível observar o desenvolvimento de brotações. Para o porta-enxerto M.9, os meristemas e gemas axilares introduzidos *in vitro*, formam um número médio de 3 e 5 gemas por broto, respectivamente (Tabela 1).

As diferenças observadas na introdução *in vitro* e multiplicação podem ser consequência do estado fisiológico das plantas matrizes, onde foram coletados os explantes como salientaram Grattapaglia & Machado (1990). Quando material vegetal coletado é retirado das matrizes no final do verão, possivelmente, as gemas já iniciam o processo de entrada em dormência, o que diminui a sobrevivência dos meristemas e gemas introduzidos *in vitro*. Desta forma, a época mais interessante para a introdução *in vitro* é aquela que corresponde a um intenso crescimento vegetativo nas condições naturais.

2 - Multiplicação do material vegetal

A composição salina mais utilizada nos meios de cultura é a MS (Murashige & Skoog, 1962), geralmente suplementada com reguladores de crescimento que permitem direcionar as respostas morfo-genéticas (George, 1996). Para a fase de multiplicação *in vitro* da macieira, Ribas & Zanette (1992)

Tabela 2. Efeito de diferentes concentrações de BAP em meio de cultura MS sobre a resposta de na fase de multiplicação *in vitro* de macieira (*Malus platycarpa*) após 45 dias de cultura.

Concentração de BAP	Nº de brotações por explante	Altura das brotações (cm)	Comprimento dos entrenós (cm)	Vitrificação (%)
0,00 µM	1,0 c	2,3 a	0,59 b	42,0 a
1,11 µM	2,0 b	2,6 a	0,59 b	18,0 c
2,22 µM	3,0 a	2,6 a	0,54 c	18,0 c
4,44 µM	2,0 b	2,9 a	0,65 a	24,0 b
CV (%)	14,2	15,3	13,3	18,9

Médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem significativamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan.

utilizaram o meio MS suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP e 1,0 mg.L⁻¹ de tiamina, e Modgil *et al.* (1999) obtiveram a maior taxa de multiplicação de brotações da cultivar Tydeman's Early Worcester adicionando ao meio de cultura 4,4 µM de BAP e 5,0 µM de KIN. Para o porta-enxerto Marubakaido Nunes *et al.* (1999) utilizaram concentrações de BAP entre 1,11 e 4,44 µM.

Quando se pretende estudar o comportamento de um novo genótipo, os explantes são repicados para tubos de ensaio (2,5 x 15,0 cm) contendo 15 mL de sais e vitaminas de MS, suplementado com diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP) (0; 0,25; 0,50 e 1.0 mg.L⁻¹), 30,0g.L⁻¹ de sacarose, 6,0 g.L⁻¹ de ágar. Para um genótipo usado com planta indicadora de viroses, é possível verificar que as concentrações de BAP influenciam sua resposta *in vitro* (Tabela 2). O material é mantido no escuro por 48 horas, após este período, é transferido para a sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C e 40 µmol.m⁻².s⁻¹ de radiação luminosa, fornecidas por lâmpadas fluorescentes Phillips® Super 84.

3 - Microenxertia

Tendo em vista as características da cultura, a associação das técnicas de micropropagação e microenxertia permite combinar as vantagens da rápida multiplicação *in vitro*, com a união de dois genótipos diferentes: um clone copa, selecionado para produzir frutos de alta qualidade, e um clone de porta-enxerto, que confere à cultivar copa características relevantes, como: vigor, produtividade, qualidade de frutos, resistência a fatores adversos como a patógenos do solo, além de realizar funções básicas de suporte da planta, fornecimento de água e nutrientes e a adaptação às condições de solo, clima e doenças.

A microenxertia foi inicialmente desenvolvida por Murashige *et al.* (1972) e posteriormente melhorada por Navarro *et al.* (1975), buscando a produção de citrus livres de viroses. Esta técnica permite a obtenção de plantas livres de patógenos, aplica-



Figura 2: Fenda do microenxerto de macieira., início de brotação na copa, 30 dias após a microenxertia.

ção de quarentena em espécies vegetais cuja disponibilidade seja de apenas algumas gemas vegetativas, separação entre viroses e outras doenças, além de estudos fisiológicos, histológicos e histoquímicos nas enxertias. Porém ainda é um desafio promover com sucesso a enxertia de um material tão pequeno e frágil como aquele proveniente de plantas produzidas *in vitro*. (Obeidy & Smith, 1991). Para garantir a viabilidade do microenxerto é necessário que as células da base do microenxerto da cultivar copa, entrem novamente em divisão, pois são diferenciadas, ou seja, já deixaram o ciclo celular e não sofrem mais desdiferenciação. Na retomada do ciclo celular é possível induzir novas competências e diferenciar para estabelecer os tecidos estruturais e condutores (Taiz & Zeiger, 1991). O estabelecimento de novos tecidos condutores é o resultado do sucesso do método.

Nos trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, como modelo, foram utilizados dois porta-enxertos (M9 e Marubakaido) e uma cultivar copa (Gala) de macieira. O porta-enxerto M9 (*Malus pumila* Mill.) é o mais utilizado no sul do Brasil, tendo como característica principal diminuir o vigor da planta. Além de redu-

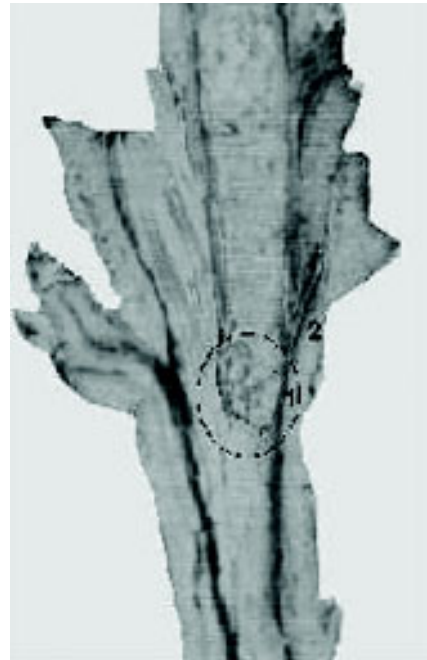


Figura 3: Detalhes dos pontos de conexão observados no corte histológico do microenxerto de macieira, 90 dias após a microenxertia.

zir o porte da planta, o M9 aumenta a precocidade e é um dos poucos porta-enxertos que apresenta boa resistência à podridão do colo (*Phytophthora cactorum*) (Barrit, 1999). O porta-enxerto Marubakaido (*Malus prunifolia* Borkh.) é de origem japonesa, sendo bastante utilizado como porta-enxerto comercial no Japão, Europa bem como no Brasil (Bessho *et al.*, 1993). É vigoroso, apresenta resistência à podridão-do-colo, relativa resistência a *Rosellinia* sp. e é muito sensível a viroses (Denardi, 1986). A cultivar copa Gala (*Malus domestica* Borkh.) é a primeira em volume de produção no Brasil, apresenta frutificação precoce, alta produtividade e boa adaptação a altitudes superiores a 1000m (Denardi, 1986).

4 - Estudos histológicos

A microenxertia é realizada em fenda simples conforme a metodologia proposta por Hartmann *et al.* (1990). Em câmara de fluxo laminar, a parte apical das plântulas dos porta-enxertos é retirada e a altura das plantas uniformizada em 5 cm de altura. Para a variedade copa Gala são preparados microgarfos com uma única gema lateral. Através de um corte em fenda simples

Tabela 3. Número e comprimento de raízes em plantas micropropagadas dos porta-enxertos de macieira M.7, M.9 e Marubakaido, submetidos a diferentes concentrações e formas de aplicação de Ácido Indolbutírico (AIB) e ao crescimento das raízes em diferentes substratos.

Tratamentos	Número de raízes			Comprimento das raízes (cm)		
	"M.7"	"M.9"	"Marubakaido"	"M.7"	"M.9"	"Marubakaido"
1	4,0 ± 1,0 c	5,0 ± 1,0 a	10,0 ± 2,0 a	1,7 ± 0,1 b	2,7 ± 0,5 a	1,8 ± 0,4 b
2	6,0 ± 0,5 b	3,0 ± 1,0 b	3,0 ± 1,0 b	1,9 ± 0,1 ab	0,5 ± 0,2 c	0,5 ± 0,3 c
3	8,0 ± 1,0 a	0,0 ± 0,0 c	2,0 ± 0,5 c	2,2 ± 0,2 a	0,0 ± 0,0 d	0,4 ± 0,3 c
4	9,0 ± 1,0 a	5,0 ± 1,0 a	13,0 ± 2,0 a	2,2 ± 0,2 a	1,6 ± 0,2 b	3,4 ± 0,5 a

Médias na coluna seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Tratamentos:

- 1 - Indução *in vitro* em 1.5 µM de AIB em ágar e crescimento das raízes *in vitro* em ágar;
- 2 - Indução *in vitro* em 1.5 µM de AIB em ágar e crescimento das raízes *in vitro* em substrato mineral;
- 3 - Indução *in vitro* com 0,49 M de AIB e crescimento *in vitro* em substrato mineral;
- 4 - Indução *ex vitro* com 0,49 M de AIB e crescimento das raízes em substrato mineral concomitante com a fase de aclimatização.

Tabela 4. Enraizamento, número e comprimento de raízes de microestacas do porta-enxerto de macieira M.9 (*Malus pumila*), tratadas com AIB e submetidas ao enraizamento *ex vitro*, em substrato de casca de arroz carbonizada e vermiculita 1:1 (v/v), por um período de 30 dias.

AIB(mg/L)	Enraizamento(%)	Número de raízes	Comprimento das raízes (cm)
0	64 b	3,5 b	3,5 a
500	82 a	6,0 a	4,1 a
1000	84 a	6,0 a	4,5 a
1500	30 c	7,5 a	4,7 a

* Médias seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5%
ns - não significativo.

realizado nas plântulas dos porta-enxertos, e um corte em bisel no minigarfo da cultivar copa, é realizada a enxertia com o auxílio de duas pinças. Os microenxertos são então inoculados em frascos com meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) e transferidos para a sala de crescimento, com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de 40 µmol.m⁻².s⁻¹, onde permanecem até as coletas dos segmentos. Para os estudos histológicos, de ambas as combinações enxerto-porta-enxerto, Gala sobre Marubakaido e Gala sobre M9, são realizadas 120 microenxertias, o que diminuem os erros experimentais. O material vegetal coletado é fixado em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M – pH7,2, desidratado em série etílica e embocado em parafina (Johansen, 1940). Os cortes são corados com azul de toluidina e montados, entre lâmina e lamínula, com bálsamo do Canadá. A análise dos cortes histológicos é feita em microscopia óptica e em lupa, 30 e 90 dias após a microenxertia (Figuras 2 e 3). A

conexão dos microenxertos é visualizada a partir de duas etapas. O primeiro momento se dá em poucos dias e é caracterizado pela morte de camadas celulares da interface do enxerto e pela formação de células parenquimáticas que preencham o ponto de enxertia, resultando no desenvolvimento de uma camada necrótica na fenda. Na segunda etapa, ocorre a proliferação de um calo em associação com a região vascular da copa e do porta-enxerto, formando uma ponte na interface do enxerto. Posteriormente, há a diferenciação de algumas células do calo em novas células cambiais. Ocorre, então, a união entre os tecidos afins da copa e do porta-enxerto resultando no estabelecimento de uma conexão cambial contínua. Na última fase, a continuidade da epiderme no ponto de enxertia é restaurada. O posterior desenvolvimento da copa pelo alongamento e desenvolvimento de brotações caracteriza o sucesso da microenxertia, observado em até 30 dias em macieira (Abreu *et al.*, 2003).

5 - Enraizamento de plantas micropropagadas

O enraizamento de microestacas é considerado por vários autores um dos estágios mais críticos do processo de propagação massal de plantas perenes (Wang, 1991), pois depende do genótipo e de sua condição fisiológica no momento da indução ao enraizamento (Martins & Pedrotti, 2001). A emissão de raízes por uma microestaca pode ser dividida em três fases, que compreendem a desdiferenciação celular, a indução e a organização dos primórdios radiculares (Hartmann *et al.*, 1997; Blakesley *et al.*, 1991). Na maioria dos protocolos estabelecidos para a micropropagação de plantas, o enraizamento é induzido *in vitro*, utilizando meios de cultura contendo uma auxina (Harbage & Stimart, 1996; Deklerk *et al.*, 1997; Ferri *et al.*, 1998). Para a maioria das espécies, a auxina é necessária na fase de indução das raízes enquanto que, na fase de diferenciação dos primórdios e no crescimento das raízes, a presença de auxinas no meio de cultura pode

inibir o processo (Deklerk *et al.*, 1995). A concentração de auxina a ser adicionada ao meio de cultura para o estágio de indução, depende da concentração endógena deste hormônio em cada genótipo utilizado (Blakesley *et al.*, 1991), sendo que altas concentrações, por períodos de exposição prolongados, podem determinar a formação de calos na base das microestacas. Para Pasqual & Ishida (1992), o melhor enraizamento *in vitro* foi obtido em meio MS, geleificado, contendo 1 mg/L de AIB.

As condições de temperatura, a luminosidade da câmara de crescimento e a disponibilidade de oxigênio junto à base das microestacas, além de fatores anatômicos inerentes ao genótipo, podem inibir a evolução do processo morfogênético induzido pelas auxinas. Apesar de Harbage & Stimart (1996), Deklerk *et al.* (1997) e outros autores utilizarem o processo de indução e crescimento das raízes *in vitro*, McClelland *et al.* (1990) ressaltam que as raízes produzidas *in vitro* não são funcionais quando transferidas para a fase de aclimatização. Para garantir a sobrevivência nesse estágio, é necessário que a planta produza novas raízes, o que demanda um grande consumo de reservas que deveriam ser utilizadas para o crescimento da parte aérea. Além disto, Debergh & Maene (1981) salientam a necessidade de desenvolver sistemas de indução que permitam a produção de raízes funcionais para o processo de aclimatização e para o aumento da qualidade das plântulas.

5.1 - Enraizamento *in vitro*

Os resultados obtidos com a indução *in vitro* de raízes em porta-enxertos de macieira, mostraram diferenças em relação aos parâmetros avaliados, em função do genótipo e da concentração e forma de aplicação da auxina (Martins & Pedrotti, 2001). (Tabela 3). Resultados semelhantes foram obtidos com macieira por Harbage *et al.* (1998), os quais concluíram que a capacidade de emitir raízes e de estabelecer um sistema radicular, é uma condição intrínseca de cada genótipo

No caso do porta-enxerto M.7, o enraizamento realizado *in vitro* em ágar apresentou resultados inferiores quanto ao número de raízes. Provavelmente as concentrações de AIB utilizadas não possibilitaram a indução do mesmo número de raízes que foi observado para o 'Marubakaido', já que as respostas são dependentes do genótipo (Blakesley *et al.*, 1991). É possível que, para este porta-enxerto, o pH do meio de cultura não tenha favorecido a absorção de auxinas pelas células da base da microestaca, tendo em vista que a penetração de auxinas nas células depende do equilíbrio entre ácidos livres e formas aniônicas, que são dependentes do pH (Harbage *et al.*, 1998). O maior número de raízes obtido para as microestacas do 'M.9' e do 'Marubakaido' (Tabela 4), induzidas *in vitro* com o AIB dissolvido em água e transferidas diretamente para o substrato mineral para a aclimatização, reforça as conclusões emitidas por Rogers & Smith, (1992). Estes autores aumentaram a eficiência no enraizamento de roseiras quando utilizaram substratos minerais para o crescimento das raízes, comparados com meios de cultura geleificados. Estes resultados abrem perspectivas concretas para o uso de substratos porosos para o enraizamento *in vitro*, o que diminui os custos de produção de plantas micropropagadas. Com esta metodologia é possível substituir os meios de cultura contendo ágar por substratos minerais, o que diminui custos e produz raízes de melhor qualidade do que as produzidas *in vitro*.



Figura 4 : Crescimento de raízes em porta-enxertos de macieira, após indução ao enraizamento

5.2 - Enraizamento *ex vitro*

Em função dos custos da fase de enraizamento e aclimatização das plantas micropropagadas, uma série de trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (Pedrotti & Voltolini, 2001). Os principais objetivos foram de induzir o enraizamento *ex vitro* em substratos porosos que servem apenas de suporte para as plântulas como acontece na estaquia tradicionalmente usada para a propagação de várias espécies. Para isto, são utilizadas miniestacas do porta-enxerto M.9, de 2 a 2,5 cm de comprimento, com dois pares de folhas, preparadas a partir de brotações micropropagadas. A indução ao enraizamento é efetuada submergindo 10mm da base das miniestacas durante 10 segundos em diferentes concentrações de ácido indolbutírico (0, 500, 1000, ou 1500 mg/L). Em seguida, as miniestacas são transferidas para bandejas alveoladas contendo o substrato terra roxa e casca de arroz carbonizada 1:1 (v/v.). As bandejas são então colocadas dentro de caixas plásticas com uma lâmina de água de 5 mm para manter a umidade relativa elevada. As caixas são cobertas com uma lâmina de vidro, conforme metodologia descrita por Pedrotti (1993). Durante 30 dias essas caixas são mantidas em câmara de aclimatização com temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Após esse período, as plantas são avaliadas quanto ao percentual de enraizamento, número e comprimento das raízes emitidas.

As maiores percentagens de enraizamento com 82 e 84 % são observadas nas miniestacas tratadas com 500 e 1000 mg/L de AIB, respectivamente. O menor percentual de enraizamento (29,6%) é obtido com 1500 mg/L de AIB. As microestacas-controladas produzem em média 3,4 raízes.

Estes valores são inferiores àqueles observados nos tratamentos com AIB. Para os níveis de AIB de 500, 1000 e 1500 mg/L, o resultado é a produção de 5,6 a 7,6 raízes respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si.

Considerando que o porta-enxerto M.9 é de difícil enraizamento é possível sugerir que o mesmo necessite de níveis maiores de auxinas ou outros coofatores para aumentar o enraizamento, já que James & Thurnbon (1981) só obtiveram 45% de enraizamento com este porta-enxerto quando adicionaram fluoroglucinol no meio de cultura. Possivelmente as condições de indução *in vitro*, utilizadas por estes autores dificultaram a absorção da auxina, como constatado por Harbage *et al.* (1998). Além disto, a intensidade luminosa da câmara de crescimento pode ter contribuído para inativar parte da auxina aplicada. Khosh-khui & Sink (1982) obtiveram aumento no enraizamento de roseira com o sombreamento da base das estacas. Valores mais elevados no enraizamento de pereira (Wang, 1991) e em macieira (Fortes & Leite, 1993) foram obtidos com a manutenção das plantas no escuro. A maior porosidade e aeração dos substratos utilizados também podem favorecer a indução e o crescimento de raízes, como foi observado por Jay-Allemand *et al.* (1992).

Os níveis de AIB superiores a 500 mg/L não aumentam a porcentagem de enraizamento do porta-enxerto M.9. Estes resultados podem estar relacionados com os teores endógenos de auxinas produzidas por gemas e folhas jovens, como sugerem Hartmann *et al.* (1997), pois mesmo sem aplicação de AIB, as porcentagens de enraizamento do porta-enxerto M.9 foram de 63,5%. A exposição das miniestacas ao AIB por 10 segundos é suficiente para a indução de primórdios radiculares e o desenvolvimento e crescimento posteriores das raízes (Figura 4). Jarvis *et al.* (1983) observaram um aumento na síntese de RNA 20 horas após a aplicação de auxina o que corresponde às primeiras divisões celulares.

6 - Aclimatização

Durante a fase de aclimatização, as plantas micropropagadas devem se adaptar a um ambiente completamente diferente das condições em que ela foi produzida *in vitro*. Durante este período a planta deve compor uma estrutura anatômica e fisiológica capaz de suportar as condições de

alta demanda evaporativa da atmosfera e de alta radiação luminosa. Quando transferidas para condições *ex vitro*, as mudas normalmente apresentam altas taxas de transpiração, em função da alta condutividade hidráulica de suas folhas e a funcionalidade dos estômatos (Brainerd & Fuchigami, 1981; Schakel *et al.*, 1990), o que, na maioria das situações, provoca elevado déficit hídrico, podendo provocar a morte das mudas (Díaz-Pérez *et al.*, 1995).

Apesar dos avanços nos protocolos de multiplicação *in vitro*, poucos trabalhos foram realizados no sentido de elucidar problemas ligados à aclimatização das plantas (Avanzato & Cherubini, 1993). Para Ziv (1995), a aclimatização pode comprometer o processo de micropropagação por envolver a neoformação de um sistema radicular e a passagem para condições de cultivo *ex vitro*.

Durante a fase de multiplicação das brotações *in vitro*, os estômatos apresentam-se com formas e estruturas anormais (Blanke & Belcher, 1989) e a densidade pode ser diferente das folhas de plantas cultivadas *ex vitro* (Cappelades *et al.*, 1990; Sciutti & Morini, 1993). Para diver-

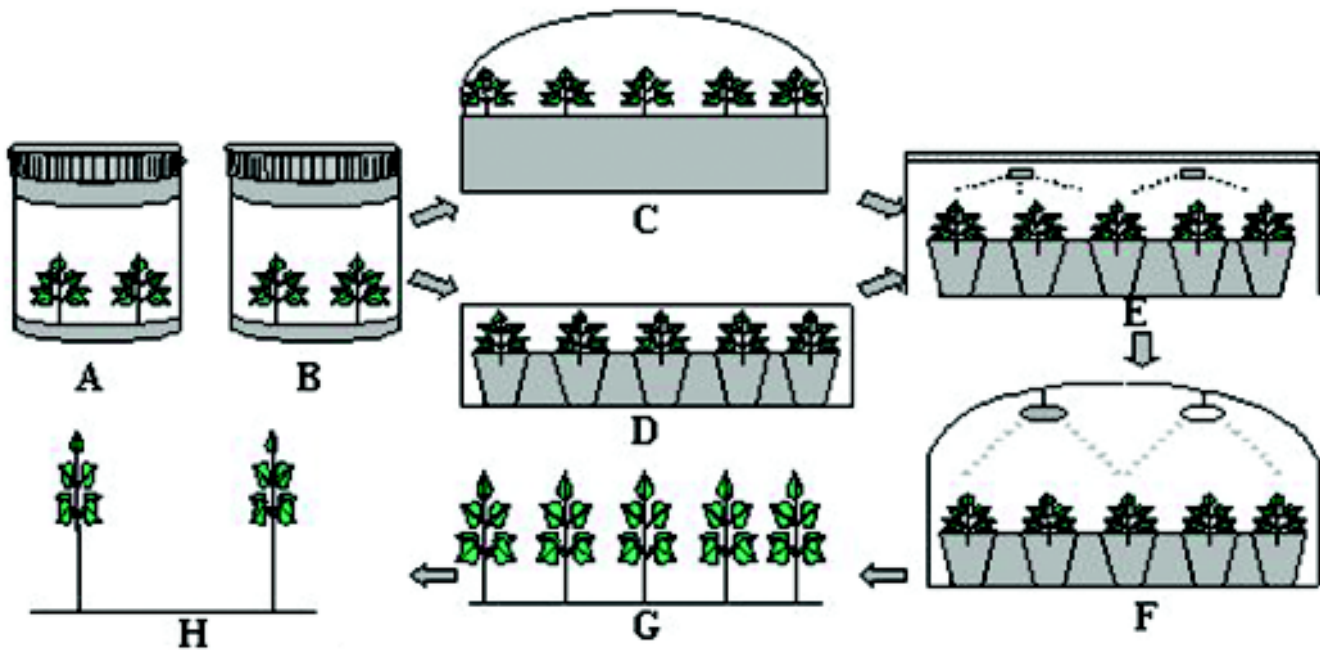


Figura 5.: Desenho esquemático da metodologia de aclimatização de plantas micropropagadas (Pedrotti, 1993).

A e B: Indução ao enraizamento *in vitro*.

C: Indução ao enraizamento *ex vitro*.

D: Início do processo de aclimatização.

E: Plantas sendo mantidas em sala com nebulização.

F: Fotoperíodo sendo mantido em 16 horas de luz para evitar a entrada em dormência.

G e H: Plantas transferidas à campo para completar o crescimento.



Figura 6: Crescimento e desenvolvimento de mudas de macieira após aclimatização.

os autores, (Pospisilova *et al.*, 1997), os estômatos *in vitro* não são funcionais, permanecem contentemente abertos ou fechados e são insensíveis aos estímulos habituais de escuro, alta concentração de CO₂, ABA e potencial hídrico. Desta forma, a grande transpiração pode causar dificuldades durante o processo de aclimatização.

A metodologia recomendada por Pedrotti (1993) (Figura 5) e utilizada no LMBV por Pedrotti & Voltolini (2001), possibilitou bons resultados para vários genótipos de macieira. Neste processo, as plantas são induzidas ao enraizamento *ex vitro* e transferidas para bandejas alveoladas.

As bandejas são colocadas em caixas plásticas cobertas com uma placa de vidro transparente. Esta condição, permite a manutenção da umidade relativa em 100%. Com esta metodologia, a sobrevivência das plantas situa-se entre 70 e 95% (Tabela 5). No que concerne à matéria seca produzida pelas raízes e

parte aérea das plantas, os maiores valores são obtidos quando as plantas receberam 1000 mg/L de AIB na fase de indução ao enraizamento. A aclimatização pode ser efetuada em câmaras de nebulização que mantém alta umidade relativa, o que diminuem as possibilidades de desidratação e morte das plantas. Neste sentido, Maciel *et al.* (2002) demonstraram que é possível obter altos índices de sobrevivência de plantas do porta-enxerto M.7. Neste processo, as bandejas são transferidas para diretamente para a câmara de nebulização. Aos 30 dias após a transferência *ex vitro*, a percentagem de enraizamento é maior nas mudas que foram aclimatizadas no substrato composto por casca de arroz carbonizada, já que esta aumenta o espaço poroso como foi observado por Lê & Collet (1991) e por Avanzato & Cherubini (1993).

As altas percentagens de enraizamento coincidem com as de sobrevivência, pois todas as plantas que enraizaram sobreviveram, e co-

incidem com os de crescimento das mudas (Figura 6). Maciel *et al.* (2002) sugerem que a umidade relativa no ambiente utilizado garantiu as condições adequadas para a aclimatização das mudas. Esta hipótese é corroborada por Campostrini & Otoni (1996), pois plântulas produzidas *in vitro* não estão adaptadas ao novo ambiente, pois não possuem mecanismos de proteção contra a desidratação, já que seus estômatos geralmente se encontram abertos (Schackel *et al.*, 1990). No entanto, segundo Pospislová *et al.* (1997) e Bolari *et al.* (1998), durante a aclimatização as mudas ativam os mecanismos que permitem sua sobrevivência após a transferência para a casa de vegetação. Possivelmente as condições de aclimatização utilizadas neste trabalho possibilitaram a sobrevivência da planta até a entrada em funcionamento dos estômatos, o que permitiu um maior controle sobre as perdas de água, o que está de acordo com Sutter (1988).

Considerações Finais

Os resultados obtidos nesse laboratório corroboram com aqueles que foram publicados por vários grupos de pesquisa nacionais e estrangeiros. As metodologias desenvolvidas permitem a produção comercial de mudas de porta-enxertos e copa de macieira micropropagados. Em que pese as peculiaridades de cada genótipo a grande maioria dos clones utilizados atualmente podem ser produzidos seguindo protocolos semelhantes. A perspectiva do uso da indução ao enraizamento realizado simultaneamente à aclimatização das plantas *ex vitro* pode diminuir em até 50% o custo de produção de uma

Tabela 5. Sobrevivência, número e comprimento de raízes altura e número de folhas de miniestacas do porta-enxerto de macieira M.9 (*Malus pumila*), submetidas ao enraizamento *ex vitro*, em diferentes concentrações de AIB, 45 dias após a repicagem para substrato mineral.

AIB (mg/L)	Sobrevivências plantas (%)	Número de raízes	Comprimento das raízes (cm)	Comprimento das brotações (cm)	Número de folhas
0	85 b	10,1 ns	12,0 ns	5,3 ns	7,5 ns
500	95 a	11,5	12,5	6,3	8,0
1000	70 c	16,0	11,6	6,9	7,5
1500	73 c	20,0	11,3	6,9	7,8

* Médias seguidas de mesmas letras nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5%
ns - não significativo

muda micropropagada, o que torna viável o uso comercial da micropropagação.

A produção de mudas de alta qualidade genética e sanitária é um fator de extrema importância para a garantia da competitividade da pomicultura nacional. Neste sentido, a aplicação das técnicas aqui abordadas abrem perspectivas para a instalação de laboratórios comerciais para atender à demanda de mudas para a renovação de pomares pouco produtivos e a implantação de novos pomares com alta densidade.

Referências Bibliográficas

- ABPM. **Produção, exportação, importação, empregos gerados**. Disponível em: <http://www.abpm.org>. acesso em: 18 de agosto de 2003.
- ABREU, M.F.; NUNES, J.C.O.; SANTOS, M.; PEDROTTI, E.L. Estudos histológicos preliminares da microenxertia de plantas micropropagadas de macieira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.1, p.195-196, 2003.
- AVANZATO, D.; CHERUBINI, S. Potenzialità di radicazione diretta e ambientamento di microtalee di portinnesti di melo moltiplicati *in vitro*. **Rivista di Frutticoltura**, v.1, p.87-90, 1993.
- BARRIT, B.H. Apple orchard management. In: ENFRUTE, **Anais... Fraiburgo**, SC, p.1-7. 1999.
- BESSHO, H., SOEJIMA, J., ITO, Y., KOMORI, S. Breeding and genetic analysis of apple in Japan. In: HAYASHI, T., OMURA, M., SCOTT, N.S. (Ed.) **Techniques on gene diagnosis and breeding in fruit trees**. Tsukuba: Fruit Tree Research Station (FTRS), p. 231-240. 1993.
- BLAKESLEY D.; WESON, G.D.; HALL, J.F. The role of endogenous auxin in root initiation. **Plant Growth Regulation**, Dordresh, v.10, p.341-353, 1991.
- BLANKE, M. M. & BELCHER, A. R. Stomata of apple leaves cultured *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. v.19, p. 85-89, 1989.
- BOLAR, J.P.; NORELLI, J.L.; ALDWINCKLE, H.S. An efficient method for rooting and acclimation of micropropagated apple cultivars. **HortScience**, New York, v.33, n.7, p.1251-1252, 1998.
- BRAINERD K.E. ; FUCHIGAMI L.H. Acclimatization of Aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.106, n.4, p.515-518, 1981.
- CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W.C. Acimatação de Mudanças Recentes. **ABCTP Notícias**, CNPH/EMBRAPA, Brasília, n.25, 1996. 12p.
- CAPPELADES, M. FORTARNAU, R.; CARULL, C. & DEBERGH, P. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cell tissue – cultured Rosa multiflora – **Journal American Society Horticultural Science**. v.115, n.1, p. 141-145, 1990.
- DE KLERK, G.J.; KEPPEL, M.; BRUGGE, J.T.; MEEKES, H. Timing of the phases in adventitious root formation in apple microcuttings. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.46, n.289, p. 965-972, 1995.
- DE KLERK, G.J.; BRUGGE, J.T.; MARINOVA, S. Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthalenetic acid during adventitious root formation *in vitro* in *Malus* Jork 9'. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v.49, p.39-44, 1997.
- DEBERGH, P.C.; MAENE, L.J. A scheme for commercial propagation for ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.14, p.35-345, 1981.
- DENARDI, F. Porta-enxertos. In: **Manual da Cultura da Macieira**. Florianópolis: EMPASC, 1986. p. 92-132.
- 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, n.2, p. 225-232, 1995.
- DRIESSEM, A.C. & SOUZA FILHO, J.J.C. Produção de Mudanças. In: **Manual da Cultura da Macieira**. Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária, Florianópolis-SC. 1986. p.202-223.
- FERRI, V.C.; CENTELLAS, A. Q.; HELBIG, V.E.; FORTES, G.R.L. Uso de ágar, amido e ácido indolbutírico no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira MM 111. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.4, p. 561-565, 1998.
- FORTES, G.R.L.; LEITE, G.L. Enraizamento *in vitro* de brotações adventícias de macieira (*Malus domestica* Borkh) 1. Pré-condicionamento ao escuro e presença de floriglucinol. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Piracicaba, v. 5, n.1, p.101, 1993.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, C.A.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília. ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p.99-169.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Part II – In Practice. Edingdon, Wilts : Exegetics, 1996. 1361p.
- HANSEN, O.B.; POTTER, J.R. Rooting of Apple, *Rhododendron*, and Mountain Laurel cuttings from stock plants etiolated under two temperatures. **HortScience**, Alexandria, v. 32, n.2, p. 304-306, 1997.
- HARBAGE, J. F.; STIMART, D. P.; AUER, C. pH affects 1h-indole-3-butyric acid uptake but not metabolism during the initiation phase of adventitious root induction in apple microcuttings. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.123, n.1, p. 6-10, 1998.
- HARBAGE, J. F.; STIMART, D. P. Effect of pH and ¹H-indol-3-butyric acid (IBA) on rooting of apple microcuttings. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 121, n. 6, p. 1049-1053, 1996.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E. & DAVIES JR., F.T.D. **Plant Propagation, Principles and Practices**. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1990. 647p.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES Jr., F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 6. ed. Singapore: Prentice-Hall, 1997. 770p.

- JAMES, D.J.; THURBON, I.J. Shoot and root initiation *in vitro* in the apple rootstock M.9 and the promotive effects of phloroglucinol. **J. Hortic. Sci.** v.56, p.15-20, 1981.
- JARVIS, B.C.; SHANNON, P.R.M.; YASMIN, S. Influence of IBA and cordycepin on rooting and RNA synthesis in stem cuttings of *Phaseolus aureus* Roxb. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v.24, p. 139-146, 1983.
- JAY-ALLEMAND, C.; PENG, S.; CAPELLI, P.; CORNU, D. Micropropagation of hybrid walnut trees. Some factors involved in rooting. **Acta Horticulturae**, Geneva n. 311, p.117-124, 1992.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw Hill Book Company, Inc. 1940. 523 p.
- KHOSH-KHUI, M.; SINK, K.C. Rooting-enhancement of *Rosa hybrida* for tissue culture propagation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, n.17, p.371-376, 1982.
- LÊ C.L.; COLLET G.F. Micropropagation de porte greffe de pommier. **Revue Suisse de Viticulture**, Arboriculture et Horticulture, v.23, n.3, p.201-204, 1991.
- 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, p.289-292, 2002.
- MARTINS, L.; PEDROTTI, E.L. Enraizamento *in vitro* e *ex vitro* dos porta-enxertos de macieira M7, M9 e Marubakaido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal. v.23, n.1, p.11-16, 2001.
- MCCLELLAND, M. T.; SMITH, M. A. L. Vessel type, closure, and explant orientation influence *in vitro* performance of five woody species. **HortScience**, Alexandria, v.25, n.7, p.797-800, 1990.
- MODGIL, M.; SHARMA, D.R.; BHARDWAJ, S.V. Micropropagation of apple cv. Tydemans Early Worcester. **Science Horticulturae**. v.81, n.2, p. 179-188, 1999.
- MURASHIGE, T.; BITTERS, W.P.; RANGAN, T.S.; NAUER, E.M.; ROISTACHER, C.N.; HOLLIDAY, B.P. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free *Citrus* clones. **HortScience**, Alexandria, v.7, p.118-119, 1972.
- MURASHIGUE, T. E.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-479, 1962.
- NAVARRO, L.; ROISTACHER, C.N.; MURASHIGE, T. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free *Citrus*. **Journal American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v.100, p.471-479, 1975.
- 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.
- OBEIDY, A.A.; SMITH, M.A.L. A versatile new tactic for fruit tree micrografting. **HortTechnology**, v.1, p.91-95, 1991.
- PASQUAL, M. & ISHIDA, J.S. Influência de reguladores de crescimento sobre a proliferação *in vitro* de brotos do porta-enxerto de macieira 'MI-193'. **Revista Ceres**, v.39, n.226, p. 584-590, 1992.
- PEDROTTI, E.L. **Etude de l'organogénèse *in vitro* à partir de racines, de feuillets et d'embryons zygotiques de merisier (*Prunus avium* L.)** 167p. Tése (Doutorado em fisiologia vegetal)- Université d'Orléans, Orléans, 1993.
- PEDROTTI, E.L.; VOLTOLINI, J.A. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização dos porta-enxertos de macieira Marubakaido e M9. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal. V.23, n.2, p.234-239, 2001.
- POSPÍŠLOVÁ J., CATSKÝ J.; SEŠTÁK Z. Photosynthesis in plant cultivated *in vitro*, in: Handbook of photosynthesis, Pessaraki (ed.), Nova York (USA), p. 525-540. 1997.
- RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F. Parada de crescimento de mudas de macieira da cv. Gala, clone FZ, durante a aclimatização em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 14, n. 2, p. 145-152, 1992.
- ROGERS, R.B.; SMITH, M.A.L. Consequences of *in vitro* and *ex vitro* root initiation for miniature rose production. **Journal of Horticultural Science**, England, v. 67, n.4, p. 535-540, 1992.
- SCHACKEL, K.A.; NOVELLO, V.; SUTTER, E.G. Stomatal function and cuticular conductance in whole tissue-cultured apple shoots. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.115, n.3, p.468-472, 1990.
- SCIUTTI, R.; MORINI, S. Effect of relative humidity *in vitro* culture on some growth characteristics of a plum rootstock during shoot proliferation and rooting and on plantlet survival. **Advances in Horticultural Science**, Firenze, 7, p. 153-156, 1993.
- SOUZA, T.V.; ABREU, M.F.; TARAIZI, R.; DANTAS, A.C.M.; PEDROTTI, E.L. Controle de contaminantes na cultura de tecidos em macieira (*Malus* spp.) **Anais do I Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas**, Lavras. p.346. 2003.
- SUTTER, E. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Washington, v.113, n.2, p.234-238, 1988.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Redwood City: Benjamin: Cummings, 1991. 559p.
- WANG, Q. Factors affecting rooting of microcuttings of the pear rootstock BP10030. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 45, p. 209-213, 1991.
- ZANOL, G.C. **Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto Marubakaido (*Malus domestica*) afetado pela exposição de períodos de escuro, concentrações de ácido indolbutírico e floriglucinol**. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Fruticultura de Clima Temperado) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1996, 81p.
- ZIV, M. *In vitro* acclimatization. In. Automation and environmental control in plant tissue culture., Dordrecht, Holland: Kluwer Academic Publishers, 1995, 535p.

