

## Substratos na indução e desenvolvimento *in vitro* de raízes em dois porta-enxertos de macieira<sup>(1)</sup>

Alexandre Hoffmann<sup>(2)</sup>, Moacir Pasqual<sup>(3)</sup>, Nilton Nagib Jorge Chalfun<sup>(3)</sup> e Sílvia Serra Negra Vieira<sup>(4)</sup>

Resumo – Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito da vermiculita e do Plantmax como substratos alternativos ao ágar durante a indução e o desenvolvimento *in vitro* de raízes dos porta-enxertos de macieira ‘Marubakaido’ e ‘M-26’. Foram utilizadas brotações apicais previamente cultivadas *in vitro*. O experimento foi dividido em duas fases. Na primeira fase, os tratamentos consistiram no uso de três substratos para a indução do enraizamento: ágar, Plantmax + ágar e vermiculita + ágar, com meio MS/2 acrescido de vitaminas, glicina, mio-inositol, sacarose e ácido indolbutírico (AIB). Após sete dias neste meio, as brotações foram recultivadas para meio MS com ágar (7 g L<sup>-1</sup>), sem AIB. Na segunda fase, foram testados três substratos para o desenvolvimento das raízes adventícias (ágar, Plantmax e vermiculita, umedecidas com meio MS), após sete dias de indução em meio com ágar (7 g L<sup>-1</sup>). O efeito dos tratamentos foi estudado no ambiente *in vitro* e durante a aclimatização das plantas. O ágar, na fase de indução do enraizamento e o ágar ou Plantmax, na fase de desenvolvimento das raízes adventícias, proporcionaram os melhores resultados, tanto para ‘Marubakaido’ como para ‘M-26’, no enraizamento *in vitro* e durante a aclimatização.

Termos para indexação: cultura de tecidos, enraizamento, raízes adventícias, micropropagação, vermiculita.

### Substrates for *in vitro* adventitious root induction and development on two apple rootstocks

Abstract – This work was carried out to study the effect of vermiculite and Plantmax as alternative substrates for agar during both *in vitro* rooting induction and adventitious root development on ‘Marubakaido’ and ‘M-26’ apple (*Malus domestica* Borkh.) rootstocks. Apical shoots previously maintained *in vitro* were used. This experiment was divided in two phases. On phase 1, treatments were constituted by three substrates for rooting induction: agar, Plantmax + agar and vermiculite + agar, with MS/2 medium with vitamins, glycine, myoinositol, sucrose and indolebutyric acid (IBA). After seven days in this medium, shoots were transferred to medium with agar (7 g L<sup>-1</sup>) and without IBA. On phase 2, three substrates were assayed for adventitious roots development (agar, Plantmax and vermiculite, wetted with MS medium) after a seven-day induction time on a medium with agar (7 g L<sup>-1</sup>). The effect of treatments was evaluated both *in vitro* and during environment acclimatization. The use of agar during rooting induction and agar or Plantmax, during adventitious root development provided the best results for ‘Marubakaido’ and ‘M-26’ plantlets, on *in vitro* rooting and during acclimatization.

Index terms: tissue culture, rooting, adventitious roots, micropropagation, vermiculites.

### Introdução

A cultura da macieira apresenta grande importância no cenário frutícola brasileiro e mundial.

<sup>(1)</sup> Aceito para publicação em 16 de fevereiro de 2001.

Extraído da Tese de Doutorado do primeiro autor apresentada à Universidade Federal de Lavras (Ufla), Lavras, MG.

<sup>(2)</sup> Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho, Caixa Postal 130, CEP 95700-000 Bento Gonçalves, RS. E-mail: hoffmann@cnpuv.embrapa.br

<sup>(3)</sup> Ufla, Dep. de Agricultura, Caixa Postal 37, CEP 37200-000 Lavras, MG. E-mail: mpasqual@ufla.br, dag@ufla.br

<sup>(4)</sup> Ufla. Bolsista do Pibic/CNPq. E-mail: ssnv@ufla.br

Nos últimos 25 anos, a produção brasileira evoluiu de forma a atender a quase toda a demanda interna de maçãs. O uso de mudas de alta qualidade é um dos requisitos para a elevada produtividade e longevidade dos pomares e, para tanto, a micropropagação destaca-se como técnica para produção de mudas isentas de doenças, principalmente viroses.

O método convencional de micropropagação consiste no enraizamento *in vitro* de brotações em meio geleificado com ágar, com a posterior transferência das plantas enraizadas para casa de vegetação. Porém, o sistema radicular adventício emitido em meio

semi-solidificado com ágar ou produto equivalente é, em geral, pouco ramificado, quebradiço e isento de pêlos radiculares (Leite, 1995), de modo que as raízes assim formadas são pouco eficientes na absorção de água e nutrientes durante a aclimatização. Apter et al. (1993) e Leite (1995) também apontam a baixa qualidade da raiz formada em ágar como uma das causas da baixa sobrevivência das plantas durante a aclimatização, além de ser o componente de maior custo do meio de cultura.

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

O uso de substratos alternativos para o enraizamento visando a obtenção de um sistema radicular mais apropriado para a adaptação da planta em casa de vegetação já foi testado em diversos trabalhos e pode ser útil em sistemas intensivos de micropropagação. Grattapaglia & Machado (1998) mencionam que a vermiculita, perlita ou espumas de poliuretano embebidas com meio líquido podem ser alternativas mais baratas e dar melhores resultados que o ágar. Hutchinson (1984), trabalhando com enraizamento de explantes de macieira 'Northern Spy' em meio líquido e em meios com areia grossa, perlita ou ágar, obteve 90 a 100% de iniciação de raízes nos três meios, mas houve pouco crescimento das raízes em ágar. Leite (1995) obteve, em relação ao ágar, maior ramificação do sistema radicular e maior densidade de pêlos absorventes em explantes de pereira com a utilização de vermiculita como substrato para enraizamento, concluindo que este material substitui com vantagens o ágar, além de ser mais barato. Navatel & Bourrain (1994) obtiveram maior crescimento apical em mudas de macieira e nogueira micropropagadas, durante a aclimatização, quando o enraizamento ocorreu em vermiculita umedecida com meio MS líquido.

Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito de diferentes substratos, alternativos ao ágar, sobre o enraizamento e a aclimatização de plantas micropropagadas dos porta-enxertos de macieira 'Marubakaido' e 'M-26' nas fases de indução do enraizamento *in vitro*, bem como de desenvolvimento das raízes adventícias.

### Material e Métodos

O experimento foi realizado utilizando brotações apicais dos porta-enxertos de macieira 'Marubakaido' (*Malus prunifolia*) e 'M-26' (*Malus* sp.), obtidas *in vitro*. Na transferência para o meio de enraizamento, as brotações foram preparadas com cerca de 2 a 3 cm de comprimento (4 a 6 gemas), retirando-se as folhas inferiores e mantendo-se o meristema apical e dois pares de folhas próximas ao meristema.

Foram testados três substratos para a indução do enraizamento *in vitro* e três substratos para o desenvolvimento das raízes adventícias em brotações dos dois porta-enxertos. O experimento foi desenvolvido em duas fases.

Na primeira fase, metade das brotações dos dois porta-enxertos foram recultivadas para meio de cultura com a metade da concentração dos sais de MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de vitaminas (1,5 mg L<sup>-1</sup>), glicina (2,0 mg L<sup>-1</sup>), mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), sacarose (30 g L<sup>-1</sup>) e AIB (1,0 mg L<sup>-1</sup>). Os tratamentos consistiram no uso de três substratos para a indução do enraizamento: ágar (4,2 g L<sup>-1</sup>); Plantmax (36 g/frasco) + ágar (2,8 g L<sup>-1</sup>) e vermiculita de grânulos finos (7,2 g/frasco) + ágar (2,8 g L<sup>-1</sup>). Plantmax é um substrato comercial, elaborado com vermiculita expandida e materiais orgânicos de origem vegetal, isento de pragas, doenças e invasoras. Em cada frasco (250 cm<sup>3</sup>), foram adicionados 40 mL de meio de cultura. O período de indução do enraizamento foi de sete dias, em sala de crescimento com temperatura de 27±2°C, fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de 47 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, proporcionada por lâmpadas fluorescentes brancas de 40 watts. Após a indução, as brotações foram transferidas para o meio de cultura com a concentração normal dos sais de MS, vitaminas, glicina e mio-inositol, porém isento de AIB e solidificado com 7 g L<sup>-1</sup> de ágar, para desenvolvimento das raízes adventícias.

Na segunda fase, metade das brotações dos dois porta-enxertos foram recultivadas para meio de cultura de indução do enraizamento, com metade da concentração dos sais de MS, acrescido de vitaminas (1,5 mg L<sup>-1</sup>), glicina (2,0 mg L<sup>-1</sup>) e mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), sacarose (30 g L<sup>-1</sup>) e AIB (1,0 mg L<sup>-1</sup>), solidificado com ágar (7 g L<sup>-1</sup>), onde

foram mantidas durante sete dias, em frascos com 250 cm<sup>3</sup> de capacidade. Os tratamentos consistiram no uso de três substratos para desenvolvimento das raízes adventícias: ágar (7 g L<sup>-1</sup>), Plantmax (48 g/frasco) e vermiculita de grânulos finos (14 g/frasco), nos quais foram adicionados 40 mL de meio de cultura MS, com a concentração normal dos sais e isento de AIB.

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

Após o período de enraizamento, as raízes das plantas ou a base das brotações foram lavadas com água destilada e, tanto as brotações enraizadas quanto as não-enraizadas, foram recultivadas para substrato comercial (Plantmax), acondicionado em bandejas de isopor com 128 células de 50 cm<sup>3</sup> cada, e levadas para aclimatização em casa de vegetação com nebulização intermitente e sombreamento parcial proporcionado por dupla camada de tela de sombreamento. Após 49 dias de aclimatização foi realizada a avaliação final, sendo determinados a sobrevivência, altura da planta, número de raízes primárias e matéria seca da raiz e da parte aérea.

Foi adotado o delineamento experimental inteiramente ao acaso, com quatro repetições e sete brotações ou plantas por repetição. Em relação às variáveis número de raízes primárias, percentual de enraizamento, altura e sobrevivência de plantas, quando tomadas periodicamente, foi adotado o esquema de parcelas subdivididas no tempo. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

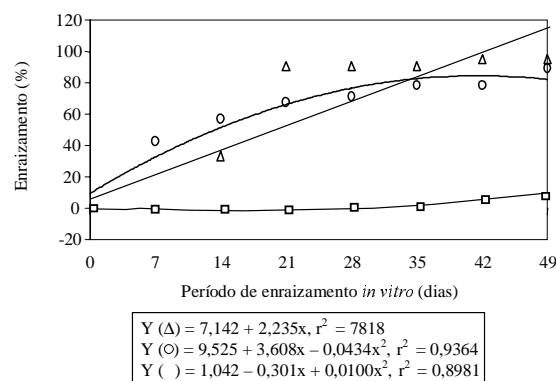
## Resultados e Discussão

### Primeira fase: Substratos na indução do enraizamento

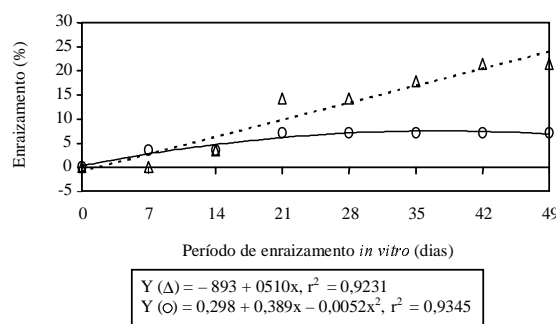
O percentual de brotações enraizadas evoluiu ao longo do tempo de forma diferenciada entre os tratamentos, tendo ocorrido interação significativa entre os fatores tempo, porta-enxerto e substrato. Em 'Marubakaido', houve aumento linear do percentual de enraizamento quando este foi induzido em ágar, e quadrático quando a indução ocorreu em vermiculita + ágar ou Plantmax + ágar (Figura 1). Quanto ao porta-enxerto 'M-26', observou-se comportamento semelhante (Figura 2), exceto quando

utilizado o Plantmax + ágar como substrato para indução, no qual não houve formação de raízes adventícias. Quando utilizada a vermiculita, há maior aeração, necessária ao fornecimento de oxigênio para a respiração, o que proporcionou resposta mais rápida em emissão de raízes após o recultivo (Leite, 1995; Druart et al., 1997). Porém, ao se aproximar o final do período para enraizamento (49 dias), os percentuais de brotações enraizadas foram semelhantes entre ágar e ágar + vermiculita ('Marubakaido'), e superiores em ágar ('M-26').

Após 49 dias de permanência das brotações em meio para desenvolvimento das raízes adventícias, observou-se interação entre os fatores porta-enxer-



**Figura 1.** Evolução do percentual de brotações de macieira 'Marubakaido' enraizadas *in vitro*, sob efeito de diferentes substratos ( $\Delta$ : ágar; O: vermiculita;  $\square$ : plantmax) para indução do enraizamento. Lavras, Ufla, 1999.



**Figura 2.** Evolução do percentual de brotações de macieira 'M-26' enraizadas *in vitro*, sob efeito de dois substratos ( $\Delta$ : ágar; O: vermiculita) para indução do enraizamento. Lavras, Ufla, 1999.

to e substrato na indução em relação à variável enraizamento (Tabela 1). A indução do enraizamento em ágar e vermiculita + ágar ('Marubakaido') e em ágar ('M-26') proporcionou os maiores percentuais de enraizamento. Tanto em ágar quanto em vermiculita + ágar, houve diferença significativa entre os porta-enxertos. Em 'Marubakaido', os percentuais foram de 95,24 e 89,28% e, em 'M-26', de 21,43 e 7,15%, respectivamente, indicando a dificuldade de enraizamento do porta-enxerto 'M-26'. A facilidade de enraizamento de 'Marubakaido' também foi apontada por Jones & Aldwinckle (1991). Não houve diferença entre os porta-enxertos apenas quando utilizado o Plantmax + ágar, pois nesse caso ocorreram percentuais muito baixos de enraizamento nos dois porta-enxertos. Nunes et al. (1999) observaram que o Plantmax não foi eficiente como substrato para a aclimatização de 'Marubakaido', o que foi atribuído à sua composição química, prevista para o uso na produção de mudas de hortaliças e não especificamente para uso com plantas oriundas do ambiente *in vitro*.

O número de raízes primárias emitidas nas brotações de 'Marubakaido' foi significativamente superior quando utilizado o ágar como substrato para indução, e em 'M-26' não houve diferença entre os substratos. Quando a indução ocorreu em ágar e em

vermiculita + ágar, o número de raízes primárias foi superior em 'Marubakaido', em relação a 'M-26'. Em ambos os porta-enxertos, o ágar proporcionou o maior crescimento em altura da planta ou brotação, e não houve diferença entre os porta-enxertos apenas quando utilizado o Plantmax + ágar na indução do enraizamento. Genótipos com maior dificuldade de enraizamento tendem a manifestar ainda mais problemas quando expostos a condições menos favoráveis (Haissig & Riemenschneider, 1988). Simões (1988), trabalhando com laranjeira 'Pera', observou que o meio de cultura condicionou o padrão morfológico das raízes. Segundo o mesmo autor, as raízes crescidas em ágar, ao continuarem seu desenvolvimento em vermiculita, desenvolveram estrutura semelhante à de raízes oriundas de sementes, possuindo pêlos absorventes, córtex mais compacto e com espaços intercelulares menores.

Após 49 dias de aclimatização, a sobrevivência de plantas de 'Marubakaido' foi superior quando a indução do enraizamento ocorreu em Plantmax + ágar (78,6%) e em vermiculita + ágar (50,0%), caracterizando o efeito da aeração do substrato sobre a resistência física e fisiológica das mudas à aclimatização, mesmo considerando o tempo posterior de enraizamento *in vitro* (Tabela 2). Este resultado está de acordo com Le & Collet (1991), os quais, traba-

**Tabela 1.** Percentual de brotações enraizadas, número de raízes primárias e altura da planta ou brotação de dois porta-enxertos de macieira após 49 dias de enraizamento *in vitro* sob efeito de três substratos para indução do enraizamento. Lavras, Ufla, 1999<sup>(1)</sup>.

Substrato	Enraizamento (%)		Raízes primárias (nº)		Altura da planta (cm)	
	Marubakaido	M-26	Marubakaido	M-26	Marubakaido	M-26
Ágar	95,24aA	21,43aB	6,37aA	1,25aB	1,67aA	1,18aB
Vermiculita + ágar	89,28aA	7,15aB	3,31bA	1,25aB	1,18bA	0,45bB
Plantmax + ágar	10,72bA	0,00bA	0,50cA	0,00aA	0,72cA	0,43bA

<sup>(1)</sup>Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; os coeficientes de variação em relação ao enraizamento, número de raízes primárias e altura da planta foram de 13,98%, 15,61% e 19,38%, respectivamente.

**Tabela 2.** Sobrevivência e número de raízes primárias de dois porta-enxertos de macieira, após 49 dias de aclimatização, sob efeito de três substratos para indução do enraizamento. Lavras, Ufla, 1999<sup>(1)</sup>.

Substrato	Sobrevivência (%)		Raízes primárias (nº)	
	Marubakaido	M-26	Marubakaido	M-26
Ágar	38,10bA	39,28aA	15,08aA	3,88aB
Vermiculita + ágar	50,00abA	28,57aA	8,00bA	3,17aA
Plantmax + ágar	78,57aA	25,00aB	6,25bA	2,25aA

<sup>(1)</sup>Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, os coeficientes de variação em relação à sobrevivência, e ao número de raízes primárias foram de 25,50% e 20,75%, respectivamente.

lhando com enraizamento dos porta-enxertos 'M-26' e 'Mac 9', comprovaram que a sobrevivência e o desenvolvimento das mudas durante a aclimatização é estreitamente dependente do substrato e da cultivar. Com 'M-26', não houve efeito do substrato sobre esta variável. A diferença entre os dois porta-enxertos somente foi observada quando usado o Plantmax + ágar. Embora quando utilizado o Plantmax + ágar como substrato de indução o enraizamento *in vitro* tenha sido próximo de zero ('Marubakaido') ou nulo ('M-26'), verifica-se a superioridade deste substrato na sobrevivência das plantas. Como foram repicadas todas as brotações, independentemente da formação de raízes, a qual ocorreu somente após as brotações terem sido transferidas para a aclimatização, pode-se deduzir que o enraizamento ocorreu até mesmo *ex vitro*, após os sete dias de indução em Plantmax + ágar. O número de raízes primárias foi afetado pelo substrato de indução do enraizamento apenas em 'Marubakaido', sendo que a indução em meio com ágar proporcionou o maior valor (15,1 raízes/planta), de acordo com o que foi observado quando as plantas foram retiradas do cultivo *in vitro*. A diferença entre os substratos foi observada apenas quando utilizado o ágar.

### Segunda fase: Substratos no desenvolvimento *in vitro* de raízes

Após 49 dias de enraizamento *in vitro*, a altura das brotações (enraizadas e não-enraizadas) foi afetada pelos fatores substrato e porta-enxerto, sendo a interação porta-enxerto x substrato não-significativa. Nos três substratos, a altura das plantas do porta-enxerto 'M-26' foi significativamente inferior à das plantas de 'Marubakaido' (Tabela 3). Em 'Marubakaido', o desenvolvimento das raízes adventícias em meio com ágar ou com vermiculita proporcionou maior altura das plantas, em relação ao Plantmax, ao passo que em

'M-26' o ágar proporcionou valores superiores aos da vermiculita e do Plantmax. Possivelmente, a maior facilidade de acesso dos nutrientes ao explante no meio solidificado com ágar foi o principal fator a contribuir para esse resultado. O contato físico do substrato com o explante tende a favorecer o enraizamento (McCown, 1988), e isto foi notado principalmente com o ágar. Além disso, a alta capacidade de adsorção de nutrientes pela vermiculita (Hartmann et al., 1990) pode ter tido influência sobre os resultados. Quando utilizado o ágar como substrato para o enraizamento, o número de raízes primárias foi superior em 'Marubakaido', exceto quando utilizado o Plantmax, no qual o número de raízes em 'M-26' foi superior em relação ao 'Marubakaido' (Tabela 3). Apenas quando utilizada a vermiculita não houve diferença entre os porta-enxertos, devido aos baixos valores obtidos com este substrato.

O percentual de enraizamento de brotações foi afetado pelo substrato, em ambos os porta-enxertos, somente havendo diferenças entre porta-enxertos quando utilizado o Plantmax para desenvolvimento das raízes (Tabela 4). Em 'Marubakaido' o ágar proporcionou o maior percentual de enraizamento (85,71%), ao passo que em 'M-26', tanto o ágar quanto o Plantmax foram eficientes como substratos para desenvolvimento *in vitro* das raízes adventícias (72,14 e 71,14%, respectivamente). Segundo George (1993), o enraizamento *in vitro* em substratos porosos, como areia, perlita, espuma e outros, também facilita a repicagem, pois as plantas podem ser transferidas do frasco de cultura com poucos danos às raízes. Collet et al. (1994) observaram que a imersão das brotações em meio líquido causou maior efeito prejudicial ao enraizamento das brotações em genótipos de maior dificuldade de enraizamento, pois

**Tabela 3.** Altura e número de raízes primárias de plantas de dois porta-enxertos de macieira, após 49 dias de enraizamento *in vitro*, sob efeito de três substratos para desenvolvimento das raízes adventícias. Lavras, Ufla, 1999<sup>(1)</sup>.

Substrato	Altura da planta (cm)		Raízes primárias (n <sup>o</sup> )	
	Marubakaido	M-26	Marubakaido	M-26
Ágar	2,51aA	2,01aB	9,91aA	3,66aB
Vermiculita	2,05aA	1,09bB	0,20cA	0,00bA
Plantmax	1,77bA	1,18bB	2,00bB	4,02aA

<sup>(1)</sup>Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; os coeficientes de variação em relação à altura da planta e número de raízes primárias foram de 14,04% e 23,77%, respectivamente.



a deficiência de oxigênio nas camadas de células externas, adjacentes ao meio de cultura, inibiu o desenvolvimento das raízes. Além disso, como afirmam Pinker et al. (1995), em trabalho com *Tilia cordata*, a sobrevivência de brotações é maior quando o enraizamento ocorre *in vitro* e é acompanhado de um pré-condicionamento, com uso de substratos porosos e menor umidade, favorecendo a aclimatização.

Apesar disso, a vermiculita foi o substrato menos eficiente, provavelmente devido aos grandes espaços intercelulares existentes nesse material, o que dificulta a aderência do explante e causa a sua morte. Esta observação está de acordo com os resultados obtidos por Avanzato & Cherubini (1993), que constataram uma relação inversa entre a capacidade de retenção de água do substrato e a sua capacidade em promover o desenvolvimento das raízes. Esses autores observaram melhor desenvolvimento de raízes adventícias de macieira 'MM 106' quando utilizado como substrato a perlita, cuja característica principal é a excelente aderência ao explante, mantendo as células túrgidas e com maior capacidade de multiplicação, o que está diretamente associado ao desenvolvimento das raízes. Entretanto, Nunes et al. (1999) atestaram ser a vermiculita o substrato mais eficiente para a aclimatização. Os resultados mais favoráveis obtidos por esses autores em relação ao presente trabalho podem ser atribuídos à gradação mais fina e ao uso de mudas já enraizadas.

Quando o desenvolvimento das raízes ocorreu em vermiculita e em Plantmax, formaram-se raízes mais curtas e com maior densidade de pêlos radiculares, devido à maior aeração nesses substratos, em relação ao meio solidificado com ágar. Especialmente em 'Marubakaido', a morte de brotações foi muito elevada, atingindo 14,29% (Plantmax) e 62,86% (vermicu-

lita). Nesses substratos, ocorreu maior morte de brotações em 'Marubakaido'. Isto ocorreu provavelmente porque as brotações do 'M-26' possuem composição morfológica diferente das do 'Marubakaido', com brotações mais espessas e com maior teor relativo de água e reservas, o que, provavelmente, permitiu a sobrevivência da brotação mesmo sem o seu enraizamento. Portanto, as brotações de 'Marubakaido' enraizam com maior facilidade, porém as de 'M-26' resistem melhor ao dessecamento e à morte antes do enraizamento. McCown (1988) menciona que a qualidade da brotação é fundamental para o enraizamento e a aclimatização. Neste trabalho, a composição morfológica de 'M-26' favoreceu o enraizamento e a sobrevivência.

A presença de espaços porosos no substrato, embora favoreça a aeração, pode prejudicar o enraizamento *in vitro*, o que pode ser comprovado quando utilizado o ágar, condição em que nenhuma brotação morreu. Comparando-se esses resultados com os obtidos na primeira fase do experimento, no qual a vermiculita proporcionou porcentuais de enraizamento *in vitro* equivalentes aos do ágar, pode-se afirmar que a aeração parece ser mais importante na fase de indução do que propriamente durante o desenvolvimento das raízes adventícias, embora, como mencionado por Hutchinson (1984), utilizando-se a areia como meio de enraizamento *in vitro*, o aumento no número e comprimento de raízes pode ser devido à aeração do meio, pois há relação direta entre este fator e o enraizamento das brotações. Segundo George (1993), o enraizamento é um fenômeno que implica o uso de reservas da brotação ou estaca, para o qual é requerida uma intensa atividade respiratória e, para tanto, a aeração no substrato é importante. Caldas et al. (1998) mencionaram que, na

**Tabela 4.** Enraizamento e morte de brotações de dois porta-enxertos de macieira, após 49 dias de enraizamento *in vitro*, sob efeito de três substratos para desenvolvimento das raízes adventícias. Lavras, Ufla, 1999<sup>(1)</sup>.

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

<sup>(1)</sup>Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; os coeficientes de variação em relação enraizamento e a morte de brotações foram de 23,36% e 21,33%, respectivamente.

fase de enraizamento *in vitro*, a vermiculita, umedecida com solução nutritiva, pode favorecer a formação de raízes, pelo maior grau de aeração que proporciona.

Ao final do período de aclimatização, a sobrevivência foi afetada somente pelo substrato, e somente houve diferença entre o ágar e a vermiculita (Tabela 5). É provável, entretanto, que o longo período destinado ao enraizamento (49 dias) tenha afetado negativamente a sobrevivência das plantas. A altura das plantas diferiu entre substratos apenas em 'Marubakaido', e o desenvolvimento das raízes em ágar ou Plantmax proporcionou os maiores valores (2,64 e 2,32 cm, respectivamente). Não houve diferença entre porta-enxertos para quaisquer substratos. O número de raízes primárias foi afetado pelos fatores estudados, obtendo-se os maiores valores em ágar e Plantmax, em ambos os porta-enxertos. Nesses dois substratos, o número de raízes primárias em 'M-26' foi significativamente maior do que em 'Marubakaido'. Constata-se, assim, que em ambos os porta-enxertos, os maiores valores para as variáveis analisadas após a aclimatização foram obtidos com ágar e Plantmax como substratos para o desenvolvimento *in vitro* das raízes. Os resultados

obtidos neste experimento estão em acordo com os obtidos por Hutchinson (1984) que, trabalhando com macieira, nas fases de enraizamento e aclimatização, obtiveram bons resultados com areia, perlita e ágar, o que não ocorreu quando foram utilizadas a celulose e a vermiculita. Já Aldrufe (1987) sugeriu, para o enraizamento *in vitro* de *Pelargonium zonale*, o uso da celulose, perlita e vermiculita. Embora Druart et al. (1997) tenham observado que o ágar foi dispensável quando utilizada a vermiculita umedecida com água no enraizamento de brotações de macieira e tenham mencionado que a falta de aeração no substrato inibiu o enraizamento *in vitro*, neste trabalho foi constatada a importância do ágar na rizogênese desses porta-enxertos.

A matéria seca, das raízes e da parte aérea, foi afetada pelos fatores estudados, e foi significativa a interação entre eles (Tabela 6). Para ambas as variáveis, em 'Marubakaido', o ágar proporcionou o melhor resultado, e em 'M-26' os maiores valores foram obtidos com ágar e com Plantmax. Houve diferença entre porta-enxertos quando utilizado o Plantmax (MS das raízes e MS da parte aérea), bem como com a vermiculita (MS da parte aérea).

**Tabela 5.** Sobrevivência, altura das plantas e número de raízes primárias de dois porta-enxertos de macieira após 49 dias de aclimatização sob efeito de três substratos para desenvolvimento das raízes adventícias. Lavras, Ufla, 1999<sup>(1)</sup>.

Substrato	Sobrevivência (%)		Altura da planta (cm)		Raízes primárias (n°)	
	Marubakaido	M-26	Marubakaido	M-26	Marubakaido	M-26
Ágar	41,57aA	44,64aA	2,64aA	2,27aA	14,96aB	25,20aA
Vermiculita	8,33bA	14,29bA	1,50bA	1,72aA	2,20bA	8,80bA
Plantmax	32,14abA	37,62abA	2,32aA	1,88aA	11,32aB	33,84aA

<sup>(1)</sup>Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; os coeficientes de variação em relação à sobrevivência, altura da planta e ao número de raízes primárias foram de 29,77%, 17,26% e 24,97%, respectivamente.

**Tabela 6.** Matéria seca das raízes e da parte aérea de plantas de dois porta-enxertos de macieira, após 49 dias de aclimatização, sob efeito de três substratos para desenvolvimento das raízes adventícias. Lavras, Ufla, 1999<sup>(1)</sup>.

Substrato	Matéria seca das raízes (mg/planta)		Matéria seca da parte aérea (mg/planta)	
	Marubakaido	M-26	Marubakaido	M-26
Ágar	64,20aA	73,70aA	74,70aA	77,80aA
Vermiculita	4,00bA	17,40bA	4,70bB	26,50bA
Plantmax	18,30bB	71,80aA	27,3bB	83,50aA

<sup>(1)</sup>Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; os coeficientes de variação em relação à matéria seca das raízes e da parte aérea foram de 25,76% e 27,60%, respectivamente.

Quando o substrato influenciou o enraizamento *in vitro*, observou-se que as características das raízes adventícias também tiveram efeito sobre o crescimento das plantas durante a aclimatização, o que demonstra a importância da condição da planta ao deixar o cultivo *in vitro*. O ágar provoca redução da disponibilidade de oxigênio (Moncousin, 1991). Embora essa redução não tenha prejudicado a rizogênese, sua substituição por outros materiais, como o Plantmax, mostrou-se promissora. Porém, alguns ajustes deste método deverão ser buscados, como forma de viabilizar o seu uso e obter maior enraizamento *in vitro* e melhor qualidade do sistema radicular, com influência sobre a aclimatização.

### Conclusões

1. O substrato afeta o crescimento das plantas dos porta-enxertos de macieira 'Marubakaido' e 'M-26' nas fases de indução, e desenvolvimento, *in vitro*, das raízes adventícias.

2. A indução do enraizamento é mais eficiente em ágar, seguido da mistura vermiculita + ágar, nos dois porta-enxertos estudados.

3. O melhor desenvolvimento das raízes adventícias em brotações dos porta-enxertos 'Marubakaido' e 'M-26' é obtido com emprego do ágar, porém a maior sobrevivência é obtida com plantas enraizadas em meio geleificado com ágar e em Plantmax.

### Referências

- ALDRUFEU, A. Rooting and acclimatization of *Pelargonium zonale* plantlets. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 212, p. 361-366, 1987.
- APTER, R. C.; McWILLIAMS, E. L.; DAVIES JUNIOR, F. T. *In vitro* and *ex vitro* adventitious root formation in Asian jasmine (*Trachelospermum asiaticum*): I. Comparative morphology. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 118, n. 6, p. 902-905, Nov. 1993.
- AVANZATO, D.; CHERUBINI, S. Influenza del substrato sulla radicazione diretta di microtalee *ex vitro* di melo MM106. **Informatore Agrario**, Roma, v. 49, n. 25, p. 77-78, 1993.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p. 87-132.
- COLLET, G. F.; NOWBUTH, L.; LE, C. L. Comparison of the easy-to-root Jork 9 and Cepiland and the difficult-to-root EMLA 9 and Lancep Malus M9 rootstocks *in vitro*. **Advances in Horticultural Science**, Florence, v. 8, n. 1, p. 45-48, 1994.
- DRUART, P.; OPATRYN, Z.; DE KLERK, G. J. Optimization of culture media for *in vitro* rooting of *Malus domestica* Borkh. cv. Compact Spartan. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 39, n. 1, p. 67-77, 1997.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. 2. ed. Edington: Exegetics, 1993. Part 1.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p. 183-260.
- HAISSIG, B. E.; RIEMENSCHNEIDER, D. E. Genetic effects on adventitious rooting. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. (Ed.). **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Diocorides, 1988. p. 47-60.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T. **Plant propagation: principles and practices**. 5. ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1990. 647 p.
- HUTCHINSON, J. F. Factors affecting shoot proliferation and root initiation in organ cultures of the apple 'Northern Spy'. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 22, n. 4, p. 347-358, 1984.
- JONES, A. L.; ALDWINCKLE, H. S. **Compendium of apple and pear diseases**. St. Paul: APS, 1991. 100 p.
- LE, C. L.; COLLET, G. F. Micropropagation de porte-greffe de pommier: III. Acclimatation de *Malus pumila* Mill. (M.26, MAC.9) et de *Malus domestica* Borkh. cv. Golden Delicious. **Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture**, Nyon, v. 23, n. 3, p. 201-204, 1991.
- LEITE, G. B. **Efeito de reguladores de crescimento, substratos, sacarose e intensidade luminosa na micropropagação de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Bartlett e do clone OH x F97**. Pelotas: UFPel, 1995. 50 p. Dissertação de Mestrado.
- McCOWN, B. H. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA,



- N. (Ed.). **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Diocorides, 1988. p. 289-302.
- MONCOUSIN, C. Rooting of *in vitro* cuttings. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry: high tech and micropropagation I**. Berlin: Springer, 1991. p. 231-261.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NAVATEL, J. C.; BOURRAIN, L. Influence of the physical structure of the medium on *in vitro* rooting. **Advances in Horticultural Science**, Florence, v. 8, n. 1, p. 57-59, 1994.
- NUNES, J. C. de 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.
- PINKER, I.; JESCH, H. H.; KLAUSCH, A. Bewurzelung und Akklimatisation *in vitro* vermehrter *Tilia cordata* 'Wega'-Sprosse. **Gartenbauwissenschaft**, Stuttgart, v. 60, n. 6, p. 253-258, 1995.
- SIMÕES, M. O. M. **Ontogênese de gemas e raízes adventícias de *Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck cv. Pêra cultivadas *in vitro***. Viçosa, MG: UFV, 1988. 56 p. Dissertação de Mestrado.