



PRODUÇÃO DE MUDAS FLORESTAIS POR VIA ASSEXUADA

EDUARDO PAGEL FLORIANO

Santa Rosa, 2004.



Produção de mudas florestais por via assexuada

Eduardo Pagel Floriano¹

Série Cadernos Didáticos

ANORGS

ASSOCIAÇÃO DE PESQUISA, EDUCAÇÃO E PROTEÇÃO AMBIENTAL DO NOROESTE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

Fundada em 17 de maio de 2002.

A ANORGS é uma associação civil sem fins lucrativos;

Tem como principais objetivos: a pesquisa ambiental, a educação ambiental, a proteção ambiental e a melhoria da qualidade de vida do ser humano desta e para as próximas gerações;

A ANORGS atende a todos sem discriminação, realizando e apoiando projetos ambientais.

630*2 Floriano, Eduardo Pagel
F000e Produção de mudas florestais por via assexuada,
Caderno Didático nº 3, 1ª ed./ Eduardo P. Floriano
Santa Rosa, 2004.
37 p. il.

ANORGS.

1. Mudas Florestais. 2. Estaquia e enxertia. 3. Micropropagação.
4. Série Didática 3. II. Título.

¹ Engenheiro Florestal, M.Sc.; Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal da Universidade Federal de Santa Maria, RS; Bolsista da CAPES.



CONTEÚDO

INTRODUÇÃO.....	1
MACROPROPAGAÇÃO ASSEXUADA MONOCLONAL	2
<i>Estaquia</i>	2
<i>Mergulhia</i>	9
<i>Clonagem nucelar</i>	11
PRODUÇÃO DE MUDAS DE <i>EUCALYPTUS</i> POR ESTAQUIA.....	11
<i>Seleção clonal</i>	13
<i>Produção de brotos</i>	13
<i>Preparação de estacas</i>	14
<i>Preparação de recipientes e substrato</i>	14
<i>Preparação do indutor de enraizamento</i>	15
<i>Enraizamento em casa de vegetação</i>	15
<i>Aclimação das mudas</i>	17
<i>Expedição de mudas</i>	17
<i>Armazenamento de materiais e ferramentas</i>	18
MACROPROPAGAÇÃO ASSEXUADA MULTICLONAL	18
<i>Influências exercidas entre cavalo e cavaleiro</i>	19
<i>Fatores que influenciam o pegamento de enxertos</i>	19
<i>Encostia</i>	20
<i>Garfagem</i>	21
<i>Sobre-enxertia</i>	23
<i>Borbulhia</i>	23
MICROPROPAGAÇÃO.....	24
<i>Cultura meristemática</i>	25
<i>Microenxertia</i>	26
<i>Cultura de embriões</i>	27
<i>Cultura de calos</i>	27
<i>Suspensão celular</i>	28
<i>Polinização e fertilização in vitro</i>	28
<i>Cultura de ovários</i>	28
<i>Cultura de protoplastos</i>	28
<i>Embriogênese somática</i>	29
<i>Laboratório de cultura de tecidos</i>	29
<i>Aplicações da cultura de tecidos</i>	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36



INTRODUÇÃO

A capacidade de se regenerar integralmente, formando indivíduos completos, a partir de uma única célula ou de qualquer parte de tecido do próprio corpo com células vivas, chamada de totipotência, é a característica dos vegetais que permite a sua reprodução somática (reprodução assexuada ou vegetativa), baseada exclusivamente na mitose. A reprodução assexuada também é chamada de clonagem, sendo utilizada para produzir indivíduos de alta produtividade e rápido crescimento, mais resistentes às pragas e doenças e aos extremos ambientais (secas, geadas, ventos, etc).

Para que a reprodução aconteça é necessário que as células do propágulo se diferenciem, regenerando cada um dos tecidos da planta adulta, processo chamado de organogênese, geralmente iniciando pelas raízes. Esta característica é inerente aos embriões das sementes, mas células adultas, já diferenciadas, às vezes não conseguem mais regenerar células de outros tecidos. Neste caso é necessário rejuvenecer a planta, órgão, ou tecido a ser utilizado na propagação. Algumas técnicas de rejuvenescimento são a poda e a cultura de tecidos *in vitro*.

A totipotência não se manifesta da mesma maneira em todas as espécies de plantas, sendo mais ou menos intensa nos diferentes tipos de células e sendo ativada por diferentes condições, dependendo da espécie. Esta excepcional capacidade de regeneração permite também que se uma parte de um indivíduo com parte de outro, para formar indivíduos completos, colocando-se as duas partes em contato íntimo, de forma que os tecidos em regeneração se unam, formando uma única planta.

Convencionou-se chamar a reprodução assexuada, quando se emprega uma parte grande de uma planta adulta, como a secção de um galho (estaca ou miniestaca), de **macropropagação**. E, de **micropropagação**, quando se emprega pequenos grupos de células, chamados de explantes, de plantas no início de seu desenvolvimento, ou de tecidos meristemáticos de plantas adultas. Há, também, duas formas principais de reprodução vegetativa com relação ao número de indivíduos empregados, a **monoclonal** e a **multiclonal**, a primeira envolvendo a reprodução de um único indivíduo e a segunda envolvendo dois ou mais indivíduos para formar uma nova planta.

O uso florestal da propagação vegetativa é vasto, desde a produção em massa de plantas melhoradas de pés francos ou de híbridos, até a obtenção de floração precoce de plantas destinadas à produção de sementes e frutos; mas também oferece riscos como a redução da base genética e segregação

genética em mudas provenientes de sementes de pomares instalados por estaquia de híbridos ou enxertados com híbridos (Brune, 1982).

MACROPROPAGAÇÃO ASSEXUADA MONOCLONAL

É o método de propagação assexuada que consiste em forçar o enraizamento de um ramo, broto, folha ou raiz, colocando-os em um meio adequado para que se forme uma nova planta completa, com todas as características da original. Pode ser realizada através de duas formas básicas, a estaquia e a mergulhia que diferem pela fase em que a parte que irá constituir a nova planta é destacada da planta mãe. Na estaquia, destaca-se uma secção de uma planta, seja parte de um ramo, folha ou raiz e, então, é induzido o desenvolvimento das raízes. Na mergulhia, a parte que irá constituir a nova planta é destaca após o enraizamento ter sido forçado. Além destes dois tipos, ainda existe um terceiro que ocorre em embriões provenientes de mitose, denominado de clonagem nucelar.

ESTAQUIA

É a técnica de reprodução vegetativa de maior utilização no meio florestal para produção de mudas de plantas selecionadas em larga escala. Na reprodução por estaquia há 4 fases que se pode distinguir, iniciando-se com a produção de brotos, seguida da preparação da estaca e do meio de crescimento, em terceiro o enraizamento e por fim a aclimação das mudas. As fases mais importantes são o enraizamento e a produção de brotos, porque limitam a possibilidade ou não e a quantidade de mudas a produzir. Plantas que não enraízam estão fora do processo, assim como plantas que não rebrotam; se enraizam ou produzem brotos com dificuldade, a quantidade de mudas que se pode obter é pequena, o que dificulta o uso em escala comercial.

Fatores que afetam a emissão de brotos

A emissão de brotos é influenciada pela espécie, região, época de corte e dimensões da planta mãe, conforme Kramer e Kozlowiski (1972), da seguinte forma:

- Espécie – A capacidade de emissão de brotos é comum nas folhosas e rara nas coníferas;
- Dimensão da planta mãe – Existe um tamanho ótimo para cada espécie e local; a capacidade de emitir brotos aumenta com a dimensão da planta até certo ponto, que é diferente para cada espécie; a partir deste, a capacidade de emitir brotos decresce;

- Região – A emissão de brotos em uma mesma espécie é influenciada pelas condições ambientais como a latitude, temperatura, umidade e tipo de solo; o sítio, quanto mais fértil e adequado para a espécie, maior a capacidade de emissão de brotos;
- Época de corte – Plantas cortadas no inverno têm maior emissão de brotos, pois têm maior concentração de substâncias de reserva; onde ocorrem geadas, plantas cortadas no final do inverno podem ter a brotação destruída pela geada, além de que as cepas podem ter vida mais curta.

Para cada espécie e procedência existe um ponto de ótimo equilíbrio entre as dimensões e acúmulo de substâncias de reserva e a idade das plantas, que devem ser pesquisados para se obter melhor resultado quanto ao vigor da rebrota (Brune, 1982).

Fatores que afetam o enraizamento das estacas

As raízes adventícias que se desenvolvem nas estacas podem advir de praticamente qualquer tipo de tecido, dependendo da espécie, sendo que algumas já possuem os primórdios radiculares antes do corte; em espécies de enraizamento difícil, geralmente todas as raízes se originam do tecido cicatricial que formado após o corte; vários fatores internos e ambientais influenciam no sucesso do enraizamento, entre eles estão (Kramer e Kozlowiski, 1972; Assis e Teixeira, 1999; Simão, 1998):

Fatores Internos

- Espécie – cada espécie tem diferente potencial de enraizamento em diferentes épocas do ano; espécies caducifólias enraizam melhor no outono e inverno, enquanto as de folhas perenes, na primavera e verão; há evidências que a formação de raízes de segmentos do caule é geneticamente controlada;
- Planta-mãe – quanto mais jovem, vigorosa e sadia, maior as chances de enraizamento;
- Explante – Quanto mais jovem o órgão da planta utilizada, melhor o enraizamento; explantes de ramos laterais enraizam melhor do que do ápice; num mesmo ramo, as estacas mais próximas da base enraizam melhor, o que está relacionado à concentração nas pontas de maior quantidade de nitrogênio e menor de hidratos de carbono;
- Estado fisiológico – Dependendo do tipo de estaca, lenhosa ou herbácea, há maior capacidade de enraizamento quando colhida

em estado de dormência ou de crescimento, respectivamente; geralmente, estacas herbáceas enraizam melhor do que as lenhosas;

- Hidratos de carbono e nitrogênio – Quanto maior o teor de substâncias de reserva e quanto maior a relação carbono/nitrogênio melhor o enraizamento; às vezes é necessário adicionar fontes de carboidratos ao meio de crescimento como a sacarose, ribose e glicose;
- Hormônios e fitoreguladores – Quanto maior a concentração natural dos hormônios: auxina, citocinina, ácido abscísico e etileno, melhor o enraizamento;
- Água – Quanto maior o teor de água retido nos tecidos, melhor o enraizamento;
- Envelhecimento - A maioria das plantas arbóreas sofre mudanças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas da fase juvenil para a adulta que afetam o potencial de clonagem, o vigor de crescimento e a resistência às pragas e doenças, dificultado a propagação vegetativa (Wendling e Xavier, 2001).

Muitas espécies de *Eucalyptus* enraizam bem quando jovens e com o tempo acumulam substâncias inibidoras que impedem o enraizamento; mas estacas de brotos adventícios às vezes se comportam como de plantas jovens (Brune, 1982).

Fatores ambientais

- Umidade – Quanto maior a umidade relativa do ar, melhor o enraizamento, pois evita o ressecamento das estacas;
- Temperatura – Quanto mais estável, melhor o enraizamento; cada espécie necessita de uma temperatura própria para o enraizamento, geralmente entre 12° C e 27° C;
- Luminosidade – Quanto maior a incidência sobre a parte aérea e menor sobre a parte subterrânea, melhor o enraizamento, mas o excesso pode ressecar as estacas; deve-se considerar também a influência do fotoperíodo;
- Meio de crescimento (substrato) – Cada espécie apresenta melhor enraizamento em um tipo de substrato; uma adubação equilibrada em um meio com boa aeração facilitam o enraizamento;
- Sanidade – Quanto melhor as condições de assepsia, melhor o enraizamento;
- pH – Há um pH ótimo para o enraizamento e alongamento das raízes de cada espécie, geralmente entre 4 e 7;

- CO₂ – O enraizamento é favorecido por maior concentração de CO₂ presente no ambiente.

Para espécies de *Eucalyptus*, o ambiente ideal é obtido com sombra parcial, substrato bem drenado, alta umidade relativa, temperatura amena e constante (Brune, 1982).

As raízes adventícias que se desenvolvem nas estacas podem ter duas diferentes procedências, dependendo da parte da planta utilizada e da espécie: há casos em que existem primórdios radiculares morfológicos no órgão ou tecido utilizado e, em outros, as raízes se formam a partir dos tecidos normais após a confecção da estaca. Os tecidos que originam raízes podem ser gemas dormentes do câmbio, gemas localizadas nas proximidades de ramos mortos ou danificados, regiões cambiais e liberinas dos tecidos do raio, parênquima de arranjo irregular, tecidos das folhas e ramos, meristema primário e tecido cicatricial. Geralmente, plantas de difícil enraizamento não possuem primórdios radiculares nos tecidos normais e todas as raízes se originam de tecido cicatricial que se desenvolve por divisões do câmbio e do parênquima liberiano, ou de qualquer célula viva que não tenha desenvolvido membrana secundária. (Kramer e Kozlowski, 1972).

Várias substâncias podem induzir ou inibir o enraizamento, sejam naturais ou artificiais. Algumas substâncias alelopáticas, produzidas por espécies com esta propriedade, estão presentes na matéria orgânica dos solos e podem ser inibidoras do enraizamento. Portanto, deve-se evitar os solos orgânicos como meio de cultura de estacas. Outros inibidores estão presentes na própria planta que se quer multiplicar. Algumas substâncias inibidoras do enraizamento podem ter o seu deslocamento para baixo bloqueado por corte da casca até o floema, algumas têm sua atividade impedida pela presença de uma segunda, outras ainda podem ser lixiviadas ou diluídas por lavagens sucessivas da estaca ou por um banho em água pura. Substâncias promotoras do enraizamento podem ser adicionadas ao meio de cultura ou introduzidas nas estacas através de mergulho em solução, pincelamento, etc; às vezes as estacas já possuem substâncias naturais indutoras do enraizamento em quantidade suficiente. Em alguns casos é possível fazer com que a planta produza grande quantidade de substâncias indutoras do enraizamento através de algum tipo de injúria mecânica, antes do corte das partes a multiplicar. (Simão, 1998)

Alguns tratamentos que se pode aplicar para induzir o enraizamento são relacionados a seguir (Kramer e Kozlowski, 1972; Simão, 1998):

Tratamentos mecânicos

Tratamentos mecânicos que promovem enraizamento geralmente são representados por algum tipo de injúria mecânica como descascamento, incisão, ou torção, que induzem a produção de auxinas e carboidratos, devido ao bloqueio da translocação dessas substâncias próximo ao local onde se deseja que ocorra a formação de raízes, e do aumento da quantidade de células parenquimatosas e indiferenciadas.

Outro tipo de tratamento que pode ser considerado mecânico é a impermeabilização das estacas para evitar ressecamento. Este tipo de tratamento associado com hormônios apresentou influência sobre o enraizamento da seringueira (Kalil Filho, 2000).

Tratamentos Fisiológicos

Os principais meios de tratamento fisiológico são o rejuvenescimento, o estiolamento e o tratamento com hormônios e fitoreguladores.

- Rejuvenescimento - Consiste na aplicação de tratamentos ou técnicas que visam retornar o estado fisiológico da planta do estado maduro para o estado juvenil (Wendling e Xavier, 2001);
- Estiolamento – O estiolamento é causado pela ausência de luz e se caracteriza por alterações fisiológicas associadas ao descoramento e amolecimento dos tecidos e, em algumas espécies, provoca um crescimento apical exagerado (estiolamento), ou brotações; o estiolamento, às vezes, aumenta a capacidade de enraizamento das áreas afetadas (Biasi *et. al.*, 2002);
- Hormônios e fitoreguladores – Algumas espécies possuem hormônios e fitoreguladores suficientes para a iniciação radicular (Simão, 1998), outras necessitam de tratamento com substâncias naturais ou sintéticas que induzem o enraizamento como o ácido indol butírico (AIB), naftilacético (ANA), indolacético (AIA), seus sais e ésteres de potássio, 2,4-D-diclorofenoxiacético (2,4-D) e 2,4,5-T; o tratamento é usado para promover a formação, aumentar o número e a qualidade das raízes e para obter uniformidade de enraizamento.

A auxina natural encontra-se, principalmente, nas gemas apicais e folhas novas dos ramos, influenciando na formação de raízes adventícias, movimentando-se da copa para as raízes. São exemplos de compostos sintéticos com atividade de auxina: AIA, AIB, ANA e (2,4-D). As citocininas (BAP, CIN, 2iP e ZEA) são substâncias químicas que estimulam a divisão celular; um exemplo de substância que têm atividade de citocinina é a quinetina, que em alta

concentração favorece a formação de gemas, mas não de raízes. Auxinas e citocininas são reguladores do crescimento com maior ação na regeneração de órgãos. Alta relação auxina / citocinina favorece a formação de raízes adventícias, o inverso, a formação de brotos. As giberelinas promovem o crescimento apical e não tem efeito sobre o enraizamento. O ácido abscísico é transportado através do floema e xilema, sendo encontrado nas folhas, nas gemas, nos frutos e nas sementes, tendo efeito regulador sobre a dormência, estômatos, suberização, entre outras funções. O gás etileno age sobre a maturação e abscisão de frutos, dormência de sementes e outros processos. (Kramer e Kozlowski, 1972; Simão, 1998; Assis e Teixeira, 1999).

Entre as substâncias que podem ter efeito inibidor do enraizamento estão o ABA, etileno, ZEA, 2iP, embora qualquer hormônio ou fitoregulador possa causar inibição de raízes dependendo da concentração (Assis e Teixeira, 1999).

Tratamentos sanitários

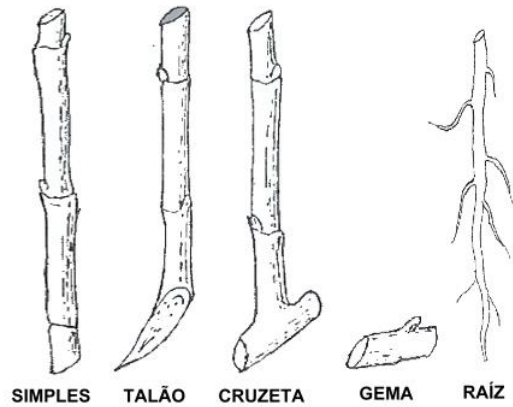
A sanidade, obviamente, também influencia o enraizamento. As medidas de assepsia comuns a muitas espécies constam de duas fases: Inicialmente, as estacas devem ser imersas em solução de hipoclorito de sódio numa concentração de 0,4% a 0,5% por 5 minutos, seguida de lavagem em água corrente por 5 minutos; depois, as estacas são colocadas em pé, imersas até a metade do comprimento em solução de fungicida sistêmico (benomyl), diluído à base de 0,5 g/l, durante 15 minutos (Carpanezzi *et al.*, 1999).

Tipos de estacas

Para cada espécie é necessário utilizar um tipo de estaca, desde as bem tenras e pequenas, até as lenhosas de grandes dimensões.

Estacas herbáceas são obtidas de ramos apicais recentes, ou de lançamentos de cepas. Devem ser colhidas pela manhã, enquanto estão túrgidas e com níveis elevados de substâncias que induzem o enraizamento como o ácido abscísico e o etileno. Estacas lenhosas são obtidas de ramos mais grossos, com idade entre 8 e 15 meses. (Simão, 1998).

Os principais tipos de estacas são os seguintes (Xavier *et al.*, 2003; Gomes, 1990):



Tipos de estacas (Simão, 1998).

Estaca simples

É obtida seccionando-se um ramo com diâmetro de 0,5 a 1,5 cm a cada 10 a 30 cm e deixando de 3 a 6 gemas por estaca; utiliza-se, principalmente, com várias espécies de *Eucalyptus*, na área florestal (Brune).

Estaca-talão

Escolhe-se um ramo jovem inserido em outro com cerca de dois anos; o corte é realizado extraíndo-se uma parte do lenho (talão) do ramo velho no ponto de inserção. É uma das opções para espécies de enraizamento difícil; o talão é que é enterrado;

Estaca-cruzeta

Semelhante ao anterior; é retirada uma parte maior do ramo velho, formando um "T" ou uma cruzeta; é usada para espécies que possuem raízes pré-formadas; ;

Estaca-tanchão

Estaca grande, com 60-80 cm de comprimento e mais de 4 cm de diâmetro. É utilizada para espécies que possuem raízes pré-formadas como a jabuticabeira e a oliveira;

Estaca-gema

É formada por uma só gema; usada quando não se possui material maior; requer os mesmos cuidados que os empregados na propagação de sementes;

Estaca-fascículo

Usada com espécies de *Pinus*. Cada fascículo tem uma gema dormente. Com *Pinus elliottii* e *Pinus taeda* é necessário fazer a gema crescer antes de promover o enraizamento com aplicação de citocinina, com *Pinus radiata*, a cresce por si (Brune, 1982).

Rebentos

São brotações como as do abacaxizeiro, bananeira e palmeiras que podem ser utilizadas para propagação direta (Toda Fruta, 2003);

Estaca-raiz

É usada com plantas de 2 a 3 anos, preferencialmente cortada até o fim do inverno com algumas espécies como pessegueiro, goiabeira e caquizeiro; devem ser plantadas com a polaridade correta; o caquizeiro é praticamente impossível de multiplicar por estacas caulinares, mas tem enraizamento razoável nas radiculares (Biasi et. al., 2002). Na área florestal, utiliza-se com espécies de *Populus*, *Cryptomeria japonica* e *Cunningamia Lanceolata* (Brune, 1982).

Miniestaca – É a estaca herbácea de plantas arbóreas obtida em minijardins clonais. Tem como vantagem o enraizamento mais fácil e sem uso de fitoreguladores ou hormônios para promovê-lo em algumas espécies, devido ao processo de rejuvenescimento que a planta sofre até a produção da estaca, passando por um processo de brotação de cepas de árvores e posterior estaquia para plantio em minijardim clonal. É utilizada atualmente com *Eucalyptus* em escala comercial.

MERGULHIA

É o processo de propagação vegetativa monoclonal em que se mergulha um ramo de uma planta no solo até enraizar, quando então é separado da planta mãe, transformando-se em uma muda.

É o método de propagação vegetativa que apresenta a mais alta porcentagem de enraizamento, embora seja de baixo rendimento. (Simão, 1998).

A mergulhia tanto pode ser realizada curvando-se o ramo até o solo como pelo envolvimento de um ramo com solo, sendo neste caso denominada de alporquia ou mergulhia aérea.

Tipos de mergulhia

Mergulhia simples

É o processo em que se mergulha um ramo de uma planta, chamado de mergulho, diretamente no solo, após anelamento de uma faixa com cerca de 2 cm de largura, podendo ser tratado ou não com auxinas. Deve-se escolher ramos flexíveis do ano, na parte baixa da copa, retirar as brotações laterais e as folhas de 10 a 60 cm da extremidade, fazer o anelamento cerca de 40 cm a baixo da extremidade, curvar e enterrar o ramo a uma profundidade de 10-15 cm de forma que a área anelada fique no fundo, instalar um tutor e fixar o ramo enterrado nele, deixar os primeiros 25 cm da ponta do ramo para fora do solo. (Simão, 1998).

Mergulhia invertida

Difere da anterior porque a ponta do ramo é que é enterrada, após ser decepada ou não, devendo-se enterrar o ramo verticalmente até certa profundidade e fixá-lo por um tutor (Gomes, 1994).

Mergulhia contínua

Na mergulhia contínua, um longo ramo é enterrado, sendo deixada somente a ponta para fora. Depois, o ramo enraizado pode ser cortado em várias mudas como se fossem estacas pré-enraizadas. Na mergulhia chinesa toda a secção fica enterrada; quando em serpentina, parte do ramo é enterrado e parte fica para fora, alternadamente (Gomes, 1994).

Mergulhia de cepa

Este processo envolve o abate da planta mãe que é, depois, deixada para brotar. Após a emissão, a base dos brotos é tapada com solo até que enraízem, então são separados da cepa e plantados (Simão, 1998).

Alporquia (mergulhia aérea)

Quando a espécie é de enraizamento difícil e não é possível dobrar seus galhos para fazer a mergulhia no solo, pode-se utilizar a mergulhia aérea.

Seleciona-se ramos de um ano com 1 a 3 cm de diâmetro, eliminando-se as brotações laterais dos mesmos em cerca de 15-30 cm antes da gema terminal e se faz um anelamento da sua casca com 3 a 5 cm de largura a cerca de 25 cm da ponta, cobrindo a área anelada com solo ou outro meio de cultura e, depois, cobrindo com saco plástico. Pode ser feito um segundo anel abaixo

do local envolvido, forçando a brotação de gemas. A separação é feita aos poucos, conforme o enraizamento, ou de uma vez, até se destacar; o ramo enraizado deve ser levado à uma estufa com alta umidade por um período suficiente para a muda vingar. É um método caro e de baixo rendimento que deve ser realizado no período vegetativo. (Toda Fruta, 2003).

As limitações do uso da alporquia na área florestal são grandes. Com *Eucalyptus grandis* é cara e demorada, embora sem risco de rejeição (Brune, 1982).

Indução do enraizamento na mergulhia

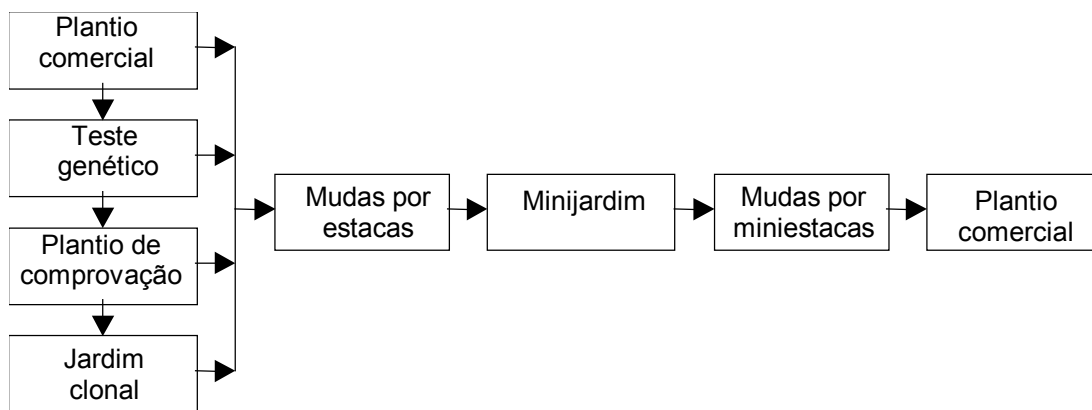
Os ramos devem ser preparados antes de entrar em contato com o solo. As operações consistem na desfolha e em anelamentos, incisões ou torções na parte que ficará enterrada. Pode-se usar hormônios ou fitorreguladores, dependendo da espécie. A separação é chamada de desmame; quando gradual promove a redução lenta do fornecimento de nutrientes e água por parte da planta mãe para a nova planta. Separação brusca pode provocar a desidratação da muda, se ela não estiver suficientemente enraizada (Simão, 1998).

CLONAGEM NUCELAR

É um tipo de reprodução assexuada monoclonal especial. Comum nos *Citrus*, a clonagem nucelar ocorre naturalmente a partir do plantio de sementes poliembriônicas em que os embriões resultantes de fecundação dificilmente se desenvolvem e os embriões somáticos têm crescimento vigoroso (Koller, 1994). Pode passar despercebida, pois ocorre a partir do plantio de sementes.

PRODUÇÃO DE MUDAS DE *Eucalyptus* POR ESTAQUIA

Atualmente, o processo utilizado para produção comercial de mudas de *Eucalyptus* por clonagem é realizado preferencialmente em minijardins clonais. As mudas para plantio em minijardins têm sua origem em matrizes selecionadas de diversas maneiras, mas geralmente são provenientes de estacas coletadas de cepas de árvores abatidas com cerca de 3 anos de idade.



Sequência de produção de mudas de *Eucalyptus* por estaquia

Até recentemente as mudas clonais destinadas aos plantios comerciais eram produzidas através de estacas e ainda não se havia desenvolvido o processo através de minijardins clonais.

As cepas produtoras de miniestacas em minijardins geralmente sofrem um forte rejuvenescimento durante o processo todo e as miniestacas são muito jovens (herbáceas), como consequência apresentam altos níveis de auxinas e não necessitam de tratamento hormonal para enraizar. Entretanto, as mudas de estacas de jardins clonais e de cepas de árvores de plantios comerciais ou de testes clonais, geralmente não sofreram rejuvenescimento e o processo de enraizamento, neste caso, necessita da adição de hormônios.



Foto: Edson N. Higashi

Minijardim clonal da Lwarcel
Fonte: IPEF-Notícias, 23(145) (jul/ago-1999).

O processo aqui descrito é utilizado na região Sudeste para produção de mudas a partir da brotação de cepas de *Eucalyptus grandis*, *E. Urophylla* e híbridos destas espécies, entre outros. O método é usado com estacas provenientes de plantios comerciais ou de jardins clonais. As operações envolvidas no processo, de acordo com Carmo e Silva (1989) e Floriano (1998), são as seguintes:

- 1) Seleção clonal;
- 2) Produção de brotos;
- 3) Preparação de estacas;
- 4) Preparação de recipientes e substrato;
- 5) Preparação do indutor de enraizamento e plantio;
- 6) Enraizamento em casa de vegetação;
- 7) Aclimação das mudas;
- 8) Expedição de mudas;
- 9) Armazenamento de materiais e ferramentas.

SELEÇÃO CLONAL

As matrizes para produção de mudas clonadas devem atender aos seguintes critérios:

- Ausência de doenças (cancro, ferrugem, manchas foliares);
- Ausência de pragas (coleobrocas, lagartas);
- Resistência a déficit hídrico;
- Altos incremento e produção final;
- Fuste reto, sem bifurcações, nem ramificações mais grossas;
- Galhos finos e ângulo de inserção próximo de 90°;
- Desrama natural intensa nos dois terços inferiores do tronco;
- Copa alongada e folhagem densa;
- Resistência aos ventos fortes (tombamento e quebra);
- Uniformidade entre plantas.

A seleção inicial de matrizes é realizada em plantios comerciais com origem por sementes. Após a seleção a matriz é abatida e são coletados brotos destinados à testes clonais, após avaliação dos testes, são realizados plantios de comprovação dos melhores clones. Nem todas as matrizes brotam com a mesma intensidade e vigor, devendo-se realizar uma seleção das melhores, sendo que as espécies *E. grandis*, *E. saligna*, *E. robusta*, *E. tereticornis* e *E. urophylla* têm boa brotação (Brune, 1982).

PRODUÇÃO DE BROTOS

A produção de brotos tanto pode ser realizada em jardins clonais como em áreas de produção comercial selecionadas para produção de brotos. Quando é realizada através de talhões comerciais, estes devem ser selecionados entre os mais produtivos no campo e somente de clones identificados e testados previamente, preferencialmente de povoamentos jovens com cerca de 3 anos de idade.

Após o plantio do jardim ou do povoamento selecionado, quando as árvores estão na idade apropriada, são abatidas, deixando uma cepa com cerca de 45 cm de altura. Após 45 a 60 dias, os brotos atingem o ponto ótimo de colheita.

A coleta de brotos deve ser realizada cedo, entre 6:00 e 7:00 horas da manhã, chegando ao viveiro no início do 1º turno de trabalho.

Os brotos são acondicionados em baldes com água, sendo identificados e separados por matriz. Chegando ao viveiro, são colocados em uma área apropriada para armazenagem de brotos, coberta por sombrite, com sistema próprio de irrigação por aspersão, anexa ao galpão de produção de mudas. Os brotos devem ser mantidos sempre com as folhas úmidas neste local. Quando

a área de produção de brotos é distante do viveiro, o transporte é realizado em veículos fechados.

Há influência das dimensões e das procedências das cepas de *Eucalyptus* no vigor das brotações. Graça e Toth (1990), observaram rebrota de 94% de 722 cepas de *E. dunnii*, com 10 cm de altura, sendo que as brotações das cepas das árvores com 12 a 20 metros de altura foi mais vigorosa, a brotação das cepas com menos de 4 cm de diâmetro foi mais fraca e as brotações das procedências Moleton e Urbeville foram mais vigorosas que as de Dorrigo.

PREPARAÇÃO DE ESTACAS

O galpão de produção de mudas deve ser higienizado diariamente, podendo ser lavado somente com água pura, ou com desinfetantes.

Cada clone deve ser levado para a mesa de corte separadamente. Cada broto rende cerca de 3 estacas. Com *E. grandis*, a partir do 15º nó a partir do ápice, o enraizamento não ocorre (Assis e Teixeira, 1999).

Da área de armazenagem, os brotos são transferidos para as mesas de corte e preparação de estacas à medida que são consumidos.

As estacas são cortadas com tesouras, em comprimento de 10-12 cm, sendo deixadas somente as duas folhas superiores com redução de 50% de sua área foliar, suficientes para realizar a fotossíntese e para não haver excesso de transpiração. Nesta operação são selecionadas as partes mais robustas e menos lenhosas dos brotos, com um diâmetro entre de 2 a 4 mm. O corte pode ser realizado com tesouras comuns de aço inox, sendo que em uma das lâminas é feita uma pequena cova para facilitar o corte e evitar o esmagamento da estaca.

Após o corte, a base das estacas é mergulhada em solução de Benlate (2g/L) durante 15-20 minutos. Antes de passar para a mesa de plantio nos tubetes, devem ser mergulhadas totalmente e em banho rápido, numa solução de 2 g de Benlate, 3 g de Auran e 0,05% de espalhante adesivo (Sandovit) por litro de água.

PREPARAÇÃO DE RECIPIENTES E SUBSTRATO

Enquanto se prepara as estacas, as bandejas com tubetes são desinfetadas num tanque com solução de clorocal a 1% (10 Kg / 1000 L) e secas ao ar livre por cerca de 1 hora, para depois serem transferidos para o galpão de produção de mudas. Antes da desinfecção, os tubetes são lavados para retirada dos resíduos de vermiculita. Devem ser utilizadas somente

embalagens desinfetadas no mesmo dia. A mesma solução de desinfecção pode ser utilizada durante 2 dias.

O substrato utilizado é a vermiculita expandida, tipo fino, (marca Plantmax), com granulometria entre 0,2 e 0,7 mm.

A vermiculita é colocada em caixas plásticas com volume de 30 L, recebem uma ducha forte de água, em proporção aproximada de 20% do seu volume, ficando em repouso por 20 minutos até sua completa expansão.

O tubete utilizado é afunilado, com frizos internos no sentido vertical que direcionam as raízes, com altura de 12,5 cm, diâmetro superior de 3,0 cm e inferior de 1,0 cm. As bandejas para suporte dos tubetes podem ser de isopor ou plástico, com capacidade de 96 tubetes, com dimensões de 60 cm x 40 cm x 0,15 cm.

Os tubetes nas bandejas são preenchidos com o substrato (vermiculita) que é compactada em mesa apropriada numa razão de 50 pancadas contadas pelo operador da mesa. Após, é retirado o excesso de vermiculita em mesa com aparador, seguindo para a furadeira.

A perfuração é realizada por uma furadeira manual ou mecânica que fura todos os tubetes de uma bandeja por vez, sendo constituída por uma placa com estiletos que fazem os furos para plantio das estacas.

PREPARAÇÃO DO INDUTOR DE ENRAIZAMENTO

O indutor de enraizamento (AIB) é misturado em talco em uma proporção de 6.000 ppm e colocado em pequenas vasilhas onde a ponta inferior das estacas é mergulhada antes de ser plantada no tubete.

A formulação do indutor é feita com a mistura de 5 g de AIB diluído em 700 ml de acetona pura, adicionando-se 883 g de talco industrial branco, deixados para secar após a preparação, antes de usar.

A base das estacas é mergulhada no recipiente com a mistura de talco com AIB, já seco. Em seguida a estaca é introduzida no tubete, fazendo-se uma leve compactação ao redor da mesma para evitar bolsas de ar entre a estaca e a vermiculita.

ENRAIZAMENTO EM CASA DE VEGETAÇÃO

Após o plantio, as mudas são molhadas e transferidas para a casa de vegetação, onde permanecem por 30 dias. O período pode variar dependendo do desenvolvimento das mudas, de 28 a 35 dias.

Há muitos modelos de casas de vegetação. Dependendo do clima local, podem ter aquecimento por vapor de água, exaustores e ventiladores, aberturas laterais para ventilação e cortinas plásticas de proteção. O essencial é que: tenham proteção contra o excesso de sol, vento, ressecamento, frio, dependendo da região; que ofereçam proteção contra a entrada de doenças e pragas; que apresentem facilidade para higienização; e, que possuam sistema de irrigação por nebulização. Uma casa de vegetação simples, pode ser apenas coberta integralmente por sombrite 50%, com uma porta pequena para circulação de pessoal e um portão para recepção e expedição de mudas. Uma casa de vegetação produz uma razão média de 200 a 250 mudas/m² de superfície a cada 30 dias, com bandejas dispostas em canteiros de 1,80 m de largura, espaçados entre si por corredores de 0,40 m.

À porta das casas, deve-se instalar um pé-de-lúvio com uma solução fungicida de Auran, na dosagem de 3g/L.

A irrigação pode ser realizada por uma rede de tubos de PVC localizados cerca de 2 m acima da superfície, com nebulizadores (micro-aspersores) espaçados de 2 m x 2 m, ou conforme orientação do fabricante.

O piso pode ser diverso, desde argila compactada coberta com brita nº1 até o concreto, devendo ser desinfetado com clorocal polvilhado a lanço na dosagem de 20g/m² e em seguida irrigado para ativação, mantendo-se o piso molhado por 3 dias, antes de receber as mudas.

Durante a permanência das mudas na casa de vegetação, deve-se aplicar Thiram numa concentração de 3g/l duas vezes por semana, com espalhante (ex.: Agrill). A umidade na casa de vegetação deve ser mantida sob controle visual, devendo, as folhas das mudas, apresentar sinal de umidade sempre. O controle da umidade também pode ser automático, sendo que a automatização pode ser feita por um temporizador, ou através de equipamentos de medição de umidade instalados no interior da casa de vegetação. A água do viveiro da FRDSA apresentava pH em torno de 6,8 e o percentual de enraizamento era de 85%. O bombeamento de água para os micro-aspersores é realizado geralmente por bombas elétricas na razão de 40 bicos por QuiloWatt Hora de potência. A experiência tem demonstrado que a qualidade da água é de suma importância para o sucesso na produção de mudas, sendo diretamente relacionada ao índice de enraizamento.

O início do enraizamento ocorre por volta do 12º dia após o plantio das estacas, atinfindo o ponto ideal aos 30 dias, quando as mudas estão prontas para a aclimatação.

ACLIMATAÇÃO DAS MUDAS



Ao sair da casa de vegetação as mudas recebem uma dose de fertilizante NPK 5-17-3 de 0,25 g/muda e as bandejas são colocadas suspensas sobre lajotas de barro na área de rustificação, onde ficam por 60 dias, sendo que após 30 dias sofrem seleção, quando são eliminadas as mudas sem brotos e não enraizadas; nesta fase, é calculado o percentual de mudas enraizadas remanescentes da seleção. O percentual médio de enraizamento dos viveiros na região tem sido entre 65 e 85%.

Após o período de rustificação, as mudas são classificadas pelo porte (pequeno, médio e grande) para serem enviadas para plantio, considerando-se o tamanho médio do lote de mudas.

Durante o período de rustificação, não são usados defensivos, exceto em caso de incidência de doenças, o que raramente ocorre. A umidade nesta fase é controlada através da verificação da umidade do substrato que não pode secar; o controle aqui, pode ser visual, ou automático. A automatização pode ser feita por um temporizador.

O controle de umidade em todas as fases, preferencialmente, deve ser realizado por uma só pessoa.

A água de irrigação das casas de vegetação deve ser de poço artesiano e na área de rustificação pode ser de poço comum, ou da rede de abastecimento local.

EXPEDIÇÃO DE MUDAS

A expedição das mudas é realizada após cerca de 60 dias de aclimação, quando estão com 90 dias de idade desde o plantio nos tubetes. Antes da expedição é realizada a poda das raízes que se projetam para fora dos tubetes com tesouras devidamente higienizadas. Os galhos laterais também são podados.

Os tubetes são retirados das bandejas e se faz o afrouxamento das mudas antes do encaixotamento para transporte com um leve aperto de mão e descolamento da borda superior do tubete e do substrato que pode ser realizado com a própria tesoura de poda.

O acondicionamento das mudas para transporte pode ser feito em caixas plásticas que comportam 125 tubetes na posição vertical. As mudas devem ser transportadas em veículos fechados (caminhão lonado, ou baú). Os tubetes somente são retirados no momento do plantio, depois são devolvidos às caixas e retornam para o viveiro onde são limpos, desinfectados e reutilizados.

ARMAZENAMENTO DE MATERIAIS E FERRAMENTAS

Para uma produção em torno de 200 mil mudas por mês, o consumo mensal de materiais é de: Talco, 10 Kg; AIB, 60g; Adubo, 500Kg; Clorocal, 300Kg; Thiram, 5Kg; Benlate, 3Kg. O consumo de vermiculita depende da capacidade de expansão da mesma e da compactação aplicada nos tubetes para o plantio, podendo ser estimado em cada caso, pelo peso contido por embalagem, sendo em torno de 20 cm³ por tubete, num total de 40 m³ por mês para 200 mil mudas, ocupando grande espaço em depósito.

Os materiais e ferramentas devem ser armazenados em local apropriado, separadamente em duas peças ou mais peças. A área de armazenamento deve ser suficientemente grande para a organização e higienização dos materiais que devem ser dispostos sobre estrados de madeira e suporte para as ferramentas, que devem ser higienizadas antes de guardadas. Os sacos de insumos não devem ser encostados às paredes e o estoque de vermiculita deve ser disposto em área suficientemente grande para a produção planejada.

MACROPROPAGAÇÃO ASSEXUADA MULTICLONAL

É o método de reprodução vegetativa chamado de enxertia, que consiste em unir um fragmento ou órgão de uma planta (cavaleiro) à uma segunda planta com sistema radicular completo e parte do sistema aéreo (cavalo) sobre o qual a primeira é implantada, tornando-as um único indivíduo com o sistema radicular de uma e o sistema aéreo de outra. É a união dos tecidos de duas plantas (Toda Fruta, 2003). A enxertia pode ser realizada por macropagação ou micropropagação. O termo “enxerto” é tanto usado para denominar o cavaleiro, quanto à ligação entre o porta-enxerto e o cavaleiro.

Os principais objetivos da enxertia são a obtenção, principalmente, de maior vigor e produtividade e, ainda, resistência às enfermidades e pragas, modificação do porte das plantas, restauração de indivíduos já em produção que estão perdendo a vitalidade, criação de variedades, floração e frutificação precoces, melhor qualidade e maior produção de frutos e sementes (Gomes, 1981). As plantas obtidas de sementes, de pés francos, levam mais tempo para

frutificar e, raramente, apresentam todas as características que se deseja em uma planta, principalmente nas frutíferas.

Em alguns casos a enxertia traz consigo alguns flagelos como a transmissão de doenças, redução da longevidade das plantas, além de haver rejeição entre algumas espécies que pode ser imediata ou tardia.

Vários são os materiais utilizados na enxertia, tendo-se os seguintes como principais: canivete de enxertia, tesoura de poda, pedra de afiar, serrote, fitilho, saco plástico, barbante, álcool, algodão. O uso de ferramentas adequadas e bem afiadas é um dos fatores de sucesso ou insucesso na enxertia (Simão, 1998).

A obtenção de plantas enxertadas com características de grande vigor e produtividade, além de depender de muitos fatores que influenciam no pegamento dos enxertos, depende da obtenção de plantas rústicas, vigorosas e sadias (cavalo e cavaleiro), que em conjunto apresentem as características desejadas de alta produtividade e precocidade.

INFLUÊNCIAS EXERCIDAS ENTRE CAVALO E CAVALEIRO

Nas plantas frutíferas, usualmente são requeridas do cavaleiro, boa copa e frutificação e frutos de alta qualidade (Gomes, 1990), do cavalo, alta produtividade, rusticidade e adaptação ambiental, e do conjunto, a precocidade associada às qualidades do cavalo e cavaleiro, o que irá depender da influência que um exercer sobre o outro devendo ser uma combinação harmônica e essa influência depende de fatores tanto internos do cavalo e cavaleiro (fisiológicos, histológicos, etc), como dos ambientais (Simão, 1998). A influência do cavaleiro sobre o cavalo, se estende ao desenvolvimento do sistema radicular; há casos em que o cavalo se desenvolve excessivamente devido ao enxerto, ou é reduzido quando a variedade do enxerto é de desenvolvimento menor; o cavalo influe sobre o desenvolvimento do cavaleiro, alterando a produtividade, qualidade e época de maturação de frutos, a resistência às pragas e doenças, resistência às baixas temperaturas e necessidades nutricionais (Simão, 1998).

FATORES QUE INFLUENCIAM O PEGAMENTO DE ENXERTOS

O sucesso dos implantes depende de muitos fatores tanto relativos às próprias plantas, como às características do enxerto, à época do ano e às condições ambientais, que são relacionados à seguir, conforme (Kramer e Kozlowiski, 1972; Simão, 1998):

- Compatibilidade entre as plantas – Somente plantas com certo grau de congenialidade são suscetíveis à enxertia. a

incompatibilidade varia em grau desde a morte rápida do cavaleiro até vários graus de atrofia, de incapacidade de frutificar e de morte prematura;

- Contato e Afinidade – Há necessidade das zonas cambiais do cavalo e cavaleiro ficarem em contato íntimo para facilitar a translocação da seiva, até que se consolide a união; às vezes ocorre a ligação e a planta cresce vigorosamente, mas a seguir há ruptura do enxerto e morte do cavaleiro;
- Época – A época ideal depende da espécie e do tipo de enxerto que vai ser efetuado;
- Processo de enxertia (encostia, borbulhia ou garfagem) – Deve ser compatível com as plantas envolvidas;
- Sanidade – O cavalo e o cavaleiro devem ser sadios;
- Condições climáticas – Os extremos ambientais prejudicam a enxertia; a temperatura ideal é torno de 20-25°C;
- Estado fisiológico adequado – Tecidos jovens e de idêntico grau de maturação são mais fáceis de enxertar;
- Idade e tamanho dos porta-enxertos – A idade e tamanho do cavalo tem relação direta com o pegamento dos enxertos (Kitamura e Lemos, 2004); quanto maior o porta-enxerto, mais brotações emite e estas causam dormência no enxerto, por isso o porte do cavalo e cavaleiro devem ser semelhantes;
- Solo – O pegamento é maior em solos férteis e frescos.

Os principais tipos de enxertia são a encostia, a garfagem, a sobre-enxertia e a borbulhia.

ENCOSTIA

É um método de enxertia utilizado para unir duas plantas completas e que continuam com seus sistemas radiculares, até que a cicatrização do enxerto se complete e o sistema radicular do cavaleiro possa ser excluído (Toda Fruta, 2003). A encostia é utilizada para plantas que não aceitam bem a borbulhia ou a garfagem (Corrêa, *apud* Gomes, 1994), pois as características do método dificultam a produção de mudas em larga escala (Simão, 1998).

Tipos de encostia:

- Lateral simples e inglesa – Na encostia lateral simples é feito um entalhe no cavalo e no cavaleiro, retirando-se parte do alburno de ambos; as duas partes são justapostas e fixadas com amarrilhos. Na lateral inglesa, sobre o entalhe do cavalo e do cavaleiro, é

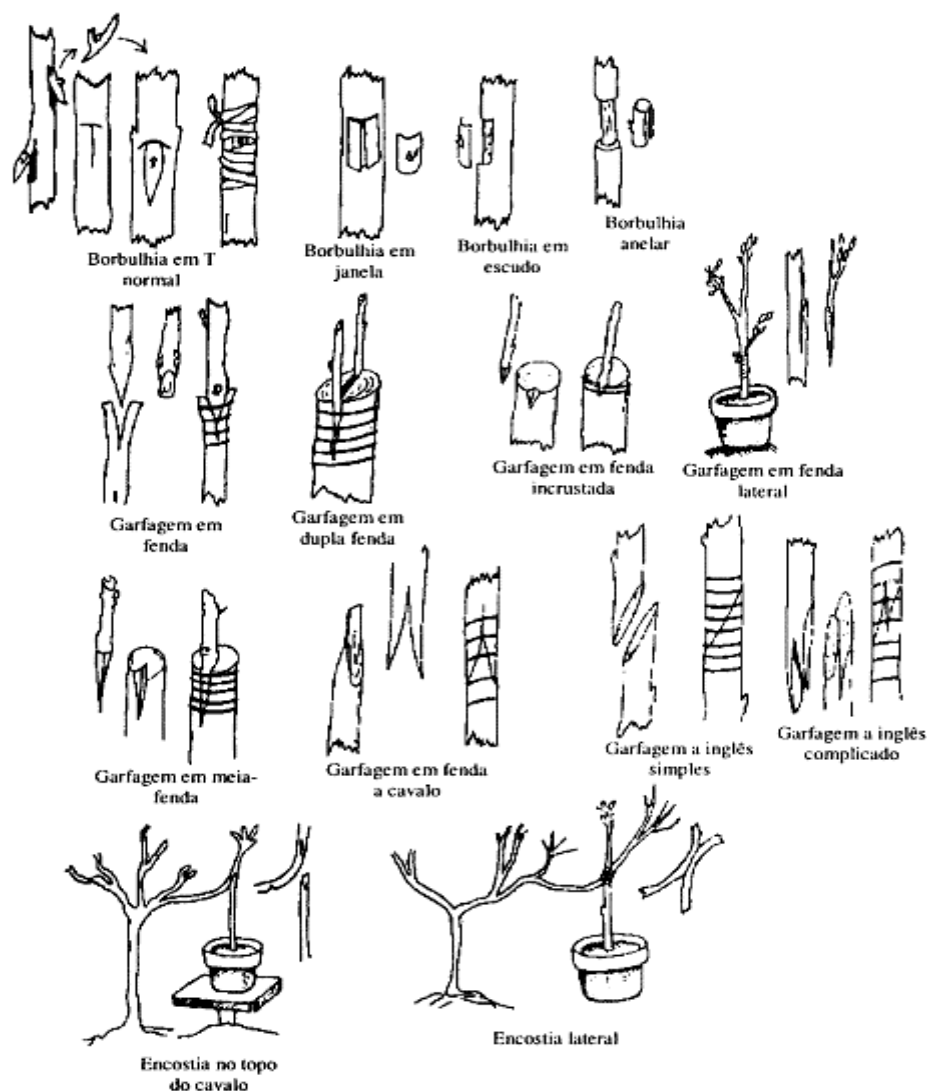
feita uma incisão oblíqua, abrindo-se os entalhes e unindo-se as partes, amarrando-se em seguida (Simão, 1998).

- De topo simples e inglesa - Na encostia simples do topo, decepta-se o cavalo a determinada altura e se faz um bisel de ambos os lados com canivete. No cavaleiro se faz uma incisão oblíqua até o lenho. Encaixa-se sobre o bisel do cavalo e amarra-se. Na inglesa é feita uma incisão a mais tanto no cavalo como no cavaleiro, para maior fixação (Simão, 1998).
- subenxertia (ou *Inarching*) - É usada para revigorar uma planta, que apresenta incompatibilidade entre cavalo e cavaleiro, consistindo na substituição do cavalo por outro, ou adição de outro cavalo que é plantado ao lado (Toda Fruta, 2003; Simão, 1998).

GARFAGEM

É um processo de enxertia que consiste em soldar um pedaço de ramo destacado (garfo) de uma planta que se deseja propagar (matriz) sobre outro vegetal (cavalo), de maneira a permitir o seu desenvolvimento. A garfagem difere da borbulhia por possuir, normalmente, mais de uma gema e também porque o porta-enxerto tem a parte superior decapitada. O enxerto de garfagem é feito aproximadamente a 20 cm acima do nível do solo ou abaixo dele, na raiz, na região do colete. A região do ramo podada com a tesoura é a seguir alisada com o canivete. Para o sucesso da enxertia, é essencial que a região cambial do garfo seja colocada em contato íntimo com a do cavalo (Simão, 1998). A época normal de garfagem, para as plantas de folhas caducas, se dá no período de repouso vegetativo (inverno), e nas folhas persistentes, dependendo da espécie, na primavera, no verão e no outono (Gomes, 1981; Toda Fruta, 2003; Simão, 1998).

A garfagem é um processo que facilita a propagação de doenças, sendo proibida por este motivo para produção de mudas de *Citrus* no Brasil (Koller, 1994).



Tipos de enxertia (ICIAG, 2003).

Após a justaposição do cavaleiro ao cavalo, a região deve ser amarrada e a seguir recoberta com uma pasta ou massa de fácil moldagem a que se dá o nome de mastique e que se usa em todos os tipos de garfagem executada no colo da planta, que deixam parte do corte exposto, como ocorre nos enxertos de meia-fenda, fenda esvaziada e dupla fenda, com o fim de proteger a região do enxerto. O mastique pode ser substituído por material plástico (Simão, 1998).

Tipos de garfagem (Gomes, 1981; Toda Fruta, 2003; Simão, 1998):

- De topo, fenda cheia ou fenda completa – É feita uma fenda longitudinal no cavalo com 2 a 3 cm, onde se introduz um garfo (cavaleiro) com ponta em forma de cunha e de mesmo diâmetro do cavalo;

- Fenda dupla ou dupla garfagem – Semelhante ao anterior, porém são usados dois garfos (cavaleiros) de diâmetro inferior ao raio do cavalo, cada um introduzido em um dos lados da fenda;
- Meia-fenda cheia - A fenda feita somente até a metade do diâmetro do cavalo com 2 ou 3 cm, no sentido longitudinal, onde se introduz um garfo aparado em bisel;
- Meia-fenda vazia - Semelhante ao anterior, porém é retirada uma cunha do topo do cavalo, onde se encaixa o garfo em bisel; é apropriado para espécies de lenho rígido;
- Fenda incrustada – É uma variação do anterior, em que a fenda do cavalo e o garfo tem pequenas dimensões.
- Fenda lateral – Remove-se um segmento do caule do cavalo e do enxerto (5 a 6 cm), permitindo o contato entre eles;
- Fenda a cavalo – Decepa-se o cavalo a certa altura do solo em forma de cunha; o enxerto é cortado e nele é feita uma fenda, juntando-se as partes e amarrando-se o fitilho e o saco plástico, de forma inversa à garfagem em fenda;
- Inglês simples - Cavalo e cavaleiro devem ter diâmetros semelhantes, sendo cortados em bisel, unindo-se e amarrando-se os dois;
- Inglês complicado – Cavalo e cavaleiro com diâmetros semelhantes recebem um corte com perfil em duplo bisel (em forma de z), resultando em melhor fixação que no tipo simples;

SOBRE-ENXERTIA

É a operação de enxertia que tem por finalidade o aproveitamento de plantas já formadas, em que se substitui o cavaleiro. É indicada para plantas de idade média e sadias com o objetivo de ganhar tempo, pois o porta-enxerto já está estabelecido. Poda-se a copa deixando-se 4 a 5 galhos sobre os quais se faz a enxertia (Simão, 1998).

BORBULHIA

É o processo de enxertia que consiste na justaposição de uma única gema sobre um porta-enxerto enraizado (Gomes, 1981). A época apropriada vai da primavera ao verão e início do outono, quando as plantas estão em atividade vegetativa (Koller, 1994).

Os diferentes tipos de borbulhia são agrupados em anelagem e escudagem e devem ser feitos com ramos não muito tenros, sendo que nos *Citrus* atingem o tamanho ideal entre 4 e 8 meses de idade (Koller, 1994). Alguns tipos de borbulhia são relacionados a seguir:

- **T normal** – Escudagem em que se fende o cavalo no sentido transversal e no sentido perpendicular, formando um T. O escudo ou gema é extraído da planta doadora segurando-se o ramo em posição invertida. Prende-se o escudo lateralmente ou pelo pecíolo, levanta-se a casca com o dorso da lâmina e se introduz a borbulhia no T; elimina-se o excesso e se amarra de cima para baixo (Simão, 1998);
- **T invertido** – Escudagem semelhante à anterior, com o T invertido; (Gomes, 1994);
- **Em janela aberta** – Escudagem em que a borbulhia é retirada com um pedaço retangular de casca e câmbio formando um escudo, sendo retirado do cavalo um pedaço de casca em retângulo do mesmo tamanho, onde se encaixa a borbulhia; (Gomes, 1994);
- **Em janela fechada** – Escudagem em que se faz uma incisão em forma de H deitado no cavalo, onde se encaixa uma borbulhia igual à do tipo anterior (Simão, 1998);
- **Chapinha** – Escudagem em que se retira uma borbulhia com um escudo ou chapinha no entorno, que é enxertada sobre um cavalo de onde se retira uma chapinha semelhante (Koller, 1994);
- **Anelar, canutilho ou flauta** – Anelagem em que se retira um anel do cavalo onde se encaixa uma borbulhia que foi extraída com um anel de casca suficiente para recobrir todo o anel sem casca do cavalo (Simão, 1998).

Algumas espécies necessitam de quebra de dormência da borbulhia para haver pegamento do enxerto. A dormência, nos *Citrus* é provocada pela dominância apical do cavalo e pode ser quebrada por anelamento ou incisão logo acima do enxerto, entalhe seguido de quebra parcial no mesmo local ou arqueamento do porta-enxerto, devendo o forçamento final do enxerto ser realizado no fim do inverno por decepção total do cavalo (Koller, 1994). Estes procedimentos causam brotações do cavalo, que devem ser eliminadas e quanto maior o porte do cavalo, mais intensa sua brotação e maior inibição causa ao cavaleiro (Simão, 1998).

MICROPROPAGAÇÃO

Cultura de tecidos, ou micropropagação, ou ainda, cultura *in vitro* de plantas, é a metodologia de propagação vegetativa em que se usa um meio de

cultura suplementado com fitorreguladores, um agente geleificante, ambiente asséptico e condições adequadas de luz e temperatura, para promover a multiplicação somática de pequenos pedaços de tecidos de plantas, induzindo a sua diferenciação, para obter uma planta completa com todos os tecidos e órgãos que lhe são característicos e todas suas funções orgânicas, dentro de recipientes fechados, em laboratório (Feveiro *et al.*, 2001).

Haberlandt, pai da cultura de tecidos, iniciou os primeiros trabalhos na área em 1902, estudando a regeneração de plantas originadas de uma única célula, mas não obteve sucesso em seus experimentos, o que se atribui a não haver usado “fitormônios” no meio nutritivo, utilização de espécies inadequadas, baixa densidade de inóculo e uso de explantes de tecidos maduros. Em 1904, Hannig realizou o primeiro cultivo *in vitro* de embriões imaturos, observando que havia necessidade de suplementação do meio mineral com sacarose para que os embriões germinassem. A primeira cultura de tecidos foi obtida por White, em 1934, três anos depois demonstrou a importância da tiamina para o crescimento de raízes *in vitro*, tendo elaborado uma mistura orgânica que leva o seu nome, ainda usada na formulação de meios nutritivos. A descoberta do primeiro fitormônio, o AIA, possibilitou o estabelecimento e manutenção indefinida de cultura de calo de cenoura. (Torres *et al.*, 1998c).

Vários métodos de cultura de tecidos, utilizando partes diversas das plantas, foram desenvolvidos com diferentes objetivos. Entre os principais métodos de cultura de tecidos estão a cultura meristemática, a microenxertia, a cultura de embriões, a cultura de calos, a suspensão celular, a polinização e fertilização *in vitro*, a cultura de ovários, a cultura de protoplastos e a embriogênese somática. Os principais usos da cultura de tecidos são a reprodução de plantas *in vitro* para produção de mudas, a recuperação de plantas isentas de vírus (limpeza clonal), a conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas (conservação de germoplasma), a obtenção de mutantes *in vitro*, a produção de haplóides e duplos haplóides e a produção de plantas transgênicas. (Torres *et al.*, 1998c).

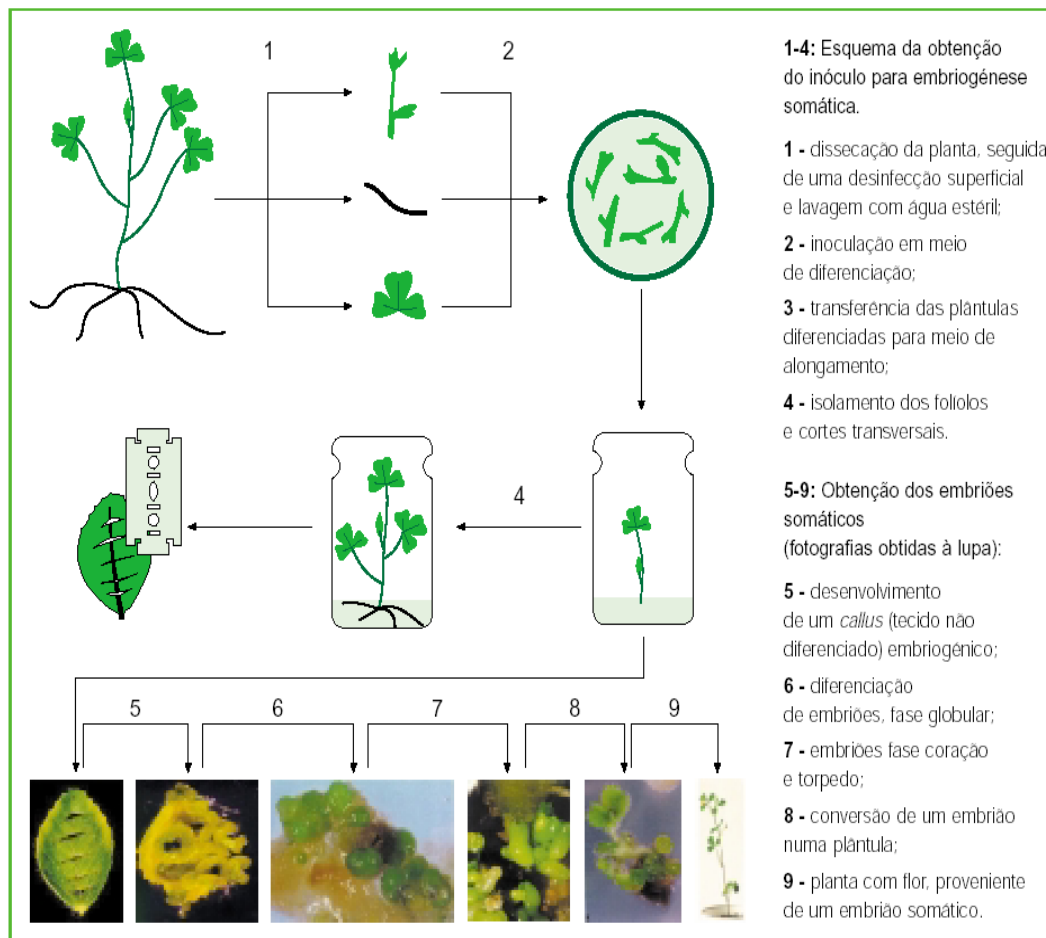
CULTURA MERISTEMÁTICA

É a cultura de partes do meristema apical ou de primórdios foliares de plantas. Usa-se explantes com dimensão de 0,1 a 1,0 mm, mas quanto menor, mais difícil sua sobrevivência. O risco de contaminação virótica aumenta com explantes maiores do que 0,25 mm, embora aumente a sobrevivência (Simão, 1998).

A multiplicação por meio de brotos apicais e axilares, que contêm meristemas quiescentes ou ativos, dependendo do estado fisiológico da planta,

pode ser realizada em meio de cultura sem reguladores de crescimento resultam em brotos semelhantes a plântulas, com forte dominância apical. Brotos axilares em presença de citocininas, geralmente, desenvolvem-se prematuramente, proliferando em massa e produzindo brotos secundários e terciários que podem ser cultivados e utilizados na produção de mudas. (Pereira e Melo, 2004).

O processo inicia pela retirada de um pedaço de tecido da planta a ser reproduzida (explante), livre de microorganismos, que é colocado em um meio de cultura. Quanto menor o explante, maior a segurança em obter uma planta livre de patógenos (Simão, 1998 e Feveiro *et al.*, 2001).



Processo de cultura de tecidos de *Medicago truncatula*.

Fonte: Feveiro *et al.* (2001).

MICROENXERTIA

É utilizada principalmente para recuperação de plantas livres de doenças. É de grande aplicação com plantas herbáceas, mas há grande limitação de seu uso com as lenhosas. Consiste em enxertar um ápice caulinar com 1 a 2 primórdios foliares de uma planta matriz sobre um porta-enxerto *in vitro*. O cavalo, geralmente sementes germinadas *in vitro*, é decapitado e

recebe uma incisão no topo em forma de T invertido, onde se introduz o cavaleiro. (Paz e Pascoal, 1998; Simão, 1998).

Com *Citrus* utiliza-se a microgarfagem, usando-se um embrião como cavaleiro, germinando-se as sementes em solução de ágar no escuro, decapita-se a plântula deixando-as com 1 ou 1,5 cm de comprimento, remove-se os cotilédones e as gemas laterais e enxerta-se a ponta do meristema apical de outra plantula com 0,14 a 0,18 mm e três folhas primordiais. O enxerto também pode ser feito por borbulhia em T invertido, com 1 mm de comprimento. Após a enxertia, coloca-se a planta em meio líquido com iluminação por 3 a 5 semanas, até o pegamento; a planta pode ser transplantada quando apresentar 2 folhas expandidas; processo semelhante é utilizado para maçã, ameixa e outras espécies de *Prunus*. (Simão, 1998).

CULTURA DE EMBRIÕES

É usada para superar a dormência de sementes, quando o embrião é imaturo, ou devida à presença de substâncias inibidoras no endosperma; também se usa para estudar os aspectos nutricionais e fisiológicos do desenvolvimento do embrião, testar a viabilidade de sementes, recuperar híbridos raros de cruzamentos incompatíveis e como fonte de explantes devido a elevada totipotência dos tecidos embrionários (Hu e Ferreira, 1998).

É realizada separando-se o embrião da semente, na fase de desenvolvimento em que o endosperma está líquido, depois os embriões excisados são colocados para germinar em um meio especial (Hu e Ferreira, 1998). Uma das vantagens é a possibilidade de realizar cruzamentos interespecíficos. A desinfecção do material pode ser feita utilizando-se ácido carbônico a 5% por 5 minutos, ou álcool, ou hipoclorito de Ca ou de Na (Simão, 1998).

CULTURA DE CALOS

A cultura de calo possibilita a ocorrência de aneuploidias e poliploidias, acarretando perda da identidade genética do material propagado, mas é possível distinguir regenerantes aberrantes na primeira etapa do processo de multiplicação, eliminando-se as plantas indesejáveis. Possibilita a obtenção de uma grande quantidade de plantas a partir de um único explante, sendo um dos métodos mais eficientes na produção de plantas *in vitro*, mas apresenta risco de provocar alterações genéticas que levam a evitá-la na reprodução de culturas economicamente importantes (Pereira e Melo, 2004).

SUSPENSÃO CELULAR

Este processo é utilizado para a obtenção e proliferação de células em meio líquido, sob condição de agitação contínua, para evitar possíveis gradientes nutricionais e gasosos no meio de cultura (Cid, 1998). É eficiente para multiplicação rápida, sendo empregado na produção de metabólitos secundários ou material clonal em escala comercial pela utilização de biorreatores. As suspensões celulares obtidas tem aplicação em estudos de bioquímica, genética, citologia, fisiologia vegetal e fitopatologia (Pereira e Melo, 2004).

Biorreatores são equipamentos para cultivo de células sob imersão, de qualquer tipo de propágulo para uso em micropropagação. Usa-se meio líquido, permitindo a renovação do ar durante o processo, monitorando-se o pH, oxigênio dissolvido, temperatura, concentração de íons, etc, para garantir o desenvolvimento das células. (Pereira e Melo, 2004).

POLINIZAÇÃO E FERTILIZAÇÃO IN VITRO

Possibilita a obtenção de novas combinações no cruzamento de plantas, resultando em híbridos inter e intra-específicos, intergenéricos ou entre espécies de famílias distintas, é dificultada por barreiras que podem ocorrer antes da fertilização. Permite estudar os processos de polinização, transpor barreiras à fertilização impostas pelo estigma, estilete ou ovário e recuperar híbridos interespecíficos e intergenéricos que não podem ser obtidos pelos métodos convencionais *in vivo*. (Torres *et al.*, 1998b).

CULTURA DE OVÁRIOS

A cultura de ovários fornece um sistema controlado para o estudo dos aspectos nutricionais e fisiológicos do desenvolvimento de frutos e formação de sementes. Este método também é utilizado para a propagação de plantas, a indução de haplóides partenogênicos e a recuperação de híbridos interespecíficos e intergenéricos. (Torres *et al.*, 1998a). A cultura é realizada de forma semelhante à de outros tecidos.

CULTURA DE PROTOPLASTOS

O cultivo de protoplastos (células vegetais desprovidas de parede celular) é usado para obtenção de plantas transgênicas, de híbridos somáticos, de mutantes ou variantes somaclonais e para o estudo da expressão de genes isolados (Carneiro *et al.*, 1998). Há várias técnicas de cultivo de protoplastos para diferentes finalidades.

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA

Embriogênese somática, adventícia ou assexual são termos usualmente empregados para designar o processo pelo qual células haplóides ou somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estágios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas. A embriogênese somática é um método importante para propagação em larga escala de plantas elite *in vitro*. Além de servir de modelo para estudos básicos relacionados com a fisiologia do desenvolvimento do embrião, esse sistema vem sendo utilizado para produção de plantas transgênicas e sementes sintéticas. (Pereira e Melo, 2004).

LABORATÓRIO DE CULTURA DE TECIDOS

Instalações

Um laboratório de cultura de tecidos deve possuir as seguintes instalações (Pereira e Melo, 2004):

Sala de limpeza – Local destinado à lavagem de vidraria, autoclavagem de água, de meios de cultura e de utensílios diversos.

Sala de preparo – Local de preparo de meios de cultura, de soluções e de material vegetal destinado à cultura *in vitro*.

Sala de transferência – Local de manipulação do material vegetal, exclusivo para a capela de fluxo laminar e estantes para estocagem temporária dos meios de cultura já autoclavados e materiais esterilizados; deve ser mantida asséptica;

Sala de cultura – Local onde as culturas são mantidas em estantes iluminadas em prateleiras de 50 cm de largura, distanciadas entre si de 40-45 cm até serem retiradas dos frascos, sob temperatura constante e próxima de 27° C, com fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa variando de 50-60mmol m⁻². s⁻¹.

Equipamentos

Os equipamentos e materiais que devem constar de um laboratório de cultura de tecidos são (Feveiro *et al.*, 2001; Pereira e Melo, 2004):

Agitador magnético	Lavador de pipetas
Aparelho de banho-maria	Lupa binocular
Aquecedor de água	Medidor de pH
Autoclave (substituível por uma panela de pressão)	Papel de filtro
Balança	Película aderente
Capela (Bancada) de fluxo laminar ou zona esterilizada	Pinças e lâminas
Congelador	Pipetas
Dessecador	Placas de petri
Destilador e Desionizador	Refrigerador
Lâmpada de UV germicida	Sistema de iluminação de lâmpadas fluorescentes com temporizador

Agitador magnético – Auxilia na dissolução de reagentes e determinação de pH.

Aparelho de banho-maria – Útil par aquecimento moderado de soluções, meios de cultura e fusão de ágar, quando necessário.

Aquecedor de água – Imprescindível para a lavagem eficiente de frascos contendo meio de cultura semi-sólido, dentre outras aplicações.

Autoclave – Utilizada para esterilização de meio de cultura, vidraria, água e outros materiais.

Balança – Necessária para a pesagem de macronutrientes e outros reagentes usados em maior quantidade.

Balança de precisão ou analítica – É imprescindível para a pesagem de quantidade mínimas de alguns reagentes como os reguladores de crescimento e alguns micronutrientes.

Capela de fluxo laminar – Imprescindível para os trabalhos de manipulação asséptica. Este equipamento força a passagem de ar por meio de um filtro bacteriológico, de modo que seja criado um ambiente estéril com pressão positiva, que evita a entrada de ar externo contaminado.

Congelador – Utilizado para estocagem de reagentes que exigem temperatura abaixo de 0oC.

Dessecador – Utilizado na manutenção de frascos de certos reagentes muito higroscópios, em pó após abertos.

Destilador e Desionizador – São aparelhos utilizados para eliminar sais minerais da água.

Lavador de pipetas – Equipamento de baixo custo e essencial para simplificar o trabalho de lavar pipetas.

Lupa estereoscópica – Utilizado na identificação e manipulação de pequenas estruturas vegetais (meristemas, pólen etc) ou de estruturas desenvolvidas in vitro.

Medidor de pH – Necessário para a determinação e ajuste do pH de meios de cultura, o qual influencia categoricamente no sucesso do cultivo.

Refrigerador (geladeira) – Manutenção de soluções estoque e reagentes diversos.

Meios de cultura

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas, fornecem as substâncias essenciais para o seu crescimento e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro*. As mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas são conservadas nas células cultivadas, embora alguns processos, como fotossíntese, possam ser inativados pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação das células. Por isso, os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender às necessidades específicas *in vitro*. Complementando as substâncias biossintetizadas pelas células, vários compostos orgânicos são adicionados ao meio para suprirem as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais das células. (Caldas *et. al.*, 1990)

Alguns dos primeiros meios apresentavam, entre os micronutrientes, metais exóticos como níquel, titânio e berílio, além dos mais comuns (ferro, manganês, zinco, cobre e boro). A lista dos minerais incluídos na maioria dos meios utilizados hoje foi definida por White (1943b; 1945). O meio de White continha, ainda, vitaminas e sacarose como suplementos orgânicos. Dos hormônios vegetais, ou reguladores de crescimento, apenas a auxina ácido 3-indolacético era conhecida nas décadas de trinta e quarenta. (Caldas *et. al.*, 1990).

Componentes de meios de cultura

Houve desde o início, uma procura de meios definidos de composição conhecida e controlada para tornar possível a reprodução dos resultados em qualquer época ou lugar. Deve-se exigir qualidade analítica (“p.a.”) de todos os sais utilizados na preparação, para evitar contaminação com impurezas minerais. A composição de alguns meios utilizados na cultura de tecidos vegetais são apresentadas na Tabela 1.

Água – Deve ser destilada e desionizada, ou bi-destilada, para prover pureza suficiente para uso nos meios. Dependendo da fonte de água (poço artesiano, por exemplo), pode conter contaminantes orgânicos voláteis, que permanecem após a destilação e inibem o crescimento das culturas.

Macronutrientes – São usados na forma de sais inorgânicos de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre.

Micronutrientes – São essenciais para plantas clorofiladas: manganês, zinco, boro, cobre, cloro, ferro, molibdênio, cobalto e iodo.

Carboidratos – São usados para suprir a deficiência das células, tecidos e plântulas cultivadas *in vitro* que não encontram condições adequadas de iluminação e concentração de CO₂ ou não apresentam teor de clorofila suficiente para realizar fotossíntese que sustenta o crescimento. A sacarose, an concentração de 3%, é o carboidrato mais utilizado nos meios nutritivos, sendo que esse açúcar suporta as mais altas taxas de crescimento na maioria das espécies. A concentração de sacarose é um fator importante para obter crescimento ótimo, dependendo do explante. Culturas de embriões nos estágios iniciais de desenvolvimento necessitam de concentrações elevadas de sacarose (12-18%).

Vitaminas – Os primeiros estudos com cultura de raízes definiram a mistura básica de vitaminas utilizadas até hoje que consiste de tiamina (vitamina B1), ácido nicotínico (niacina) e piridoxina (vitamina B6), a qual normalmente se adiciona o aminoácido glicina.

Mio-Inositol – O mio-inositol é um componente da maioria dos meios em uso atualmente. A concentração mais usada é de 100 mg. l-1.

Reguladores de Crescimento ou Hormônios – A composição e concentração de hormônios no meio é fator determinante no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos métodos de cultura de tecidos. As auxinas e as citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas. A formação de raiz, parte aérea e calo é regulada pela disponibilidade e interação dessas duas classes de reguladores de crescimento. As várias substâncias reguladoras são usadas de acordo com o objetivo do estudo. As auxinas (AIA - ácido 3-indolacético, AIB - ácido indolbutírico e 2,4-D ácido 2,4-diclorofenoxiacético, entre outras) dão respostas diferentes *in vitro*. AIA é considerada uma auxina instável, que se degrada facilmente pela luz ou pela atividade microbiana que a transforma em triptofano. Entre as citocininas, o BAP – 6-benzilaminopurina induz a formação de grande número de brotos e alta taxa de multiplicação em muitos sistemas de micropropagação. As giberelinas têm pouco efeito sobre culturas *in vitro*.

Ágar e Semelhantes – Os meios de cultura podem ser líquidos ou sólidos; em meio líquido normalmente há necessidade de algum tipo de suporte ou agitação para fornecer o oxigênio necessário para a respiração do explante e apresentam a vantagem de preparo mais rápido (e mais barato) do que os sólidos. Os meios sólidos ou semi-sólidos, tradicionalmente usam ágar para dar consistência do meio que depende de sua concentração. Ágar é um polissacarídeo extraído de algas marinhas que é dissolvido em água fervente.

pH – Normalmente, o pH é ajustado com HCl ou NaOH para um valor ligeiramente ácido, entre 5 e 6, depois da adição de todos os componentes. Soluções usadas são a 1 M de Ácido Clorídrico (HCl) e de Hidróxido de Sódio (NaOH).

TABELA 1 - Composição dos meios MS (Murashige e Skoog, 1962), White (1943), B5 (Gamborg *et al.*, 1968), DKW (McGranahan, Driver e Tulecke, 1987) e WPM (Lloyd e McCown, 1980).

Substância	MS		White ^b	B5	DKW	WPM
	mg/L(mM)	SE g/l ^a	mg/L (mM)	mg/L (mM)	mg/L (mM)	mg/L (mM)
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	-	300 (1,27)	-	1967 (8,33)	556 (2,35)
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440 (2,99)	C 44	-	150 (1,02)	149 (1,01)	96 (0,65)
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,025 (0,0001)	F 0,0025	-	0,025 (0,0001)	-	-
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025 (0,0001)	F 0,0025	0,010 (0,00004)	0,025 (0,0001)	0,25 (0,001)	0,25 (0,001)
Fe ₂ (SO ₄) ₃	-	-	2,5 (0,00625)	-	-	-
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,8 (0,1)	G 2,78	-	^c (0,050)	33,8 (0,12)	27,8 (0,1)
H ₃ BO ₃	6,2 (0,1)	F 0,620	1,5 (0,024)	3 (0,048)	4,8 (0,078)	6,2 (0,1)
K ₂ SO ₄	-	-	-	-	1559 (8,96)	990 (5,69)
KCl	-	-	65 (0,87)	-	-	-
KH ₂ PO ₄	170 (1,25)	E 17	-	-	265 (1,95)	170 (1,25)
KI	0,83 (0,005)	F 0,083	0,75 (0,0045)	0,75 (0,0045)	-	-
KNO ₃	1900(18,8)	B 190	80 (0,79)	2500 (24,7)	-	-
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370 (1,5)	D 37	720 (2,92)	250 (1,01)	740,11 (3,0)	370 (1,5)
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,3 (0,13)	-	5,3 (0,031)	22,3 (0,100)	-	-
MnSO ₄ .H ₂ O	-	F 1,690	-	10 (0,059)	33,50 (0,19)	22,3 (0,13)
MoO ₃	0,01 (0,000007)	-	-	-	-	-
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3 (0,1)	G 3,73	-	^c (0,050)	45,4 (0,12)	37,3 (0,1)
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,25 (0,01)	F 0,025	-	0,25 (0,001)	0,39 (0,0156)	0,25 (0,01)
Na ₂ SO ₄	-	-	200 (1,41)	-	-	-
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	-	-	16,5 (0,12)	150 (1,05)	-	-
NH ₄ NO ₃	1650 (20,6)	A 165	-	-	1416 (17,68)	400 (4,9)
NiSO ₄ .6H ₂ O	-	-	-	-	0,005 (0,00002)	-
Zn(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	-	-	-	-	17 (0,057)	-
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,6 (0,029)	F 0,860	3 (0,010)	2 (0,007)	-	8,6 (0,029)
Ácido nicotínico	0,5 (0,004)	H 0,05	0,5 (4,1)	1,0 (0,008)	1,0 (0,008)	0,5 (0,004)
Glicina	2,0 (0,0266)	H 0,2	3 (0,04)	-	-	-
Mio-inositol	100 (0,55)	-	-	100(0,55)	-	-
Piridoxina . HCl	0,5 (0,0024)	H 0,05	0,1 (0,05)	1,0 (0,0049)	-	0,5 (0,0024)
Sacarose	30000 (87,5)	-	-	20000 (58,4)	-	-
Tiamina . HCl	0,1 (0,0003)	H 0,01	0,1 (0,03)	10 (0,030)	2,0 (0,006)	1,0 (0,003)

Sendo: (^a) Preparação do MS: (SE)= Solução Estoque, (g/l)=concentração; (^b) Formulação de White(1943)+Cu+Mo; (^c) Formulação da preparação comercial "Sequestrene".

Fonte: Caldas *et al.*, 1990; Melo *et al.*, 1999.

Em diferentes laboratórios, procedimentos diversos são utilizados para preparar os meios nutritivos. Normalmente, mantêm-se soluções-estoque dos sais minerais na geladeira em concentrações mais elevadas, a partir das quais, a preparação do meio é efetuada. Soluções-estoque das vitaminas podem ser mantidas na geladeira ou no congelador; a sacarose e o mio-inositol, que são utilizados em quantidades elevadas, são pesados sempre que se prepara um meio nutritivo. As Soluções Estoque A, B, C e D devem ser diluídas em 500 mL de água destilada e desionizada e, em seguida, o volume deve ser completado para 1000 mL e bem agitado; depois deve ser armazenado em

geladeira. As Soluções Estoque de micronutrientes (F), são preparadas dissolvendo cada um dos micronutrientes, um após o outro, em 300 mL de água destilada e desionizada, completando-se o volume para 1000 mL, agitando e colocando o fresco na geladeira. O estoque de Fe.EDTA (G) é preparado pesando-se 3,73 g de Na₂EDTA.2H₂O e dissolvendo em 800 mL de água destilada desionizada; manter a gitação e adicionar lentamente 2,78 g de FeSO₄.7H₂O, completando o volume para 1000 mL e agitando novamente; transferir para frasco escuro, coberto com papel alumínio para bloquear a luz e armazenar em geladeira. O estoque de mistura orgânica (H) é preparado dissolvendo-se os 4 componentes em 300 mL de água destilada desionizada, completando-se o volume para 1000 mL, agitar bem e armazenar em geladeira. Usa-se 10 mL de cada um dos estoques por litro de MS preparado. (Caldas *et al.*, 1990).

TABELA 2 – Alguns reguladores de crescimento usados em cultura de tecidos

Classe	Abreviatura ou Nome comum	Nome químico	Peso Molecular
Auxinas	AIA	Ácido 3-idolilacético	175,2
	ANA	Ácido naftalenoacético	186,2
	AIB	Ácido indolbutírico	203,2
	CPA	Ácido (4-clorofenoxi) acético	208,0
	2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	221,0
	Picloram	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico	241,5
	NOA	Ácido naftoxiacético	202,2
Citocininas	Cinetina (KIN)	6-furfurilamino-purina	215,2
	BAP (BA)	6-benzilaminopurina= 6-benziladenina	225,2
	2iP	Isopentalidenina	203,2
	Zeatina (ZEA)	N ⁶ -(4-hidroxi-3-metilbut-2 enil) aminopurina	219,2
	PBA	(6-benzilamino)-9-2-tetraidropiranyl-9-H-purina	300,0
Giberelinas	Ácido Giberélico (GA ₃)	2,4 ^a ,7-trihidroxi-1-metil-8metilene-gib-3 ene-1,10-ácido carboxílico-1-4-lactona	364,4
Inibidores	ABA	Ácido abscísico	264,3

Fonte: Caldas *et al.*, 1990; Melo *et al.*, 1999.

Esterilização

Os meios são esterilizados por autoclavagem a 121° C (1 kg.cm-2) por 15–20 minutos após colocados nos recipientes de cultura. Os explantes também são submetidos a desinfecção com vários tipos de drogas; o sistema mais usado é a imersão em etanol (70%), por 1-2 minutos, sob constante agitação; após são enxaguados com água destilada e imersos em solução de hipoclorito de sódio (2%) durante 15-20 minutos sob agitação e enxaguados com água autoclavada já em câmara de fluxo laminar para evitar a recontaminação do material.

APLICAÇÕES DA CULTURA DE TECIDOS

As principais aplicações da cultura de tecidos são descritas a seguir (Torres *et al.*, 1998; Pereira e Melo, 2004):

Limpeza clonal – Utiliza-se principalmente ápices caulinares para propagação de plantas isentas de vírus. Uma das vantagens deste sistema é a manutenção da identidade do genótipo (planta) regenerado, que ocorre na maioria dos casos em virtude das células do meristema do ápice caulinar serem mais estáveis geneticamente. Além disso, o ápice é uma estrutura organizada, que pode se desenvolver em parte aérea num meio de cultura adequado, sem passar pela fase de calo, o que pode levar à alterações genéticas.

Conservação de germoplasma – A conservação *in vitro* é feita com o uso de técnicas que possibilitam a preservação da identidade genética e o retardamento do crescimento das culturas como a redução da temperatura de incubação, aplicação de retardantes osmóticos e hormonais no meio nutritivo, submersão das culturas em óleo mineral, utilização de suspensões celulares em meios líquidos sob agitação e armazenamento em baixa temperatura (-196°C) ou criopreservação.

Obtenção de mutantes *in vitro* – Agentes mutagênicos físicos (luz UV, raios X, raios gama, etc) e químicos (antibióticos, alquilantes, azidas, etc) possibilitam obter mutantes genéticos induzidos, com mutações cromossômicas e extranucleares. Usa-se para ampliação da variabilidade genética.

Produção de haplóides e duplos haplóides – Na produção de haplóides são utilizados principalmente a cultura de anteras ou de pólen, obtendo uma planta haplóide que passa por um tratamento específico com antimitóticos (ex.: colchicina) para a duplicação dos cromossomos. Os duplo-haplóides podem ser obtidos a partir da cultura *in vitro* de ovários ou óvulos não polinizados, ou após cultura de embriões resultantes de cruzamentos interespecíficos ou intergenéricos.

Produção de transgênicos – A cultura de tecidos vegetais é imprescindível no início da produção de transgênicos fornecendo células, protoplastos ou tecidos e, no fim do processo, para regenerar e selecionar plantas geneticamente transformadas. Os cultivares transgênicos geralmente são desenvolvidos através da cultura de tecidos em combinação com métodos de Biologia Molecular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSIS, F. de A.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. *In*: TORRES, Antônio.C.; CALDAS, Linda. S.; BUSO, José. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, p. 261-269, 1998. 509 p.
- BIASI, L. A.; CARVALHO, D. C. de; WOLF, G. D.; ZANETTE, F. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.1, Jaboticabal, abr. 2002.
- BRUNE, Arno. Estratégia da multiplicação vegetativa no melhoramento florestal. **Revista Árvore**, v.6, n.2, p. 162-165, Viçosa, 1982.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. *In*: TORRES, Antônio.C.; CALDAS, Linda. S.; BUSO, José. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, p. 87-132, 1998. 509 p.
- CARMO Júnior, José C. do; SILVA, Aloir R. da. **Produção de mudas de *Eucalyptus spp.* por estaquia**. São Mateus: FRDSA, 1989.
- CARNEIRO, V. T. de C.; CONROI, T.; BARROS, L. M. G.; MATSUMOTO, K. Protoplastos: cultura e aplicações. *In*: TORRES, Antônio.C.; CALDAS, Linda. S.; BUSO, José. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, p. 413-458, 1998. 509 p.
- CARPANEZZI, A.A.; TAVARES, F.R.; SOUZA, V.A. **Informações sobre a estaquia do salseiro (*Salix humboldtiana* WILLD.)**. Colombo: Embrapa Florestas, CT 33, 1999. 15p.
- CID, L. P. B. Suspensão celular. *In*: TORRES, Antônio.C.; CALDAS, Linda. S.; BUSO, José. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, p. 331-354, 1998. 509 p.
- FEVEREIRO, Manuel P.; CAETANO, Helena V.; SANTOS, Maria G. **Cadernos didáticos de Ciências, vol 1**. Lisboa: Ministério da Educação, DES, EEC, 2001.
- FLORIANO, Eduardo P. **Auditoria de operações - Florestas Rio Doce S.A.** São Mateus: FRDSA, 1998.
- GOMES, Raimundo P. **Fruticultura brasileira**, 11ª ed. São Paulo: Biblioteca Rural/Nobel, 1990. 446 p.
- GRAÇA, M. E. C.; TOTH, V. B. dos R. **Rebrota de *Eucalyptus dunnii*: a influência da altura, diâmetro e procedência no vigor das brotações**. Curitiba: Embrapa, Bol. Pesq. Flor. (20), p.49-57, 1990.
- GRATAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. *In*: TORRES, Antônio.C.; CALDAS, Linda. S.; BUSO, José. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, p. 183-260, 1998. 509 p.
- HARTMANN, H. T.; KESTIAN; DAVIES, F. T. **Plant, propagation, principles and practices englewood**. New Jersey: s.e., 1989.
- HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. *In*: TORRES, Antônio.C.; CALDAS, Linda. S.; BUSO, José. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, p. 371-394, 1998. 509 p.
- ICIAG. **Reprodução das fruteiras**. Uberlândia: UFU, ICIAG – Núcleo de Estudo em Fruticultura do Cerrado, 2003.
- INGLEZ de SOUZA, J. S. **Poda das plantas frutíferas**. São Paulo: Nobel, 1986. 222 p.: il.

- KALIL Filho, Antônio N. **Parafinação de tocos e indução de raízes de seringueira em Altamira, PA.** [s.l.]: Embrapa Florestas, CT 49, p.1-3, 2000.
- KITAMURA, M. C.; LEMOS, E. E. P. Enxertia precoce da gravioleira (*Annona muricata* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 186-188, Abril-2004.
- KOLLER, Otto C. **Citricultura: laranja, limão e tangerina.** Porto Alegre: Rigel, 1994. 446 p.
- MELO, Berildo de. **Reprodução de fruteiras.** Uberlândia: UFU/ICIAG, Núcleo de Estudo em Fruticultura no Cerrado, 2003. Disponível em: <<http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/reprodução.html>>. Acesso em: 12/jul/2004.
- MELO, Nataniel F. DE ; OKASAKI, Wagner Y.; LEITE, Cristino B.; FÁRI, Miklós. Estabelecimento do cultivo in vitro da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.). **Ciênc. e Agrotec.**, Lavras, v.23, n.1, p-102-107, jan./mar;. 1999.
- PÁDUA, T. Propagação de árvores frutíferas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 9, n. 101, p. 11-9, 1983.
- PAIVA, H. N. e GOMES, J. M. **Propagação vegetativa de espécies florestais.** Viçosa: UFV, 2001. 46 p.: il. (Série cadernos didáticos, 83).
- PAQUAL, M. Obtenção de Plantas por Cultura de Tecidos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, ano 11, n. 124, p. 63-68, 1985.
- PAZ, O. P.; PASCOAL, M. Microenxertia. In: TORRES, Antônio.C.; CALDAS, Linda. S.; BUSO, José. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA/CBAB, p. 147-160, 1998. 509 p.
- PEREIRA, C. D.; MELO, B. **Cultura de tecidos vegetais.** Uberlândia: UFU/ICIAG, 2004. Disponível em: <http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/cult_tecidos.htm>. Acesso em: 12/jul/2004.
- PEREIRA, D. **Enxertia em árvores frutíferas.** São Paulo: Nobel, 1988. 61 p.: il. (Coleção Campo & Cidade, 11).
- SIMÃO, Salim. **Tratado de fruticultura.** Piracicaba: FEALQ, 1998. 760 p.
- TODA FRUTA. **Propagação.** 2003. Disponível em: <<http://www.todafruta.com.br/todafruta/>>. Acesso em: 12/ago/2004.
- TORRES, A. C.; GUERRA, M. P.; FERREIRA, A. T. Cultura de Ovários. In: TORRES, Antônio.C.; CALDAS, Linda. S.; BUSO, José. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA/CBAB, p. 355-370, 1998a. 509 p.
- TORRES, A. C.; NISHIJIMA, M. L.; CATTONY, M. K. Polinização e fertilização *in vitro*. In: TORRES, Antônio.C.; CALDAS, Linda. S.; BUSO, José. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA/CBAB, p. 355-370, 1998b. 509 p.
- TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, Antônio.C.; CALDAS, Linda. S.; BUSO, José. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA/CBAB, p. 261-269, 1998c. 509 p.
- WENDLING, I.; XAVIER, A. Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado em espécies florestais. **Floresta e Ambiente**, V. 8, n.1, p.187-194, Viçosa, jan./dez. 2001.
- XAVIER, A.; SANTOS, G. A. dos; OLIVEIRA M. L. de. Enraizamento de miniestaca caulinar e foliar na propagação vegetativa de cedro-rosa (*Cedrela fissilis* Vell.). **Árvore**, Viçosa, v.27, n.3, p.351-356, 2003.