

LUCIR MARIA LOCATELLI

**INOCULAÇÃO MICORRÍZICA E ACLIMATIZAÇÃO DE PORTA-ENXERTOS
DE MACIEIRA (*Malus* spp.) MICROPROPAGADOS**

FLORIANÓPOLIS – SC

1999

LUCIR MARIA LOCATELLI

**INOCULAÇÃO MICORRÍZICA E ACLIMATIZAÇÃO DE PORTA-ENXERTOS
DE MACIEIRA (*Malus spp.*) MICROPROPAGADOS**

Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre.
Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia.
Universidade Federal de Santa Catarina
Orientador: Prof. Paulo Emílio Lovato

FLORIANÓPOLIS – SC

1999

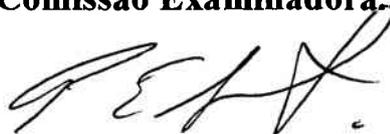
**"INOCULAÇÃO MICORRÍZICA E ACLIMATIZAÇÃO DE PORTA-ENXERTOS
DE MACIEIRA (*MALUS* SPP.) MICROPROPAGADOS"**

POR

LUCIR MARIA LOCATELLI

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final, pelo Orientador e membros
da Comissão Examinadora.**

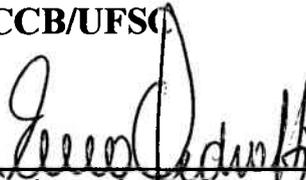
Comissão Examinadora:



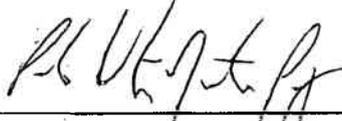
**Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato
ENR/CCA/UFSC - Orientador**



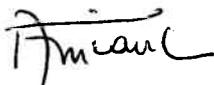
**Profa. Dra. Margarida Matos de Mendonça
MIP/CCB/UFSC**



**Prof. Dr. Enio Luiz Pedrotti
FIT/CCA/UFSC**



**Prof. Dr. Paulo Vítor Dutra de Souza
Depto. de Horticultura/UFRGS**



**Profa. Dra. Ana Maria Viana
Coordenadora do Curso de
Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC**

Florianópolis, maio de 1999

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade oferecida para realização deste curso e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

À Financiadora de Projetos e estudos (FINEP) pelo apoio aos trabalhos através do projeto: “Seleção de Clones de Porta-Enxertos de Macieira e de Fungos Micorrízicos Tolerantes a Condições Edáficas Prevalentes em Solos Ácidos da Região Sul - Santa Catarina.”

Ao professor Paulo Emílio Lovato pela orientação, ensinamentos e apoio.

Ao professor Jucinei Comin pelo incentivo, pela amizade, pelas críticas e pelas valiosas sugestões.

Ao professor Enio L. Pedrotti pelo fornecimento do material vegetal, e ao professor Alexandre V. Nogueira pelo fornecimento dos isolados de fungos micorrízicos utilizados.

Ao Cláudio pela amizade e pela imensa ajuda na execução dos experimentos.

Aos amigos pelo convívio e companheirismo.

A minha família pelo incentivo, amor e carinho dedicado em todos os momentos.

A todos aqueles que, mesmo não mencionados, tenham de algum modo participado de minha vida acadêmica e da realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	03
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
3.1. Micropropagação e Micorrização	04
3.2. Arquitetura do Sistema Radicular	09
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1. Material Vegetal	15
4.2. Fungos Micorrízicos Arbusculares	16
4.3. Instalação e Condução dos Experimentos	17
4.3.1. Desenvolvimento de Técnicas de Aclimatização e Inoculação Micorrízica do Porta-Enxerto Marubakaido Micropropagado e Submetido à Poda de Raízes	18
4.3.2. Desenvolvimento de Técnicas de Aclimatização e Inoculação Micorrízica dos Porta-Enxertos Marubakaido e M.9 Micropropagados	19
4.4. Coleta de Dados	20
4.4.1. Desenvolvimento Vegetativo de Parte Aérea	20
4.4.2. Colonização Micorrízica	20
4.4.3. Número e Comprimento de Raízes	21
4.4.4. Análise Estatística	21

5. RESULTADOS	22
5.1. Desenvolvimento de Técnicas de Aclimatização e Inoculação Micorrízica dos Porta-Enxertos Marubakaido e M.9 Micropropagados	22
5.1.1. Desenvolvimento de Técnicas de Aclimatização e Inoculação Micorrízica do Porta-Enxerto Marubakaido Micropropagado e Submetido à Poda de Raízes	22
5.1.2. Desenvolvimento de Técnicas de Aclimatização e Inoculação Micorrízica do Porta-Enxerto Marubakaido Micropropagado	25
5.1.3. Desenvolvimento de Técnicas de Aclimatização e Inoculação Micorrízica do Porta-Enxerto M.9 Micropropagado	28
5.2. Crescimento e Desenvolvimento do Sistema Radicular dos Porta-Enxertos Marubakaido e M.9 Micropropagados	30
5.2.1. Crescimento e Desenvolvimento do Sistema Radicular do Porta-Enxerto Marubakaido Micropropagado Submetido à Poda de Raízes	30
5.2.2. Crescimento e Desenvolvimento do Sistema Radicular do Porta-Enxerto Marubakaido Micropropagado	31
5.2.3. Crescimento e Desenvolvimento do Sistema Radicular do Porta-Enxerto M.9 Micropropagado	34
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÕES	48
8. ANEXOS	49
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE TABELAS

1. Fungos Micorrízicos Arbusculares com respectivos hospedeiros de origem e localidade de procedência17
2. Incremento em Altura (H), Peso de Matéria Seca de Parte Aérea (MAA), Peso da Matéria Fresca de Raízes (MFR) e Relação MFR/MFA (Produção de Matéria Fresca de Raízes / Produção de Matéria Fresca de Parte Aérea) de plantas do porta-enxerto Marubakaido micropropagadas, submetidas ou não à poda de raízes e com inoculação de fungos micorrízicos arbusculares antes e depois da fase de enraizamento das plantas. Valores coletados 51 dias após a saída das condições *in vitro*.23
3. Incremento em Altura (H), Peso de Matéria Seca de Parte Aérea (MAA), Peso da Matéria Fresca de Raízes (MFR) e Relação MFR/MFA (Produção de Matéria Fresca de Raízes / Produção de Matéria Fresca de Parte Aérea) de plantas do porta-enxerto Marubakaido micropropagadas e com inoculação de fungos micorrízicos arbusculares antes e depois da fase de enraizamento das plantas. Valores coletados 51 dias e 81 dias após a saída das condições *in vitro*.26
4. Incremento em Altura (H), Produção de Matéria Seca de Parte Aérea (MAA), Produção de Matéria Fresca de Raízes (MFR), Relação MFR/MFA (Produção de Matéria Fresca de Raízes / Produção de Matéria Fresca de Parte Aérea) de plantas do porta-enxerto M9 micropropagadas e com inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. Valores apresentados para os 51 dias e 81 dias após saída das plantas da cultura *in vitro*.28
5. Número e Comprimento de eixos radiculares e raízes de ordem 1, ordem 2, ordem 3 e total de plantas do porta-enxerto Marubakaido micropropagadas, submetidas ou não a poda de raízes e com inoculação de fungos micorrízicos arbusculares antes ou depois da fase de enraizamento.....32
6. Número e Comprimento de eixos radiculares e raízes de ordem 1, ordem 2, ordem 3 e total de plantas do porta-enxerto Marubakaido micropropagadas e

- com inoculação de fungos micorrízicos arbusculares antes e depois da fase de enraizamento. Valores coletados 51 dias após a saída das condições *in vitro*.....33
7. Número e Comprimento de eixos radiculares e raízes de ordem 1, ordem 2, ordem 3 e total de plantas do porta-enxerto Marubakaido micropropagadas e com inoculação de fungos micorrízicos arbusculares antes e depois da fase de enraizamento. Valores coletados 81 dias após a saída das condições *in vitro*.....35
8. Número e Comprimento de eixos radiculares e raízes de ordem 1, ordem 2, ordem 3 e total de plantas do porta-enxerto M.9 micropropagadas e com inoculação de fungos micorrízicos arbusculares antes e depois da fase de enraizamento. Valores coletados 51 dias após a saída das condições *in vitro*.....37
9. Número e Comprimento de eixos radiculares e raízes de ordem 1, ordem 2, ordem 3 e total de plantas do porta-enxerto M.9 micropropagadas e com inoculação de fungos micorrízicos arbusculares antes e depois da fase de enraizamento. Valores coletados 81 dias após a saída das condições *in vitro*.....38

LISTA DE FIGURAS

1. Porcentagem de Colonização Micorrízica (%) de plantas do porta-enxerto de macieira Marubakaido micropropagadas, submetidas ou não à poda de raízes e com inoculação de fungos micorrízicos arbusculares antes e depois da fase de enraizamento das plantas. Tratamentos: M1 = Sem poda de raízes, com inoculação micorrízica antes da fase de enraizamento; M2 = Sem poda de raízes, com inoculação micorrízica após a fase de enraizamento; M3 = Com poda de raízes, com inoculação micorrízica após a fase de enraizamento24
2. Porcentagem de Colonização Micorrízica (%) de plantas do porta-enxerto de macieira Marubakaido micropropagadas e com inoculação de fungos micorrízicos arbusculares antes e depois da fase de enraizamento das plantas. Tratamentos: M1 = inoculação micorrízica antes da fase de enraizamento; M2 = inoculação micorrízica após a fase de enraizamento.....27
3. Porcentagem de Colonização Micorrízica (%) de plantas do porta-enxerto de macieira M.9 micropropagadas e com inoculação de fungos micorrízicos arbusculares antes e depois da fase de enraizamento das plantas. Tratamentos: M1 = inoculação micorrízica antes da fase de enraizamento; M2 = inoculação micorrízica após a fase de enraizamento.....30

RESUMO

O uso de duas tecnologias combinadas, a micropropagação e a inoculação de fungos micorrízicos arbusculares, é uma alternativa para a produção de mudas de plantas em escala comercial. Essas técnicas são importantes, pois permitem produzir mudas em curtos períodos de tempo, com alta qualidade e homogeneidade. Entretanto, é importante definir as combinações de fungos, de planta, de substratos e técnicas de aclimatização e inoculação. Outra necessidade fundamental é conhecer o desenvolvimento radicular, visto que, apesar de ter implicações na capacidade da planta em obter nutrientes e água do solo, é um aspecto pouco considerado nas avaliações do crescimento e desenvolvimento vegetal. Um estudo em câmara de crescimento foi realizado com o objetivo de desenvolver procedimentos de aclimatização e de inoculação de fungos micorrízicos arbusculares em mudas micropropagadas de dois porta-enxertos de macieira, um vigoroso (Marubakaido) e outro nanizante (M.9), visando caracterizar o crescimento e o desenvolvimento do sistema radicular das plantas produzidas com as diferentes técnicas selecionadas. As bases das brotações dos porta-enxertos oriundas do processo de multiplicação *in vitro* foram imersas em solução de ácido indolibutírico (5 μ M) e transferidas para substrato à base de solo, a fim de serem enraizadas *ex vitro*. Os fungos micorrízicos arbusculares foram introduzidos antes e após a fase de enraizamento. Utilizou-se uma mistura constituída por *Scutellospora pellucida*, por dois isolados de *Glomus etunicatum*, e por *Glomus* sp. A fase de enraizamento durou 21 dias e foram realizadas duas avaliações, a primeira 51 dias após a saída das plantas das condições *in vitro* e a segunda aos 81 dias. Foram quantificados o incremento em altura, o peso da matéria seca de parte aérea, o peso de matéria fresca de raízes, a relação MFR/MFA, a colonização micorrízica, o número e o comprimento de eixos radiculares e de raízes laterais de diferentes ordens. A poda de raízes reduziu o crescimento de parte aérea e o número e comprimento de raízes do porta-enxerto Marubakaido. Em ambos porta-enxertos, entre 50% e 70% do sistema radicular foram colonizados pelos fungos micorrízicos arbusculares. A inoculação micorrízica teve efeito positivo sobre o crescimento de parte aérea e do sistema radicular do porta-enxerto Marubakaido, enquanto que o porta-enxerto M.9 teve seu desenvolvimento inibido pela presença dos fungos micorrízicos arbusculares. A inoculação micorrízica antes da fase de enraizamento aumentou o número e o comprimento de raízes do porta-enxerto Marubakaido, formando um sistema radicular potencialmente mais eficiente para a absorção de nutrientes do solo. Por outro lado, o porta-enxerto M.9 teve o número e o comprimento de raízes diminuído quando a inoculação micorrízica ocorreu antes da fase de enraizamento.

Palavras chaves: arquitetura radicular, época de inoculação micorrízica, Marubakaido, M.9, porta-enxertos de macieira, *Glomus etunicatum*, *Glomus* sp, *Scutellospora pellucida*, micropropagação e micorrização.

ABSTRACT

The combination of two technologies such as micropropagation and of inoculation arbuscular mycorrhizal fungi offers an alternative for the production of seedling plants on a commercial scale. These techniques are important because they allow high quality and homogeneous seedling production in a shorter period of time. Nevertheless, it becomes very important to understand the interaction among fungi, plants, substrates, acclimatization and inoculation techniques. Another fundamental need is to understand plant root development, as it has many implications on plant capacity to obtain water and nutrients from the soil. This developmental aspect has been given little consideration in growth evaluation and plant development. A study was performed under controlled conditions to develop procedures to acclimatize and to inoculate arbuscular mycorrhizal fungi into the vigorous strong-rooted Marubakaido rootstock and the dwarfing M. 9 rootstock. The effect of these procedures on root architecture was also evaluated. The technique used for rooting was an in vitro process, treatment with indole-butyric acid (5 μ M), and then transferral to a soil-based substrate to take root *ex-vitro*. The arbuscular mycorrhizal fungi were introduced before and after the rooting phase. A mixture of *Scutellospora pellucida*, two isolates of *Glomus etunicatum*, and *Glomus* sp was utilized. The rooting phase lasted 21 days and two evaluations: were done the first one at 51 days after the in vitro weaning stage and the second at 81 days. The following was quantified: the increase in height, the dry matter weight of the aerial part (RFM), the fresh material weight of the roots (AFM), the relation RFM/AFM, the mycorrhizal colonization, the number and the length of the root axis and lateral roots from different orders. Root pruning reduced shoot biomass and the number and length of the roots in Marubakaido plants. In both rootstocks, between 50% and 70% of the root system was colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. The mycorrhizal inoculation had a positive effect on root and shoot growth of the Marubakaido rootstock plants, but had a negative effect on growth in M.9 plants. Mycorrhizal inoculation before the rooting phase increased the root number and length of Marubakaido rootstock plants, forming a potentially more efficient root system, but had the opposite impact on the M.9 plants.

KEY-WORDS: root architecture, mycorrhizal inoculation period, Marubakaido, M.9, apple rootstock trees, *Glomus etunicatum*, *Glomus* sp., *Scutellospora pellucida*, micropropagation and mycorrhization.)

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos vinte anos, a cultura da macieira passou por uma grande transformação. Até 1979, o Brasil era o quarto maior importador mundial de maçã, em 1990 passou a uma situação de auto-suficiência, e em 1997 produziu 644.800 toneladas da fruta, tendo exportado 22.800 toneladas. A macieira é a principal cultura perene do Estado de Santa Catarina e representa um caso de sucesso de políticas públicas dentro do setor agrícola. Santa Catarina é hoje o maior produtor nacional, com uma área plantada de cerca de 14.000 hectares e uma produção de 367.000 toneladas na safra de 1998 (INFORME CONJUNTURAL, 1999). O Estado destaca-se no contexto nacional devido às condições climáticas que prevalecem em algumas regiões, e que são favoráveis para o cultivo da macieira.

Apesar dessa situação de auto-suficiência, muitos pomares apresentam baixa produtividade e frutos com qualidade inferior à exigida pelo mercado consumidor. Essa baixa produtividade é, em parte, decorrente da utilização de mudas de porta-enxertos com reduzida capacidade de enraizamento, com dificuldade para desenvolver suas raízes e absorver os nutrientes básicos, por causa de problemas como a grande acidez do solo e as altas concentrações de alumínio e manganês. Os porta-enxertos utilizados são pouco adaptados às condições edáficas das regiões produtoras, e esses fatores ocasionam elevadas perdas para as empresas produtoras de maçãs, pois a renovação dos pomares é onerosa e representa grandes investimentos.

Alternativas visando solucionar estes problemas têm incluído a seleção e a introdução de novos porta-enxertos tolerantes a baixo pH e resistentes a doenças do sistema radicular. Entretanto, a introdução de novas variedades ainda representa uma etapa a ser vencida, porque a produção de mudas dos novos porta-enxertos continua sendo feita de forma tradicional, ou seja por mergulhia de cepa, processo que freqüentemente leva a uma redução na capacidade de enraizamento das estacas à medida que as matrizes envelhecem.

A biotecnologia pode oferecer estratégias para a solução do problema de multiplicação e estabelecimento de novas plantas, e dentre as técnicas destaca-se a

micropropagação de plantas associada ao uso das micorrizas. A produção de mudas micropropagadas e micorrizadas pode apresentar vantagens sobre os sistemas tradicionais de produção, e essas vantagens somente serão exploradas se técnicas, simples e confiáveis, de aclimatização e inoculação de mudas micropropagadas forem desenvolvidas, pois o grau de benefícios resultante da inoculação depende das características da planta, do fungo e do solo. Além de diversos benefícios às plantas, a associação micorrízica pode causar alterações fisiológicas e morfológicas, inclusive modificações na arquitetura do sistema radicular.

O presente trabalho insere-se no projeto de pesquisa “Seleção de Clones de Porta-Enxertos de Macieira e de Fungos Micorrízicos Tolerantes a Condições Edáficas Prevalentes em Solos Ácidos da Região Sul - Santa Catarina”, que tem por objetivos a seleção de clones de porta-enxertos de macieira tolerantes às condições de estresses edáficos prevalentes em solos ácidos, a propagação em massa dos clones selecionados, a seleção de espécies de fungos micorrízicos arbusculares eficientes e tolerantes às condições de estresses edáficos, a produção de inóculo em escala experimental por técnicas de cultivo em vasos e, finalmente, a produção de mudas de porta-enxerto de macieira micropropagadas e micorrizadas.

Visando contribuir para o alcance de parte dos objetivos do projeto de pesquisa, foi realizado o presente trabalho, que está dividido em duas partes complementares: o desenvolvimento de técnicas de aclimatização e micorrização de mudas de porta-enxertos de macieira micropropagados e estudos básicos sobre o efeito da poda de raízes e de diferentes épocas de inoculação micorrízica no crescimento e desenvolvimento do sistema radicular desses porta-enxertos. A primeira parte tem por meta gerar tecnologia adequada para a produção de mudas de porta-enxertos de macieira micropropagados e micorrizados, visando melhorar sua capacidade produtiva. A segunda parte propõe-se a caracterizar o crescimento e desenvolvimento do sistema radicular dos porta-enxertos de macieira associados a micorrizas e produzidos com as diferentes técnicas selecionadas.

2. OBJETIVOS

Geral:

Desenvolver procedimentos de aclimatização e inoculação com fungos micorrízicos arbusculares de dois porta-enxertos de macieira micropropagados, caracterizando o crescimento e o desenvolvimento do sistema radicular das plantas produzidas com as diferentes técnicas selecionadas.

Específicos

1. Estabelecer técnicas de aclimatização e inoculação de fungos micorrízicos arbusculares em mudas micropropagadas dos porta-enxertos Marubakaido e M.9.

2. Avaliar o crescimento e o desenvolvimento de parte aérea dos porta-enxertos de macieira Marubakaido e M.9 micropropagados, inoculados ou não com fungos micorrízicos arbusculares em duas épocas diferentes.

3. Quantificar o crescimento e o desenvolvimento de diferentes ordens de raízes dos porta-enxertos de macieira Marubakaido e M.9 micropropagados, associado ou não a fungos micorrízicos arbusculares em duas épocas diferentes.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Micropropagação e Micorrização

A biotecnologia vegetal desperta grande interesse devido ao seu potencial de aplicação dentro de várias áreas, incluindo a agricultura. Na biotecnologia vegetal, a ênfase está na possibilidade de se manipularem as espécies vegetais, especialmente para multiplicá-las rapidamente (HARTMANN *et al.*, 1990; GEORGE, 1993; VESTEBERG & ESTAÚN, 1994).

A micropropagação de plantas é uma importante ferramenta biotecnológica, freqüentemente aplicada no melhoramento genético, em processos de produção de mudas, investigações científicas, programas de preservação da biodiversidade vegetal e na produção de biomassa para extração de produtos bioquímicos (GEORGE, 1993; VARMA & SCHUEPP, 1995). Esta técnica é eficiente na seleção e propagação de plantas homogêneas e de alta qualidade, e pode ser iniciada a partir de pequenos segmentos, ou mesmo de células, de tecidos vegetais (GEORGE, 1993). O processo de micropropagação é realizado em condições axênicas e, desta forma possibilita a obtenção de mudas enraizadas em curtos período de tempo e livres de patógenos, abrindo a possibilidade de eliminar viroses (GEORGE, 1993; SCHUCH & PETERS, 1993).

O processo de micropropagação difere dos métodos de propagação tradicional pela separação de componentes biológicos do sistema, e pelo alto grau de controle que é possível em cada etapa do processo. Cada passo da seqüência pode ser manipulado pela seleção de plantas ou pelo controle ambiental, a fim de maximizar a produção de plantas em termos de número, tamanho e qualidade (HARTMANN *et al.*, 1990).

MURASHIGE (1974) estabeleceu uma seqüência de eventos associados com o processo de multiplicação, que envolve três fases: seleção do material vegetal que originará as culturas axênicas, multiplicação do material vegetal, enraizamento das plantas e aclimatização destas. Este procedimento tem sido adotado tanto por pesquisadores como

pelos laboratórios comerciais, porque estas fases descrevem os procedimentos do processo de micropropagação. DEBERGH & MAENE (1981) propuseram mudanças nesta seqüência de eventos, e introduziram uma quarta fase, onde as plantas são transferidas para o ambiente externo. Independentemente da classificação adotada, a micropropagação envolve os seguintes passos básicos: seleção e preparação do material que dará origem a cultura; estabelecimento de culturas axênicas; multiplicação das brotações; enraizamento das brotações; aclimatização ou transferência das plantas para o ambiente natural (DEBERGH & MAENE, 1981; GEORGE, 1993).

A aclimatização é considerada uma fase crítica para o estabelecimento das novas plantas, e constitui uma etapa que pode comprometer todo o sistema de produção (DEBERGH & MAENE 1981; HARTMANN *et al.*, 1990). No momento de saída das condições *in vitro* as plantas micropropagadas são mais susceptíveis aos estresses ambientais, devido ao fraco desenvolvimento do sistema radicular e à formação incompleta dos estômatos ou, ainda, por causa do desenvolvimento incipiente da cutícula das folhas (HOOKER *et al.*, 1994). Além disso, a fase de aclimatização das plantas micropropagadas envolve a passagem da planta de uma condição heterotrófica (*in vitro*) para uma autotrófica (*ex vitro*).

Quando as plantas são enraizadas *in vitro*, as zonas de transição entre as raízes e a parte aérea podem ser anormais (GROUT & ASTON, 1977), as conexões vasculares são por vezes incompletas e restringem a passagem da água absorvida pelas raízes. As raízes que crescem *in vitro* perdem os pêlos radiculares e podem morrer quando transferidas para o substrato, ou as plantas podem cessar seu crescimento (DEBERGH & MAENE, 1981). No momento da transferência das plantas para a fase *ex vitro*, é fundamental que elas possuam órgãos bem formados e fisiologicamente eficientes para garantir a sua sobrevivência, crescimento e desenvolvimento.

A macieira é considerada uma espécie de difícil enraizamento e possui baixa taxa de sobrevivência em condições *ex vitro* (YUI *et al.*, 1989). Por isso, é geralmente adotado o enraizamento *ex vitro*, no qual as plantas são submetidas simultaneamente ao enraizamento e à aclimatização. O enraizamento *ex vitro* de plantas micropropagadas pode ter bons resultados quando as plantas são mergulhadas em solução contendo auxina, com subsequente transplante para substratos mantidos em condições de alta umidade. Esse sistema, que pode reduzir os custos do processo e ser eficiente para a produção de mudas

(GEORGE, 1993), foi proposto por WELANDER (1983) e por ZIMMERMAN & FORDHAM (1985), que expuseram as plantas de macieira ao tratamento com ácido indolibutírico por 3-7 dias, com posterior transferência das plantas para o substrato.

Entre as diversas vantagens que a micropropagação apresenta na produção rápida de mudas em larga escala está a eliminação de microrganismos potencialmente danosos. No entanto, também são eliminados organismos que podem favorecer o estabelecimento das mudas micropropagadas e o seu crescimento após o transplante (GRANGER *et al.*, 1983), como os fungos micorrízicos.

As micorrizas arbusculares, associações mutualísticas entre certos fungos do solo e as raízes da maioria das plantas, constituem uma importante ligação entre os componentes bióticos e abióticos do solo, desempenhando papel fundamental na sobrevivência, no crescimento e desenvolvimento das plantas (SMITH & READ, 1997). As micorrizas são amplamente reconhecidas pelo efeito positivo que proporcionam no crescimento da planta, pela melhora na absorção de nutrientes, especialmente o fósforo, pelo aumento do volume de solo explorado e pela resistência a estresses bióticos e abióticos (GIANINAZZI *et al.*, 1990; GUILLEMIN *et al.*, 1994). Como efeitos indiretos no crescimento da planta, a associação promove a formação de agregados do solo e a acumulação de substâncias húmicas (SCHREINER & BETHLENFALVAY, 1995).

O efeito primário da associação micorrízica é o aumento da absorção de nutrientes minerais pela planta, em particular dos elementos com pouca mobilidade, ou que estão presentes em baixas concentrações na solução do solo (AZCÓN-AGUILAR & BAREA, 1997). As micorrizas são particularmente importantes em novas culturas, em solos com problemas de baixa mobilidade de nutrientes, contaminados por metais pesados, ou em sistemas agrícolas onde a entrada de insumos é minimizada (AZCÓN-AGUILAR & BAREA, 1997).

A introdução de fungos micorrízicos arbusculares tem um grande potencial nos programas de produção de mudas micropropagadas (SALAMANCA *et al.*, 1992; LOVATO *et al.*, 1995). Além de aumentar o vigor e a capacidade de sobrevivência das plantas pelo aumento na absorção de nutrientes, as micorrizas podem aumentar a tolerância a patógenos radiculares e reduzir o nível de aplicação de fertilizantes (HOOKER *et al.*, 1994). Dentre os benefícios que as micorrizas trazem à produção de plantas micropropagadas destacam-se: a possibilidade de saída mais precoce das condições *in*

vitro, e redução no tempo de aclimatização (AZCÓN-AGUILAR *et al.*, 1992; VESTBERG, 1992); maior homogeneidade das plantas quanto ao crescimento (BRANZANTI *et al.*, 1992) ou quanto à resposta a nutrientes (BLAL & GIANINAZZI-PEARSON, 1989), bem como maior tolerância a estresses causados por patógenos (GUILLEMIN *et al.*, 1994). Os efeitos da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares na nutrição e crescimento de mudas de macieira micropropagadas já foram avaliados em diversos trabalhos (REICH, 1988; TAUBE-BAAB & BALTRUSCHAT, 1993; UOSUKAINEN & VESTEBERG, 1994; FORTUNA *et al.*, 1996; UOSUKAINEN & VESTEBERG, 1996).

Diversos fatores podem afetar os resultados da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares, e entre estes estão: o momento de inoculação (*in vitro* ou *ex vitro*), a espécie vegetal, o fungo micorrízico, a composição química e física do substrato e as condições ambientais (VESTEBERG & ESTAÚN, 1994). Para se obterem os benefícios que a inoculação de fungos micorrízicos arbusculares pode proporcionar às plantas micropropagadas, todos estes fatores devem ser considerados, e é de fundamental importância que a associação micorrízica seja estabelecida em curto período de tempo (LOVATO *et al.*, 1996).

A inoculação dos fungos micorrízicos arbusculares é geralmente feita após as raízes terem sido formadas, o que limita a época de inoculação a três momentos: *in vitro* na fase de enraizamento, *ex vitro* antes da fase de aclimatização e *ex vitro* após a aclimatização (VESTEBERG & ESTAÚN, 1994). Sendo, a época de inoculação um fator crítico dentro dos programas de produção de mudas micropropagadas, o benefício para a planta, de modo geral, é maior quando mais cedo este procedimento ocorrer (BAREA *et al.*, 1993; AZCÓN-AGUILAR & BAREA, 1997).

As plantas micropropagadas podem ser inoculadas durante a fase *in vitro*, mas isso requer um prolongamento desta fase, implicando em significativa elevação dos custos do processo de produção de mudas (VESTEBERG & ESTAÚN, 1994). A inoculação *in vitro* é um processo laborioso e envolve mão de obra treinada e especializada, além de não ser recomendado para todas as espécies de plantas. Esta forma de inoculação pode ser indicada somente para determinadas espécies ou em programas de pesquisas científicas. A simbiose na fase *in vitro* nem sempre é possível porque muitas plantas desenvolvem apenas raízes

primárias nesta fase, e os fungos micorrízicos arbusculares colonizam somente raízes secundárias (BRUNDRETT *et al.*, 1985).

A inoculação do fungo micorrízico *ex vitro* pode ser feita imediatamente após a fase de enraizamento *in vitro*, quando as plantas são transferidas para a fase de aclimatização, ou, ainda, após o período de aclimatização sob condições de casa de vegetação. Muitos trabalhos referentes à inoculação *ex vitro* de plantas micropropagadas têm sido feitos, principalmente com frutíferas. RAVOLANIRINA *et al.* (1989), SCHUBERT *et al.* (1990), BLAL *et al.* (1990), GUILLEMIN *et al.* (1994) e VESTEBERG *et al.* (1994) inocularam diversas plantas hospedeiras com uma mistura de solo contendo raízes colonizadas, hifas e esporos e demonstraram que o melhor período para a inoculação de fungos micorrízicos arbusculares é no início da fase de aclimatização, quando as plantas têm apenas primórdios radiculares. Os resultados obtidos por esses pesquisadores indicam um aumento no crescimento e um aumento na tolerância a patógenos (GUILLEMIN *et al.* 1994).

A inoculação *ex vitro* após o período de aclimatização foi testada por alguns pesquisadores, como, por exemplo, AZCÓN-AGUILAR *et al.* (1994); VESTEBERG & ESTAÚN (1994) e UOSUKAINEN & VESTEBERG (1994). A inoculação antes e após a fase de aclimatização foi experimentada e constatou-se que a simbiose foi bem estabelecida com ambas as técnicas, mas que as melhores respostas foram verificadas quando a inoculação ocorreu antes da fase de aclimatização.

Para espécies lenhosas, a incorporação do inóculo ao substrato durante a fase de aclimatização tem propiciado os melhores resultados (BRANZANTI *et al.*, 1991; BRANZANTI *et al.* 1992; RAPPARINI *et al.*, 1994; UOSUKAINEN & VESTEBERG, 1994; BERTA *et al.*, 1995; UOSUKAINEN & VESTEBERG, 1996). Especificamente para a macieira, BRANZANTI *et al.* (1992) propuseram um método eficiente de colonização de plantas micropropagadas, em que a aplicação do inóculo na fase *ex vitro* foi o mais vantajoso para esta cultura. A inoculação de fungos micorrízicos arbusculares nos trabalhos citados foi realizada em plantas já enraizadas. Não foi possível encontrar informações sobre a melhor época de inoculação quando as mudas são enraizadas em condições *ex vitro*. Os trabalhos publicados sobre enraizamento *ex vitro* da macieira não levam em conta a inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (WELANDER, 1983; ZIMMERMAN & FORDHAM, 1985).

Trabalhos com plantas micropropagadas comprovaram que a inoculação micorrízica pode favorecer o rápido desenvolvimento de um sistema radicular funcional (TISSERANT *et al.*, 1992), que é crítico para o estabelecimento de muitas espécies lenhosas. A forma e distribuição das raízes influenciam no funcionamento do sistema radicular, sendo necessário entender os efeitos dos fungos micorrízicos nas primeiras fases do crescimento e do desenvolvimento radicular, particularmente de porta-enxertos que são freqüentemente micropropagados para obtenção de clones homogêneos e livre de doenças (BERTA *et al.*, 1995).

3.2. Arquitetura do Sistema Radicular

O crescimento e o desenvolvimento vegetal dependem de uma estreita relação entre parte aérea e raízes, e a interdependência entre essas partes é uma característica básica da fisiologia das plantas. É de fundamental importância que as plantas possuam um sistema radicular eficiente, visto que as raízes fornecem estabilidade para a parte aérea, realizam a absorção de água e nutrientes e são o órgão onde ocorre a associação micorrízica e, em alguns casos, a fixação biológica do nitrogênio (FITTER *et al.*, 1991; HOOKER *et al.*, 1996).

Quando uma certa quantidade de raízes é removida, observa-se uma aceleração do crescimento do sistema radicular em relação à parte aérea da planta (MARSCHNER, 1995). Se, de forma inversa, a remoção acontecer na parte aérea, ocorrerá uma parada no crescimento das raízes até que o equilíbrio entre ambas seja restabelecido. Nestas situações, a planta tenta compensar a lesão, e ocorre uma transferência de fotossintatos em direção à área afetada, visando recompor a região (TAYLOR & ARKIN, 1981).

A remoção parcial ou total do sistema radicular pode proporcionar diferentes efeitos fisiológicos sobre as plantas. Por exemplo, THOMAS & RAVINDRA (1997) recomendam a remoção parcial ou total das raízes produzidas *in vitro*, porque isso possibilitaria uma melhor formação de raízes adventícias e as plantas obtidas seriam mais uniformes. OLIEN

et al. (1993) prescrevem a poda das raízes de videira, pois este tipo de tratamento aumentou o comprimento total das raízes. A poda de raízes do porta-enxerto de macieira Marubakaido micropropagado provocou redução no crescimento vegetativo e diferentes respostas nos padrões de arquitetura radicular (FRÁGUAS *et al.*, 1997).

A poda de raízes foi um tratamento adotado por muito tempo por produtores de mudas, porque as raízes formadas ou desenvolvidas *in vitro* geralmente são escassas, finas, sem pelos radiculares e com pouca epiderme. As conexões entre as raízes e a base do caule são incompletas ou anormais e resultam num sistema ineficiente para transferência de água e minerais entre raízes e parte aérea, embora o xilema apareça de forma contínua e funcional (GROUT & ASTON, 1977; DONNELLY *et al.*, 1985; McCLELLAND & SMITH, 1989). As raízes formadas *in vitro* freqüentemente morrem ou têm seu crescimento retardado após a transferência para o meio *ex vitro*. Essas raízes, em muitos casos, morrem na fase de aclimatização e novas raízes iniciam seu desenvolvimento (DEBERGH & MAENE, 1981). Raízes que crescem *in vitro* também podem ser danificadas quando transferidas para a fase de aclimatização, principalmente se elas são lavadas para a remoção do meio de cultura.

O desenvolvimento do sistema radicular envolve a produção, alongação e ramificação de novas raízes (PELLERIN & PAGÈS, 1994), mas em condições experimentais o crescimento do sistema radicular é normalmente expresso em termos de comprimento total de raízes ou peso total do sistema radicular. As medidas de biomassa (peso da matéria fresca e peso da matéria seca) de raízes são os parâmetros mais comumente utilizados para quantificar o crescimento e o desenvolvimento de raízes, e os fatores que afetam o crescimento radicular são freqüentemente definidos pela variação nestas medidas. Medidas de biomassa usadas isoladamente, sem considerar a dinâmica de alocação de carbono, podem levar a interpretações erradas sobre a distribuição das raízes e manutenção de suas funções (FITTER *et al.*, 1991). O peso do sistema radicular é geralmente pouco correlacionado com a capacidade de absorção de nutrientes e água, porque o eixo principal, que contribui de forma preponderante para a medida de biomassa, atua de forma restrita na absorção de nutrientes (HETRICK, 1991). Por essa razão, é importante caracterizar a arquitetura radicular das plantas, visto que são as raízes laterais ou raízes finas que desempenham o papel principal na absorção dos nutrientes, embora contribuam muito pouco para a medida de biomassa (HETRICK *et al.*, 1992). Pouca

atenção tem sido dada a aspectos relacionados à arquitetura radicular, como número e comprimento de eixos radiculares ou densidade e comprimento de raízes laterais (PELLERIN & PAGÈS, 1994).

A arquitetura radicular, definida como a configuração espacial do sistema radicular, é um aspecto fundamental na produtividade da planta e é de grande interesse para a agricultura e a ecologia (LYNCH, 1995). O desenvolvimento espacial das raízes é importante no crescimento e sobrevivência das plantas, dada a escassez e desuniformidade na distribuição dos recursos no solo (YANO *et al.*, 1996; NIELSEN *et al.*, 1997).

As raízes oferecem sustentação física para a planta e a arquitetura do sistema radicular também influencia a ancoragem da planta. O formato exibido pelo sistema radicular como um todo é fator fundamental na capacidade que este possui em suportar o peso da parte aérea. As características que melhor promovem estabilidade para a planta ainda não são conhecidas, mas estudos recentes argumentam que uma distribuição simétrica das raízes laterais ao redor do eixo principal poderá deixar a planta menos vulnerável (STOKES *et al.*, 1996). Um aumento na estabilidade da planta pode ser função do aumento do comprimento de raízes, mudanças na arquitetura ou mesmo da combinação de ambos os parâmetros.

Muitos autores têm demonstrado ligações entre arquitetura radicular e ancoragem da planta (FITTER, 1985; ENÑOS & FITTER, 1992) ou absorção de água e nutrientes (SATTELMACHER *et al.*, 1993). A forma como as raízes se distribuem, ou seja, o padrão de ramificação das raízes, é a principal característica do sistema radicular e representa papel central na funcionalidade das raízes (FITTER *et al.*, 1991). O padrão de ramificação encontrado no sistema radicular das plantas influencia na sua eficiência em explorar o solo para obter água e nutrientes (FITTER, 1987).

BERNSTON (1994, 1997) definiu os diferentes componentes das raízes, os padrões de ramificação e alguns modelos matemáticos utilizados em estudos relacionados à arquitetura do sistema radicular. Segundo o autor, eixo radicular refere-se a uma porção linear do sistema radicular, que conecta-se com o caule, e ordem refere-se a uma porção do sistema localizado entre o eixo radicular e um ponto de divisão. O eixo radicular é geralmente denominado de ordem 0 (zero) ou simplesmente eixo radicular, e as raízes subordinadas a este são de ordem 1, as raízes que originam-se de raiz de ordem 1 são denominadas de ordem 2, e assim sucessivamente.

O conhecimento da distribuição das raízes de diferentes ordens é importante porque estas podem ter diferentes funções. Raízes de diferentes ordens variam em seu crescimento, tempo de vida (longevidade) e características estruturais, bem como na sua capacidade de absorver água e nutrientes ou sustentar a associação micorrízica (BRUNDRETT *et al.*, 1996).

As plantas que produzem maior interface com o solo têm maior potencial de absorção, o que requer maior investimento de carbono para a planta crescer e manter suas raízes (FITTER *et al.* 1991). Como alternativa, a planta pode produzir mais raízes finas que oferecem retorno maior para o carbono investido, mas tais raízes têm potencial de crescimento limitado, vida curta e são vulneráveis a danos físicos por dessecação ou pelo ataque de patógenos. Essas limitações podem ser superadas pelo aumento no diâmetro, mas isso requer grande investimento de carbono. O alongamento das raízes, com esparsas ramificações, permite ampliar o volume de solo explorado, mas este tipo de padrão é menos eficiente no transporte de nutrientes e também representa grande investimento de carbono (FITTER *et al.* 1991).

Uma estratégia alternativa para a planta possuir um sistema radicular eficiente na absorção de nutrientes e com baixo investimento de carbono é oferecido pela associação micorrízica. Na simbiose, a planta fornece nutrientes orgânicos para o fungo e o fungo simbiote, em retorno, absorve do solo nutrientes inorgânicos através de suas hifas (SMITH & READ, 1997). Embora esteja bem estabelecido que a colonização das raízes pelos fungos micorrízicos arbusculares resulte em mudanças a nível celular, com formação de vesículas e arbúsculos, por muitos anos considerou-se que a presença da micorriza não afetava a morfologia do sistema radicular. No livro *Mycorrhizal Symbiosis*, que foi uma referência básica na área de micorriza, HARLEY & SMITH (1983) afirmaram que a associação micorrízica não influenciava na morfologia do sistema radicular. Contudo, estudos posteriores demonstram que a formação de micorrizas pode induzir modificações morfológicas no sistema radicular das plantas hospedeiras. Por exemplo, BERTA *et al.* (1990) demonstraram que o sistema radicular de plantas de alho poró colonizadas por fungos micorrízicos arbusculares apresentavam um aumento no número de raízes adventícias e redução no comprimento destas. Eles sugeriram que tais modificações estariam relacionadas a uma redução na atividade meristemática e a um aumento no índice de metáfase das células. TROTTA *et al.* (1991), utilizando a mesma combinação de planta

hospedeira e fungo, obtiveram modificações na arquitetura radicular, e levantaram a hipótese de que as modificações seriam relacionadas ao estado nutricional da planta. SCHELLENBAUM *et al.* (1991), utilizando a mesma metodologia que BERTA *et al.* (1990), constataram que plantas de videira, quando associadas a fungos micorrízicos arbusculares, apresentavam um aumento no número e no comprimento de raízes laterais. Resultados similares foram obtidos por PRICE *et al.* (1989), HETRICK *et al.* (1991), HOOKER *et al.* (1992), TISSERANT *et al.* (1992), BERTA *et al.* (1995), NORMAN *et al.* (1996) e FORTUNA *et al.* (1998). Por outro lado, MASCHKE *et al.* (1996) e YANO *et al.* (1996) verificaram que as plantas colonizadas por fungos micorrízicos arbusculares apresentavam uma redução no comprimento individual de raízes e um aumento no número de eixos radiculares.

Divergências entre os resultados podem ter ocorrido porque os trabalhos relacionados foram feitos com diferentes plantas hospedeiras e fungos micorrízicos, mas os resultados obtidos por esses pesquisadores demonstram que a formação de micorrizas pode alterar a morfologia do sistema radicular. O padrão de alteração varia, porém, conforme a espécie hospedeira e o fungos micorrízicos arbusculares utilizados (HETRICK *et al.*, 1988; BERTA *et al.*, 1993; YANO *et al.*, 1996).

A adaptação das plantas às modificações ambientais envolve mudanças no crescimento e desenvolvimento, e estes são controlados pelos hormônios vegetais (SALISBURY & ROSS, 1993), que por sua vez podem estar envolvidos no estabelecimento da associação e regular mudanças no crescimento (SMITH & GIANINAZZI-PEARSON, 1988; SCHWAB *et al.*, 1991). Existem poucos registros na literatura sobre o efeito dos hormônios vegetais no crescimento e desenvolvimento do sistema radicular de plantas associadas aos fungos micorrízicos. Dentre eles, o trabalho de DUTRA *et al.* (1996) demonstrou que plantas associadas a fungos micorrízicos arbusculares recebendo aplicação exógena de ácido indolibutírico apresentavam um aumento na produção de biomassa aérea e uma melhora no desenvolvimento radicular, e a resposta obtida era decorrente da interação entre as variáveis presença do fungo micorrízico e aplicação exógena de ácido indolibutírico.

As modificações na morfologia do sistema radicular desenvolvidas pela presença da associação micorrízica parecem estar condicionados a fatores internos e externos, e aparecem como uma resposta adaptativa da planta às condições predominantes em um

determinado momento (HETRICK *et al.*, 1988; FITTER *et al.* 1991). O conhecimento das modificações ocorridas na morfologia do sistema radicular colonizado por fungos micorrízicos arbusculares poderá auxiliar no entendimento dos mecanismos pelos quais a associação influencia na absorção de nutrientes e na ciclagem destes em ambientes naturais ou em sistemas agrícolas (HOOKER & ATKINSON, 1992).

Conhecer como e porque a morfologia é alterada pelos fungos micorrízicos arbusculares pode ajudar a prever como a planta se comportará em relação à associação micorrízica. Assim, poder-se-á saber quais procedimentos devem ser adotados para uma boa aclimatização e para obter-se um crescimento mais rápido. Há um grande potencial para manipular a morfologia do sistema radicular em benefício do estabelecimento e crescimento *ex vitro* de plantas micropropagadas ou mesmo de plantas produzidas em outros sistemas onde os fungos micorrízicos arbusculares normalmente não estão presentes (HOOKER & ATKINSON, 1992). Assim, o estudo do comportamento, frente a associação micorrízica, de porta-enxertos com sistemas radiculares com vigor diferenciado poderá trazer informações úteis na implementação de duas técnicas, a micropropagação e a micorrização de plantas. Por essa razão, optou-se por investigar o comportamento de dois porta-enxertos freqüentemente utilizados em Santa Catarina (DENARDI, 1985): o Marubakaido, vigoroso e com grande capacidade de enraizamento, e o M.9, nanizante e com sistema radicular pouco desenvolvido.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Engenharia Rural - Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Santa Catarina.

4.1. Material Vegetal

Os materiais de origem vegetal foram produzidos no Laboratório de Morfogênese Vegetal - Departamento de Fitotecnia - Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Santa Catarina.

Os porta-enxertos de macieira utilizados foram M.9 e Marubakaido. O porta enxerto M.9 pertence à espécie *Malus pumila* (Mill), com origem na variedade “Jaune de Metz” ou “French Paradise”. O desenvolvimento do sistema radicular deste porta-enxerto nanizante é lento e ele produz raízes extremamente quebradiças. O porta-enxerto Marubakaido ou Maruba, pertencente à espécie *Malus prunifolia* (Willd. Borkh), tem origem japonesa, é vigoroso, possui elevada precocidade e é de alta produtividade e fácil enraizamento (DENARDI, 1985).

Na multiplicação dos explantes foi utilizado o meio com vitaminas e sais de MS, acrescidos de 100 mg/l mio-inositol, 30g/l sacarose, 6 g/l de ágar e 0,25 mg/l de benzilaminopurina (BAP). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8. Os explantes permaneceram por 60 dias em sala de crescimento temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$, fotoperíodo de 16 horas/dia e intensidade de radiação fotossinteticamente ativa de $40 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$.

As bases das brotações, oriundas do processo de multiplicação *in vitro*, com 4-5 pares de folhas e 3-4 cm de altura, foram imersas em solução com 5 μM de ácido indolibutírico (AIB) por 20 segundos e, então, transferidas para o substrato de aclimatização (PEDROTTI & VOLTOLINI, 1997).

As plantas foram submetidos à simulação de túnel de aclimatização por um período de 21 dias. Nesta fase, as plantas micropropagadas foram enraizadas e aclimatizadas

simultaneamente, permanecendo sob alta umidade, temperatura de $21^{\circ}\text{C} \pm 3$, fotoperíodo de 16 horas/dia e intensidade de radiação fotossinteticamente ativa de $73 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ na altura média das plantas.

4.2. Fungos Micorrízicos Arbusculares

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) utilizados foram escolhidos de acordo com sua origem/procedência (Tabela 1), e conforme desempenho no processo de multiplicação (Relatório CNPq 97 – Bolsa de Apoio Técnico - Dados não publicados). Os fungos micorrízicos arbusculares foram cedidos pelo Laboratório de Micorrizas do Departamento de Microbiologia e Parasitologia – Centro de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Santa Catarina. Os fungos micorrízicos arbusculares foram multiplicados a partir de culturas em vasos, em casa de vegetação, tendo como hospedeiros multiplicadores *Paspalum notatum* e *Tagetes erecta*.

As culturas em vasos permaneceram três meses em casa de vegetação e, ao final deste período, foram analisados o número de esporos e a intensidade de colonização micorrízica. Como inóculo micorrízico utilizou-se uma mistura dos seguintes fungos micorrízicos arbusculares: # 02 – *Scutellospora pellucida*, # 06 – *Glomus etunicatum*, # 08 – *Glomus etunicatum* e # 35 – *Glomus* sp. O inóculo micorrízico constituiu-se de solo contendo esporos, hifas e fragmentos de raízes das plantas multiplicadoras, e cada planta recebeu aproximadamente um grama dessa mistura.

A microbiota não micorrízica do solo foi obtida através de uma suspensão do próprio inoculante micorrízico. Para um litro de água destilada foram adicionados 100 gramas do inoculante micorrízico. O material foi submetido a agitação intensa, e a suspensão obtida foi passada em papel filtro com abertura de $50 \mu\text{m}$. A cada uma das plantas dos tratamentos denominados não inoculados foi adicionado 1 ml dessa suspensão.

Tabela 1: Fungos Micorrízicos Arbusculares com respectivos hospedeiros de origem e localidade de procedência.

Número Referência e Espécie do Fungo	Hospedeiro de Origem	Localidade de Recuperação
# 02 – <i>Scutellospora pellucida</i>	<i>Vitis labrusca</i> *	Fraiburgo/SC
# 06 – <i>Glomus etunicatum</i>	<i>Vitis labrusca</i> *	Azambuja/SC
# 08 – <i>Glomus etunicatum</i>	<i>Malus</i> sp *	São Joaquim/SC
# 35 – <i>Glomus</i> sp	<i>Malus</i> sp *	São Joaquim/SC

* Pomares comerciais

4.3. Instalação e Condução dos Experimentos

Foram realizados três experimentos para avaliação dos efeitos da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares sobre o crescimento e desenvolvimento dos porta-enxertos de macieira micropropagados. No primeiro experimento, foram estabelecidos procedimentos para aclimatização e inoculação das mudas micropropagadas, avaliando-se o efeito da poda das raízes e da época da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares sobre o crescimento e desenvolvimento de parte aérea e do sistema radicular do porta-enxerto Marubakaido. No segundo experimento, avaliou-se o efeito de duas épocas de inoculação sobre o crescimento e desenvolvimento de parte aérea e do sistema radicular do porta-enxerto Marubakaido e, no terceiro experimento, avaliou-se o efeito de diferentes épocas de inoculação sobre o crescimento e desenvolvimento de parte aérea e do sistema radicular do porta-enxerto M.9. Os procedimentos do primeiro experimento estão descritos no item 4.3.1 e os procedimentos do segundo e terceiro experimento estão descritos no item 4.3.2.

4.3.1. Desenvolvimento de Técnicas de Aclimatização e Inoculação Micorrízica do Porta-Enxerto Marubakaido Micropropagado e Submetido à Poda de Raízes

Como substrato foi utilizado uma mistura de Terra Roxa Estruturada, composto termofílico e areia na proporção de 1:1:1 (v/v/v), desinfestada por 10 minutos em forno de microondas (Anexo 1). O substrato foi distribuído em bandejas alveoladas com células de 120 cm³ ou de 40 cm³ de capacidade. As plantas foram distribuídas nas bandejas alveoladas e mantidas no túnel de aclimatização por 21 dias.

As plantas que foram submetidas à poda de raízes foram aclimatizadas em bandejas com células de 40 cm³, e as demais em bandejas com células de 120 cm³. O experimento foi composto por 6 tratamentos: 2 tratamentos de poda (com ou sem poda de raízes), 2 tratamentos de inoculação (inoculação micorrízica e não micorrízica) e 2 épocas de inoculação (antes e após a fase de enraizamento). Cada tratamento foi constituído por 24 repetições, em um delineamento completamente casualizado (Anexo 2). Os tratamentos foram:

- Sem poda de raízes e com inoculação micorrízica antes da fase de enraizamento;
- Sem poda de raízes e com inoculação micorrízica após a fase de enraizamento;
- Com poda de raízes e com inoculação micorrízica após a fase de enraizamento;
- Sem poda de raízes e com adição da microbiota não micorrízica antes da fase de enraizamento;
- Sem poda de raízes e adição da microbiota não micorrízica após a fase de enraizamento;
- Com poda de raízes e com adição de microbiota não micorrízica após a fase de enraizamento.

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento, com temperatura de 21°C ± 3, fotoperíodo de 16 horas de luz.dia⁻¹ e intensidade de radiação fotossinteticamente ativa de 60 µmol.s⁻¹.m⁻² na altura média das plantas.

Todas as plantas receberam água diariamente e, semanalmente, aplicou-se 1 ml de solução nutritiva de Long Ashton (BRUNDRETT *et al.*, 1994) com 10% de fósforo da concentração original. Os dados foram coletados 81 dias após a saída das condições *in vitro*.

4.3.2. Desenvolvimento de Técnicas de Aclimatização e Inoculação Micorrízica dos Porta-Enxertos Marubakaido e M.9 Micropropagados

Repetiram-se os mesmos procedimentos do item 4.3.1, eliminando-se, contudo, a poda de raízes (Anexo 3). Foram realizados dois experimentos, um para o porta-enxerto Marubakaido e outro para o porta-enxerto M.9. Cada experimento utilizou um arranjo fatorial 2x2, composto de 2 tratamentos de inoculação (inoculação micorrízica e não micorrízica) e 2 épocas de inoculação (antes e após a fase de enraizamento), com 15 repetições por tratamento, em delineamento completamente casualizado. Em ambos os experimentos, os tratamentos foram definidos como:

- Inoculação micorrízica antes da fase de enraizamento;
- Inoculação micorrízica após a fase de enraizamento;
- Adição da biota não micorrízica do solo antes da fase de enraizamento;
- Adição da biota não micorrízica do solo após a fase de enraizamento.

Os experimentos foram conduzido em câmara de crescimento com temperatura de $21^{\circ} \text{C} \pm 3$, fotoperíodo de 16 horas de luz.dia⁻¹, e intensidade de radiação fotossinteticamente ativa de $120 \mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ na altura das plantas.

Todas as plantas receberam água diariamente e, semanalmente, aplicou-se 1 ml de solução nutritiva de Long Ashton (BRUNDRETT *et al.*, 1994) com 10% de fósforo da concentração original.

Em cada um dos experimentos foram realizadas duas coleta de dados, a primeira 51 dias e a segunda 81 dias após a saída das condições *in vitro*, que correspondem a 30 e 60 dias, respectivamente, após o final do período de aclimatização.

4.4. Coleta de Dados

4.4.1. Desenvolvimento Vegetativo de Parte Aérea

Em cada coleta de dados, as plantas foram retiradas da bandeja e tiveram as raízes cuidadosamente lavadas em água corrente e secas em papel. A seguir, elas foram cortadas no nível do colo e avaliou-se peso da matéria fresca de parte aérea e de raízes. A parte aérea foi colocada em estufa a 70^o C, até peso constante, para a determinação do peso de matéria seca. As raízes foram separadas para avaliação da colonização micorrízica e análise do crescimento e desenvolvimento. Medições da altura das plantas foram realizadas ao final da fase de enraizamento e no momento da coleta, a fim de calcular o incremento em altura.

4.4.2. Colonização Micorrízica

Para a determinação da intensidade de colonização micorrízica das raízes, utilizou-se a técnica de PHILLIPS & HAYMAN (1970), modificada por KOSKE & GEMMA (1989). As raízes foram submetidas a descoloração em solução de hidróxido de potássio 2,5% a 90^oC durante 40 minutos. Em seguida, foram lavadas em água corrente, imersas em ácido clorídrico 1% por 30 minutos em temperatura ambiente, e coradas com solução de Tripano em glicerol acidificada (500 ml de glicerol, 450 ml de água destilada, 50 ml de ácido clorídrico 1% e 0,05 gr de azul de tripano) a 90^oC por 30 minutos. As raízes foram conservadas em glicerol acidificado. Para quantificar a intensidade de colonização micorrízica foi utilizada a técnica descrita por TROUVELOT *et al.* (1986): sobre uma lâmina de microscópio foram dispostos 30 segmentos de raízes com aproximadamente 1 cm de comprimento. Para cada segmento foram auferidas notas, correspondente à porcentagem de colonização micorrízica presente na raiz. Este procedimento forneceu uma estimativa da frequência e intensidade de micorrização do sistema radicular.

4.4.3. Número e Comprimento de Raízes

Para avaliar o número e o comprimento do sistema radicular foi utilizada a técnica da grade quadriculada. As raízes foram cortadas e separadas em placas de Petri conforme a ordem à qual pertencem: eixos radiculares, ordem 1, ordem 2, ordem 3 e ordem 4 (Anexo 4). Para obter o número de raízes para cada ordem, os segmentos foram contados individualmente. Para estimar o comprimento em cada ordem, as raízes foram espalhadas aleatoriamente no interior de placas de Petri divididas em quadrados de 1 cm. Em seguida foi registrado o número de pontos de interseção entre as raízes e as linhas verticais e horizontais da placa. O comprimento do sistema radicular da amostra foi calculado de acordo com a técnica de NEWMAN (1966) modificada por TENNANT (1975). A fórmula utilizada foi:

$$\text{Comprimento de Raízes (R)} = \text{Número de interseções (N)} \times \text{Fator de Conversão}$$

O fator de conversão é dependente do tamanho da quadrícula utilizado e no presente trabalho, por ter sido utilizada a quadrícula de 1,0 cm, o fator de conversão foi 0,7857.

4.4.4. Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância, através do programa STATGRAPHICS, versão 7.0, e as médias foram comparadas pelo Teste de Newman-Keuls, $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Desenvolvimento de Técnicas de Aclimatização e Inoculação Micorrízica dos Porta-Enxertos Marubakaido e M.9 Micropropagados

5.1.1. Desenvolvimento de Técnicas de Aclimatização e Inoculação Micorrízica do Porta-Enxerto Marubakaido Micropropagado e Submetido à Poda de Raízes

A poda de raízes teve efeitos marcantes sobre o crescimento das plantas de macieira, levando a reduções significativas dos parâmetros incremento em altura, peso de matéria seca de parte aérea e peso da matéria fresca de raízes (Tabela 2). A presença da associação micorrízica, nos tratamentos sem poda de raízes, tendeu a aumentar o incremento em altura, o peso de matéria seca de parte aérea e peso de matéria fresca de raízes. O efeito benéfico proporcionado pela presença do fungo simbionte foi maior quando a inoculação ocorreu em estágio inicial do enraizamento. A inoculação micorrízica, após a fase de enraizamento, também proporcionou um acréscimo em altura das plantas, quando comparadas com plantas não inoculadas, mas o efeito foi menor do que o verificado em plantas inoculadas em estágio inicial do enraizamento.

A época de introdução dos fungos micorrízicos arbusculares e da biota não micorrízica do solo teve um efeito considerável sobre peso de matéria fresca de raízes. As plantas que receberam os inoculantes, contendo fungos micorrízicos arbusculares ou apenas a biota não micorrízica, antes da fase de enraizamento tenderam a apresentar valores de peso da matéria fresca de raízes maiores do que plantas que recebem os inóculos após a fase de enraizamento. Isso sugere que a produção de biomassa radicular esteve relacionada não somente à presença de fungos micorrízicos arbusculares, mas também à ação de outros microrganismos no substrato ou na rizosfera.

Tabela 2: Incremento em altura (H), peso de matéria seca de parte aérea (MAA), peso da matéria fresca de raízes (MFR) e relação MFR/MFA (peso da matéria fresca de raízes /peso da matéria fresca de parte aérea) de plantas do porta-enxerto Marubakaido micropropagadas, submetidas ou não à poda de raízes e com inoculação de fungos micorrízicos arbusculares antes e depois da fase de enraizamento das plantas. Valores coletados 51 dias após a saída das condições *in vitro*.

Tratamentos			Parâmetros			
Poda	Micorrização	Época de Inoculação	H cm planta ⁻¹	MAA g planta ⁻¹	MFR cm planta ⁻¹	MFR/MFA
Não	Sim	Antes	12,53 a	0,522 a	0,463 a	0,323 b
Não	Sim	Depois	9,70 b	0,392 b	0,399 ab	0,304 b
Sim	Não	Depois	7,21 c	0,252 cd	0,254 bc	0,289 b
Não	Não	Antes	6,81 c	0,333 bc	0,495 a	0,505 a
Não	Não	Depois	4,99 cd	0,266 cd	0,381 ab	0,546 a
Sim	Não	Depois	3,53 d	0,166 d	0,299 bc	0,464 a

Valores seguidos de mesma letra em cada coluna não diferem significativamente entre si (Teste de Newman-Keuls, $p \leq 0,05$) (n= 12).

Ao contrário dos outros parâmetros, a relação MFR/MFA não foi afetada pela poda de raízes (Tabela 2). Houve, no entanto, uma resposta à inoculação micorrízica. Os tratamentos inoculados com fungos micorrízicos arbusculares apresentaram valores significativamente menores de relação MFR/MFA quando comparado aos tratamentos não inoculados.

A colonização micorrízica ocorreu somente nos tratamentos que receberam a inoculação com os fungos micorrízicos arbusculares, evidenciando a não contaminação das testemunhas (Figura 1). Nos tratamentos inoculados com fungos micorrízicos arbusculares, a porcentagem de colonização radicular apresentou diferença significativa entre o tratamento sem poda e inoculado em estágio inicial do enraizamento e os tratamentos que receberam inoculação após a fase de enraizamento. O tratamento que sofreu poda de raízes apresentou o menor índice de colonização micorrízica.

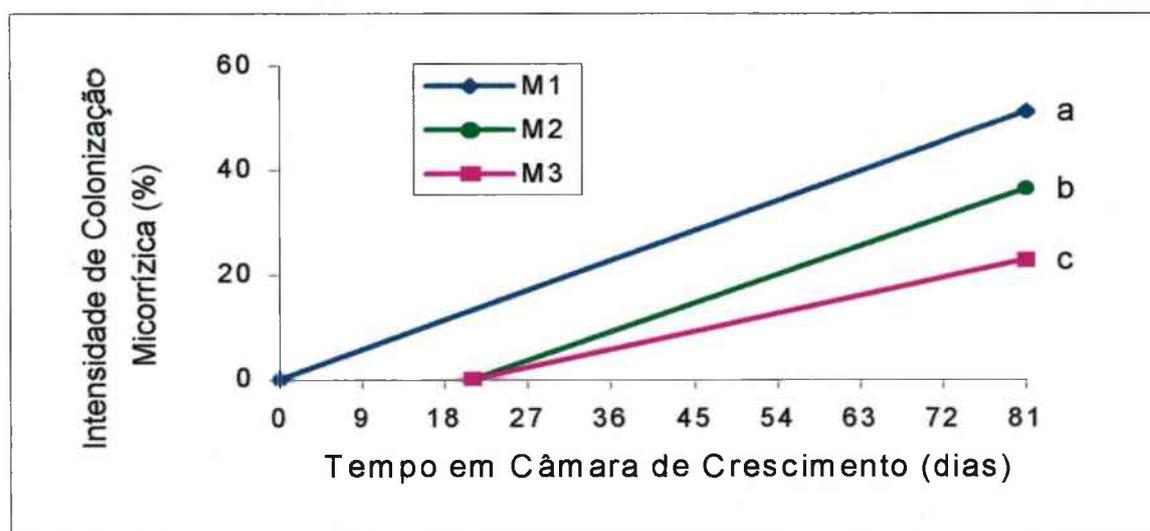


Figura 1: Intensidade de colonização micorrízica (%) de plantas do porta-enxerto de macieira Marubakaido micropropagadas, submetidas ou não à poda de raízes e com inoculação de fungos micorrízicos arbusculares antes e depois da fase de enraizamento das plantas. Tratamentos: M1 = Sem poda de raízes, com inoculação micorrízica antes da fase de enraizamento; M2 = Sem poda de raízes, com inoculação micorrízica após a fase de enraizamento; M3 = Com poda de raízes, com inoculação micorrízica após a fase de enraizamento. Valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente entre si (Teste de Newman-Keuls, $p \leq 0,05$) ($n=15$).

5.1.2. Desenvolvimento de Técnicas de Aclimatização e Inoculação Micorrízica do Porta-Enxerto Marubakaido Micropropagado

Até o momento da primeira avaliação, realizada 51 dias após a saída das plantas das condições *in vitro*, a inoculação com fungos micorrízicos arbusculares não proporcionou diferenças significativas nos parâmetros incremento em altura, peso da matéria seca de parte aérea, peso fresco de raízes e relação MFR/MFA (Tabela 3). Contudo, após 81 dias, o incremento em altura das plantas inoculadas em estágio inicial do enraizamento apresentou uma tendência ($p=0,053$) de ser maior do que o das plantas inoculadas em estágios tardios ou do que o de plantas não inoculadas.

O peso da matéria seca da parte aérea apresentou comportamento similar ao verificado com o incremento em altura após 81 dias, as plantas inoculadas antes da fase de enraizamento foram significativamente maiores do que plantas inoculadas após a fase de enraizamento ou que receberam biota não micorrízica do solo após a fase de enraizamento. No entanto, não houve diferença significativa entre as plantas que receberam adição da biota não micorrízica do solo antes do enraizamento e as que receberam inoculação micorrízica na mesma época, visto que estas tiveram um crescimento que não apresentava diferenças significativas em relação aos que tiveram maiores e menores valores de matéria seca.

O peso fresco de raízes apresentou diferenças significativas entre os tratamentos na segunda avaliação, embora não tenham ocorrido diferenças para a primeira avaliação. Após 81 dias, as plantas inoculadas em estágio inicial do enraizamento apresentaram sistemas radiculares significativamente maiores do que plantas inoculadas após a fase de enraizamento, ou do que plantas que receberam apenas biota não micorrízica do solo.

A relação MFR/MFA aumentou da primeira avaliação (51 dias) para a segunda avaliação (81 dias), sendo que a proporção de aumento dentro do período experimental variou conforme o tratamento. Na primeira avaliação, a relação MFR/MFA apresentou valores similares para todos os tratamentos, enquanto na segunda avaliação observou-se uma tendência de plantas inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares terem relações MFR/MFA maiores do que plantas não inoculadas.

A colonização micorrízica não ocorreu nos tratamentos que receberam apenas a biota não micorrízica do solo, e estabeleceu-se nos tratamentos inoculados (Figura 2). O porta-enxerto Marubakaido apresentou, na primeira avaliação, os seguintes índices de colonização micorrízica: 76% para o tratamento inoculado antes da fase de enraizamento e 20% para o tratamento inoculado após a fase de enraizamento. Na segunda avaliação, essa diferença entre os tratamentos diminuiu, e os índices encontrados foram de 54% para o tratamento inoculado antes da fase de enraizamento e 61% para o tratamento inoculado após a fase de enraizamento.

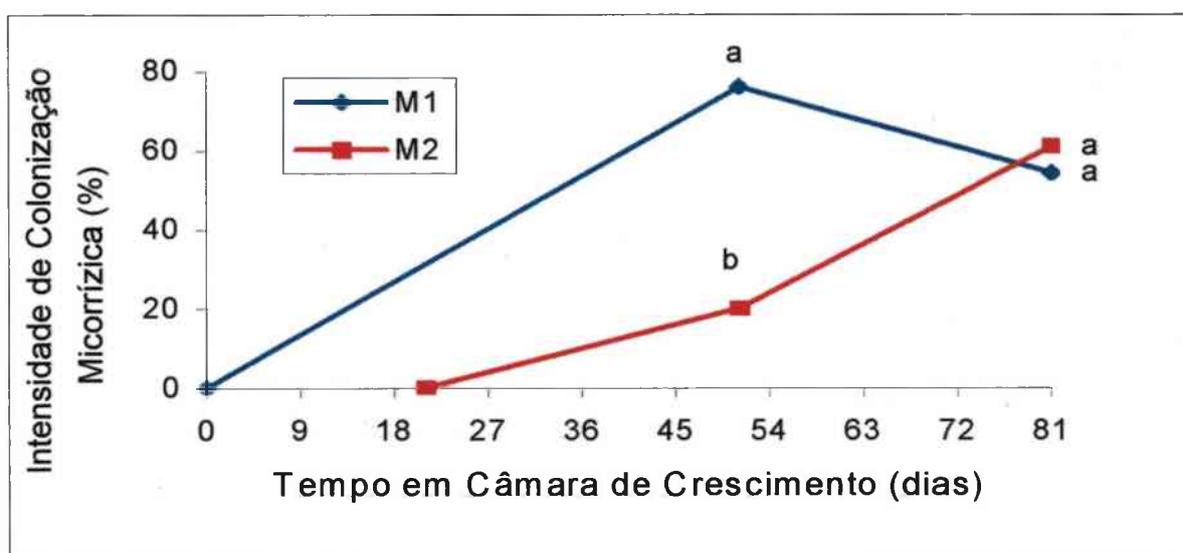


Figura 2: Intensidade de colonização micorrízica (%) de plantas do porta-enxerto de macieira Marubakaido micropropagadas e com inoculação de fungos micorrízicos arbusculares antes e depois da fase de enraizamento das plantas. Tratamentos: M1 = inoculação micorrízica antes da fase de enraizamento; M2 = inoculação micorrízica após a fase de enraizamento. Valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente entre si (Teste de Newman-Keuls, $p \leq 0,05$) ($n=12$).

Tabela 3: Incremento em altura (H), peso de matéria seca de parte aérea (MAA), peso da matéria fresca de raízes (MFR) e relação MFR/MFA (peso da matéria fresca de raízes /peso da matéria fresca de parte aérea) de plantas do porta-enxerto Marubakaido micropropagadas e com inoculação de fungos micorrízicos arbusculares antes e depois da fase de enraizamento das plantas. Valores coletados 51 dias e 81 dias após a saída das condições *in vitro*.

Micorrização	Tratamentos	Parâmetros			
		H cm planta ⁻¹	MAA g planta ⁻¹	MFR cm planta ⁻¹	MFR/MFA
		51 dias			
Sim	Antes	2,47 a	0,132 a	0,279 a	0,700 a
Sim	Depois	2,32 a	0,134 a	0,307 a	0,816 a
Não	Antes	2,96 a	0,137 a	0,296 a	0,757 a
Não	Depois	2,58 a	0,133 a	0,319 a	0,821 a
		81 dias			
Sim	Antes	3,81 a	0,302 a	0,921 a	1,351 a
Sim	Depois	2,47 a	0,172 b	0,559 b	1,385 a
Não	Antes	2,66 a	0,218 ab	0,551 b	1,100 b
Não	Depois	2,51 a	0,191 b	0,517 b	1,183 ab

Valores seguidos de mesma letra em cada coluna não diferem significativamente entre si (Teste de Newman-Keuls, $p \leq 0,05$) (n= 12).

5.1.3. Desenvolvimento de Técnicas de Aclimatização e Inoculação Micorrízica do Porta-Enxerto M.9 Micropropagado

O porta-enxerto de macieira M.9 micropropagado, quando submetido à inoculação micorrízica, apresentou comportamento diferente do verificado com o porta-enxerto Marubakaido. Na Tabela 4 são apresentados os dados de crescimento obtidos para o porta-enxerto M-9 ao longo de todo o período experimental. Na primeira avaliação, a presença da associação micorrízica no estágio inicial do enraizamento reduziu o incremento em altura, o peso de matéria seca de parte aérea, o peso fresco de raízes e a relação MFR/MFA.

As diferenças verificadas na primeira avaliação para os parâmetros incremento em altura e peso da matéria seca de parte aérea mantiveram-se até o final do período experimental. No entanto, nenhuma diferença entre os tratamentos foi verificada para peso fresco de raízes e relação MFR/MFA ao final de 81 dias. A relação MFR/MFA aumentou ao longo do período experimental, visto que as plantas inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares em estágio inicial do enraizamento aumentaram sua biomassa de raízes em três vezes, enquanto nos outros tratamentos o aumento foi de aproximadamente duas vezes.

Na primeira avaliação, os índices de colonização micorrízica do porta-enxerto M.9 foram de 43% para o tratamento inoculado antes da fase de enraizamento e de 23% para o tratamento inoculado após a fase de enraizamento (Figura 3). Na segunda avaliação, essa diferença entre os tratamentos diminuiu, e os índices encontrados foram de 56% para o tratamento inoculado antes da fase de enraizamento e 51% para o tratamento inoculado após a fase de enraizamento.

Tabela 4: Incremento em altura (H), produção de matéria seca de parte aérea (MAA), produção de matéria fresca de raízes (MFR), relação MFR/MFA (produção de matéria fresca de raízes / produção de matéria fresca de parte aérea) de plantas do porta-enxerto M.9 micropropagadas e com inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. Valores apresentados para os 51 dias e 81 dias após saída das plantas da cultura *in vitro*.

Micorrização	Tratamentos	Parâmetros			
		Época de Inoculação			
		H cm planta ⁻¹	MAA g planta ⁻¹	MFR cm planta ⁻¹	MFR/MFA
		51 dias			
Sim	Antes	3,79 b	0,153 b	0,187 b	0,365 b
Sim	Depois	5,57 b	0,266 ab	0,383 a	0,521 a
Não	Antes	5,85 b	0,272 ab	0,386 a	0,483 a
Não	Depois	8,82 a	0,366 a	0,559 a	0,512 a
		81 dias			
Sim	Antes	4,44 b	0,238 b	0,712 a	1,100 a
Sim	Depois	5,89 b	0,310 ab	0,870 a	1,088 a
Não	Antes	5,53 b	0,308 ab	0,820 a	1,052 a
Não	Depois	8,19 a	0,395 a	1,060 a	1,117 a

Valores seguidos de mesma letra em cada coluna não diferem significativamente entre si (Teste de Newman-Keuls, $p \leq 0,05$) (n= 12).

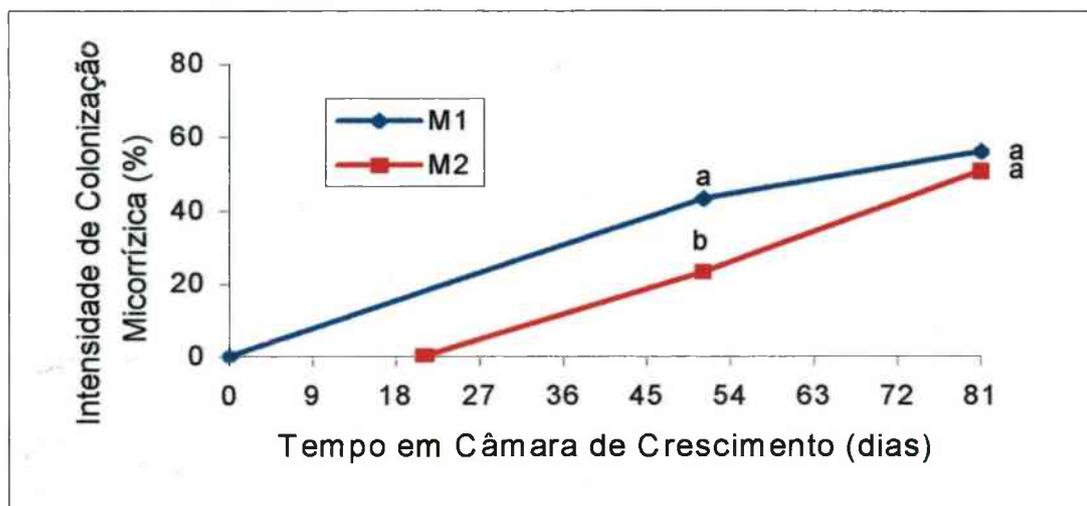


Figura 3: Intensidade de colonização micorrízica (%) de plantas do porta-enxerto de macieira M.9 micropropagadas e com inoculação de fungos micorrízicos arbusculares antes e depois da fase de enraizamento das plantas. Tratamentos: M1 = inoculação micorrízica antes da fase de enraizamento; M2 = inoculação micorrízica após a fase de enraizamento. Valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente entre si (Teste de Newman-Keuls, $p \leq 0,05$) ($n=12$).

5. 2. Crescimento e Desenvolvimento do Sistema Radicular dos Porta-Enxertos Marubakaido e M.9 Micropropagados

5.2.1. Crescimento e Desenvolvimento do Sistema Radicular do Porta-Enxerto Marubakaido Micropropagado Submetido ou não à Poda de Raízes

O sistema radicular das plantas do porta-enxerto Marubakaido foi afetado pelos procedimentos utilizados, especialmente pela poda de raízes. Este procedimento reduziu significativamente o crescimento e desenvolvimento do sistema radicular do porta-enxerto Marubakaido, como pode ser verificado pelos dados de número total e o comprimento total de raízes (Tabela 5). Os dois tratamentos que tiveram poda de raízes, com inoculação

micorrízica ou adição de biota não micorrízica do solo, apresentaram uma redução de cerca de 40% no número total e no comprimento total de raízes, quando comparados aos tratamentos que não sofreram poda de raízes e receberam os inóculos, micorrízicos ou não micorrízicos, após a fase de enraizamento. A redução observada no número total foi composta pela diminuição no número de raízes laterais de ordem 1 e ordem 2, enquanto no comprimento total de raízes a redução foi verificada nos eixos radiculares e nas raízes de ordem 1.

No que se refere ao número e comprimento de raízes nas diferentes ordens, a comparação de plantas micorrizadas e não micorrizadas mostra que, dentro de cada combinação dos outros fatores, as plantas com a associação micorrízica tenderam a apresentar médias superiores no número de eixos radiculares e raízes de ordem 1. Mesmo que as diferenças não tenham sido significativas pela análise estatística, esta repetição do comportamento nos eixos radiculares e nas raízes de ordem 1 sugere um efeito da simbiose. A época de introdução dos fungos micorrízicos arbusculares no sistema não proporcionou diferenças significativas no número e no comprimento total de raízes.

O tratamento sem poda de raízes e com adição da biota não micorrízica do solo antes da fase de enraizamento teve plantas com número e comprimento totais de raízes equivalentes ao dos tratamentos que receberam inóculo micorrízico. Esse tratamento apresentou maior número de raízes de ordem 2 e ordem 3 em relação aos demais tratamentos, tendo ainda maior comprimento de raízes de ordem 2 e 3, sendo que essa diferença em relação aos demais tratamentos foi estatisticamente significativa. Esses dados indicam que a biota não micorrízica do solo teve um efeito sobre o crescimento e desenvolvimento do sistema radicular do porta-enxerto Marubakaido.

5.2.2. Crescimento e Desenvolvimento do Sistema Radicular do Porta-Enxerto Marubakaido Micropropagado

Os efeitos da colonização micorrízica sobre o número e comprimento de raízes manifestaram-se de forma distinta nos dois períodos de avaliação. A inoculação com fungos micorrízicos arbusculares não teve efeito significativo sobre o número total e o comprimento total de raízes do porta-enxerto Marubakaido ao final de 51 dias (Tabela 6).

Tabela 5: Número e comprimento de eixos radiculares e raízes de ordem 1, ordem 2, ordem 3 e total de plantas do porta-enxerto Marubakaido micropropagadas, submetidas ou não a poda de raízes e com inoculação de fungos micorrízicos arbusculares antes ou depois da fase de enraizamento.

Tratamentos			Parâmetros				
Poda	Micorrização	Época de Inoculação	Eixos Radiculares			Total	
			Ordem 1	Ordem 2	Ordem 3		
			Número				
Não	Sim	Antes	22 ab	423 a	285 ab	10 b	740 a
Não	Sim	Depois	27 a	400 a	314 ab	16 b	758 a
Sim	Não	Depois	24 ab	243 bc	173 c	11 b	452 bc
Não	Não	Antes	17 ab	381 a	371 a	34 a	802 a
Não	Não	Depois	18 ab	321ab	212 bc	10 b	561 ab
Sim	Não	Depois	15 b	164 c	129 c	19 b	327 c
			Comprimento cm planta ⁻¹				
Não	Sim	Antes	90 ab	366 a	169 b	5 b	630 ab
Não	Sim	Depois	107 a	340 a	167 b	7 b	621 ab
Sim	Não	Depois	64 bc	211 b	102 b	6 b	383 cd
Não	Não	Antes	86 ab	442 a	262 a	20 a	810 a
Não	Não	Depois	74 abc	322 a	133 b	6 b	535 bc
Sim	Não	Depois	47 c	154 b	92 b	11 b	304 d

Valores seguidos de mesma letra em cada coluna não diferem significativamente entre si (Teste de Newman-Keuls, $p \leq 0,05$) (n= 12).

Tabela 6: Número e comprimento de eixos radiculares e raízes de ordem 1, ordem 2, ordem 3 e total de plantas do porta-enxerto Marubakaído micropropagadas e com inoculação de fungos micorrízicos arbusculares antes e depois da fase de enraizamento. Valores coletados 51 dias após a saída das condições *in vitro*.

Tratamentos		Parâmetros				Total	
		Eixos Radiculares	Ordem 1	Ordem 2	Ordem 3		Ordem 4
Micorrização	Época de Inoculação	Número					
Sim	Antes	19 a	311 a	111 a	0,18 a	-	440 a
Sim	Depois	17 a	263 a	176 a	0,18 a	-	456 a
Não	Antes	15 a	280 a	194 a	0,80 a	-	489 a
Não	Depois	16 a	305 a	161 a	-	-	482 a
		Comprimento em planta ⁻¹					
Sim	Antes	87 a	281 a	49,9 a	0,07 a	-	417 a
Sim	Depois	82 a	334 a	111,4 a	0,04 a	-	527 a
Não	Antes	85 a	353 a	120,0 a	0,24 a	-	558 a
Não	Depois	99 a	347 a	98,2 a	-	-	544 a

Valores seguidos de mesma letra em cada coluna não diferem significativamente entre si (Teste de Newman-Keuls, $p \leq 0,05$) (n= 12).

Nesse mesmo período de avaliação, também não foi constatada uma tendência clara de efeitos sobre o número e o comprimento de eixos e raízes de ordem 1, 2 e 3. Ainda na primeira avaliação, foi verificado que as plantas micorrizadas em estágio inicial da fase de enraizamento tenderam a ter uma redução de raízes de ordem 2 ($p=0,074$).

Ao final de 81 dias, o número total de raízes do tratamento inoculado em estágio inicial do enraizamento foi significativamente maior do que observado nos demais tratamentos, chegando a cerca de 50% de aumento (Tabela 7). Analisando-se as ordens de raízes individualmente, verificou-se que esta diferença no número total de raízes concentrou-se no número de raízes de ordem 1 e 2, enquanto os números de eixos e de raízes de ordem 3 e 4 não apresentaram variações significativas entre os tratamentos. O comprimento total de raízes tendeu a refletir a diferença encontrada para o número de raízes. Entretanto, neste parâmetro a diferença é derivada do comprimento de eixos e raízes de ordem 1, havendo uma tendência ($p=0,054$) de raízes de ordem 2 terem maior comprimento.

5.2.3. Crescimento e Desenvolvimento do Sistema Radicular do Porta-Enxerto M.9 Micropropagados

A arquitetura do sistema radicular do porta-enxerto M.9 foi afetado pela inoculação micorrízica de uma forma distinta do ocorrido com o porta-enxerto Marubakaido. Plantas inoculadas antes da fase de enraizamento tiveram reduzidos o número e o comprimento de raízes. Na primeira avaliação (Tabela 8), as plantas inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares em estágios iniciais de enraizamento apresentaram uma redução no número total de raízes; este foi significativamente menor do que o das plantas que receberam apenas a biota não micorrízica do solo após a fase de enraizamento. Ficaram em uma posição intermediária as plantas que receberam adição da biota não micorrízica do solo antes da fase de enraizamento e as plantas micorrizadas após a fase de enraizamento. As raízes estavam distribuídas de forma diferente entre as diversas ordens, em função dos diferentes tratamentos. Nas plantas do tratamento que recebeu a adição da biota não micorrízica do solo, o maior número de raízes concentrava-se nos eixos e raízes de ordem 1.

Tabela 7: Número e comprimento de eixos radiculares e raízes de ordem 1, ordem 2, ordem 3 e total de plantas do porta-enxerto Marubakaido micropropagadas e com inoculação de fungos micorrízicos arbusculares antes e depois da fase de enraizamento. Valores coletados 81 dias após a saída das condições *in vitro*.

Micorrização	Tratamentos	Época de Inoculação	Parâmetros				Total	
			Eixos Radiculares	Ordem 1	Ordem 2	Ordem 3		Ordem 4
Sim	Antes		21 a	505 a	612 a	49 a	0,82 a	1189 a
Sim	Depois		15 a	311 b	417 ab	39 a	-	781 b
Não	Antes		13 a	341 b	430 ab	42 a	0,58 a	827 b
Não	Depois		15 a	310 b	347 b	34 a	0,40 a	706 b
			Comprimento cm planta ⁻¹					
Sim	Antes		126 a	645 a	461,9 a	33,25 a	0,46 a	1266 a
Sim	Depois		90 b	464 ab	321,3 a	24,98 a	-	900 ab
Não	Antes		82 b	473 ab	376,5 a	33,42 a	0,33 a	965 ab
Não	Depois		87 b	386 b	286,1 a	25,22 a	0,39 a	784 b

Valores seguidos de mesma letra em cada coluna não diferem significativamente entre si (Teste de Newman-Keuls, $p \leq 0,05$) ($n=12$).

Não houve diferenças no número de raízes de ordem 2, e apenas os tratamentos que receberam o inóculo micorrízico ou a biota não micorrízica do solo após a fase de enraizamento apresentaram raízes de ordem 3. Nesse mesmo período de avaliação não se constatou a presença de raízes de ordem 4, e os efeitos da inoculação ocorreram em raízes de ordem baixa (eixos radiculares e raízes de ordem 1).

O comprimento total de raízes tendeu a refletir as diferenças observadas no número de raízes. O maior comprimento total foi para o tratamento que recebeu a biota não micorrízica do solo após a fase de enraizamento, e que foi significativamente maior do que o tratamento com micorrização antes da fase de enraizamento. Os tratamentos com inoculação micorrízica após a fase de enraizamento e com adição da biota não micorrízica do solo antes do enraizamento apresentaram valores intermediários, embora sem diferirem significativamente do tratamento que recebeu a biota não micorrízica após a fase de enraizamento. Entre os tratamentos não houve efeitos significativos da inoculação micorrízica sobre o comprimento de raízes de ordem 2. As raízes de ordem 3 foram observadas somente nos tratamentos com inoculação, micorrízica ou não, após a fase de enraizamento, sem que houvesse uma diferença significativa entre eles.

Aos 81 dias, o efeito da inoculação tendeu a manifestar-se nas raízes de ordem 2 e 3 (Tabela 9). As diferenças encontradas, na primeira avaliação, nos números total de eixos e de raízes de ordem 1 e 2 desapareceram aos 81 dias. No entanto, observaram-se menores números de raízes de ordem 2 e 3 nos tratamentos em que os inoculantes foram adicionados antes do enraizamento das plantas.

Na segunda avaliação, o comprimento total de raízes apresentou-se menor para o tratamento inoculado com fungos micorrízicos arbusculares antes do enraizamento, e os maiores valores foram observados nas plantas que receberam apenas biota não micorrízica do solo após o enraizamento. Os tratamentos que receberam inóculo micorrízico após o enraizamento e biota não micorrízica do solo antes do enraizamento apresentaram valores intermediários para o comprimento total de raízes, e esse comportamento ocorreu também nas raízes de ordem 1 e ordem 2.

Tabela 8: Número e Comprimento de eixos radiculares e raízes de ordem 1, ordem 2, ordem 3 e total de plantas do porta-enxerto M.9 micropropagadas e com inoculação de fungos micorrízicos arbusculares antes e depois da fase de enraizamento. Valores coletados 51 dias após a saída das condições *in vitro*.

Tratamentos	Parâmetros	Eixos Radiculares				Total
		Ordem 1	Ordem 2	Ordem 3	Ordem 4	
Micorrização	Época de Inoculação	Número				
Sim	Antes	14 b	156 b	52 a	-	223 b
Sim	Depois	29 a	278 ab	66 a	0,22 a	374 ab
Não	Antes	25 ab	270 ab	72 a	-	364 ab
Não	Depois	34 a	359 a	99 a	0,55 a	493 a
Comprimento cm planta ⁻¹						
Sim	Antes	62 b	150 b	23,7 a	-	236 b
Sim	Depois	162 a	341 a	34,0 a	0,13 a	537 a
Não	Antes	138 a	340 a	38,4 a	-	516 a
Não	Depois	203 a	495 a	60,2 a	0,21 a	758 a

Valores seguidos de mesma letra em cada coluna não diferem significativamente entre si (Teste de Newman-Keuls, $p \leq 0,05$) (n= 12).

Tabela 9: Número e Comprimento de eixos radiculares e raízes de ordem 1, ordem 2, ordem 3 e total de plantas do porta-enxerto M.9 micropropagadas e com inoculação de fungos micorrízicos arbusculares antes e depois da fase de enraizamento. Valores coletados 81 dias após a saída das condições *in vitro*.

Micorrização	Tratamentos	Época de Inoculação	Parâmetros				Total	
			Eixos Radiculares	Ordem 1	Ordem 2	Ordem 3		Ordem 4
			Número					
Sim	Antes		20 a	376 a	255 b	5 b	-	656 a
Sim	Depois		39 a	464 a	351 ab	13 ab	-	868 a
Não	Antes		33 a	394 a	287 ab	4 b	-	718 a
Não	Depois		26 a	469 a	440 a	19 a	-	954 a
			Comprimento em planta ⁻¹					
Sim	Antes		144 a	476 b	182,6 b	2,8 b	-	805 b
Sim	Depois		219 a	613 ab	254,3 b	8,8 ab	-	1095 ab
Não	Antes		196 a	575 ab	239,2 b	2,2 b	-	1012 ab
Não	Depois		206 a	776 a	388,4 a	13,7 a	-	1384 a

Valores seguidos de mesma letra em cada coluna não diferem significativamente entre si (Teste de Newman-Keuls, $p \leq 0,05$) ($n=12$).

6. DISCUSSÃO

Os resultados referentes aos estudos de aclimatização e inoculação micorrízica comprovam que a resposta das plantas ao estabelecimento da colonização micorrízica não depende somente de variáveis como solo ou espécie de fungos micorrízicos arbusculares, mas também está relacionada à espécie vegetal e à condição fisiológica desta. Além disso, outros dois fatores mostraram-se importantes: o grau e a forma de manipulação das plantas, neste caso a poda, e a época de introdução dos fungos micorrízicos arbusculares no sistema de produção de mudas.

O aumento da taxa de sobrevivência e do crescimento e desenvolvimento de plantas micropropagadas tem sido alcançado pelo estabelecimento de técnicas que levam em conta a aclimatização e a inoculação micorrízica simultaneamente. Resultados positivos têm sido conseguidos para diversas espécies vegetais, como plantas de kiwi (SCHUBERT *et al.*, 1992), morangueiro (VESTBERG, 1992), abacateiro (AZCON-AGUILAR *et al.*, 1992; VIDAL *et al.*, 1992; JAIZMEVEGA & AZCON, 1995), macieira (BRANZANTI *et al.*, 1992; UOSUKAINEM & VESTBERG, 1994), abacaxizeiro (JAIZMEVEGA & AZCON, 1995), mamoeiro (JAIZMEVEGA & AZCON, 1995), plantas de mandioca (AZCON-AGUILAR *et al.*, 1997) e bananeira (PINOCHET *et al.*, 1997), dentre outras. Esses trabalhos demonstram que a introdução de fungos micorrízicos arbusculares na fase de aclimatização aumenta a porcentagem de sobrevivência e a tolerância ao estresse do transplante. Entretanto, respostas positivas no crescimento e desenvolvimento das plantas dependem da espécie vegetal, do fungo micorrízico e do substrato utilizado.

Os efeitos da poda, presença de fungos micorrízicos arbusculares e época de inoculação micorrízica sobre o crescimento e desenvolvimento das partes aéreas e radiculares das plantas observadas neste trabalho podem, também, estar relacionados com a combinação da fase de enraizamento com a fase de aclimatização. Técnicas de inoculação de fungos micorrízicos arbusculares em plantas micropropagadas com enraizamento *ex vitro* não foram encontrados na literatura. As condições específicas dos experimentos descritos neste trabalho - em que enraizamento, aclimatização e inoculação micorrízica foram realizados simultaneamente - podem ter sido suficientes para causar diferenças no crescimento e desenvolvimento dos porta-enxertos de macieira.

Independentemente das respostas obtidas, o protocolo desenvolvido mostrou-se promissor para a aplicação na produção de plantas, pois a combinação da fase de enraizamento com a aclimatização possibilita uma redução no tempo de produção de mudas dos porta-enxertos de macieira e, conseqüentemente, uma redução de 50% nos custos de produção.

O grau de manipulação, a lavagem ou remoção de parte aérea ou radicular das plantas durante a transferência para condições *ex vitro* e no período de aclimatização são fatores que afetam o crescimento e desenvolvimento de mudas micropropagadas. A poda do sistema radicular do porta-enxerto Marubakaido apresentou um efeito negativo sobre todos os parâmetros analisados. Esse fator desencadeou uma redução significativa no incremento em altura, na produção de biomassa de raízes e no acúmulo de matéria seca de parte aérea. Os dados evidenciaram, ainda, uma redução significativa nos números e comprimentos de raízes, no total ou nas diferentes ordens. Apenas a relação MFR/MFA não foi reduzida significativamente pela poda de raízes. Em trabalhos sobre técnicas de micropropagação, a poda de raízes tem sido mencionada como uma causa do estabelecimento deficiente das mudas micropropagadas (GROUT & ASTON, 1977; DEBERGH & MAENE, 1981; DONNELLY *et al.*, 1985; McCLELLAND & SMITH, 1989; OLIEN *et al.*, 1993; FRÁGUAS *et al.*, 1997; THOMAS & RAVINDRA, 1997). O efeito da poda sobre o crescimento do porta-enxerto Marubakaido vem ao encontro das observações de FRÁGUAS *et al.* (1997), que constataram que a poda das raízes provocava redução no crescimento vegetativo e diferentes respostas no padrão de arquitetura radicular desse mesmo porta-enxerto.

Desta forma, os dados indicam que a poda de raízes para o porta-enxerto Marubakaido é uma prática nociva e não deve ser recomendada. Por outro lado, a introdução de fungos micorrízicos arbusculares no sistema de produção de mudas revelou-se um fator vantajoso. O porta-enxerto Marubakaido teve maior incremento em altura, produção de biomassa radicular e o acúmulo de matéria seca de parte aérea quando a inoculação com os fungos micorrízicos arbusculares ocorreu antes da fase de enraizamento.

Foram realizados dois experimentos com o porta-enxerto Marubakaido, com lotes diferentes de plantas. As condições ambientais para os dois experimentos foram as mesmas, exceto a quantidade de radiação fotossinteticamente ativa que aumentou de $60 \mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ no primeiro experimento para $120 \mu\text{mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ no segundo. Os efeitos da

presença dos fungos micorrízicos arbusculares no crescimento e desenvolvimento de parte aérea e do sistema radicular do porta-enxerto Marubakaido manifestou-se de forma similar em ambos experimentos. Dessa forma, os efeitos da inoculação micorrízica e da época de inoculação sobre o crescimento e desenvolvimento do porta-enxerto Marubakaido serão discutidos apenas em função dos dados do segundo experimento, e a partir dos dados do terceiro experimento para o M.9.

Os dois últimos experimentos não foram realizados simultaneamente, e os dois porta-enxertos têm características genéticas, morfológicas e fisiológicas bem distintas. Por esses motivos não foram efetuadas análises estatísticas conjuntas dos dois porta-enxertos. Contudo, foi possível verificar que a inoculação com fungos micorrízicos arbusculares produziu efeitos diversos sobre o crescimento e desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular dos porta-enxertos micropropagados. O porta-enxerto Marubakaido, quando inoculado antes do enraizamento, apresentou um aumento significativo no número e comprimento de raízes, mas o porta-enxerto M.9, submetido à mesma situação de inoculação, apresentou redução nos parâmetros relacionados ao crescimento e desenvolvimento do sistema radicular. O crescimento e desenvolvimento de parte aérea dos porta-enxertos mostraram-se similares ao que se observou com os parâmetros de crescimento e desenvolvimento do sistema radicular.

O porta-enxerto Marubakaido apresentou respostas positivas quando inoculado com a mistura de fungos micorrízicos arbusculares. A presença da associação micorrízica aumentou o incremento em altura, peso fresco de raízes e o peso da matéria seca de parte aérea. Esse porta-enxerto (Marubakaido) apresentou, também, aumentos significativos no número e no comprimento total de raízes quando a inoculação micorrízica ocorreu antes da fase de enraizamento. Esses resultados estão de acordo com a maioria dos trabalhos referentes a arquitetura do sistema radicular. Contudo, tais trabalhos - como os de PRICE *et al.* (1989), BERTA *et al.* (1990), HETRICK *et al.* (1991), SCHELLENBAUM *et al.* (1991), TROTTA *et al.* (1991), HOOKER *et al.* (1992), TISSERANT *et al.* (1992), BERTA *et al.* (1995), NORMAN *et al.* (1996) e FORTUNA *et al.* (1998) - foram conduzidos com plantas previamente enraizadas, e não com a presença dos fungos micorrízicos arbusculares durante a fase de enraizamento, como foi feito neste trabalho. Esse sistema radicular com maior número e comprimento de raízes, isto é, um sistema mais

ramificado, é potencialmente mais eficiente na absorção de nutrientes do solo (FITTER, 1987).

A época de introdução dos fungos micorrízicos arbusculares dentro do sistema de produção de mudas do porta-enxerto Marubakaido revelou-se como fator importante, visto que as alterações verificadas foram condicionadas ao momento de inoculação. A presença dos fungos micorrízicos arbusculares no início da fase de enraizamento promoveu alterações na arquitetura do sistema radicular do porta-enxerto Marubakaido, pois houve um aumento no número de ramificações e no comprimentos destas, porém tais modificações pareceram ser transitórias. Ao final de 81 dias, as plantas apresentaram-se sem diferenças significativas entre os tratamentos, sugerindo que o efeito promovido pela presença da associação micorrízica foi apenas passageiro, e foram resultado de interação com outras variáveis, como balanço hormonal da planta.

O crescimento e desenvolvimento de parte aérea e do sistema radicular do porta-enxerto M.9 quando inoculado com a mistura de fungos micorrízicos arbusculares apresentaram respostas negativas. A inoculação micorrízica reduziu o incremento em altura, a produção de biomassa radicular, o acúmulo de matéria seca de parte aérea e o número e comprimento de raízes. Resultados similares aos verificados neste trabalho em relação ao crescimento e desenvolvimento de parte aérea foram obtidos por MATSUBARA *et al.* (1996), que, trabalhando com *Malus* spp, constataram que o efeito da inoculação micorrízica difere conforme a combinação entre espécies de fungos e variedade vegetal.

Neste trabalho, a presença dos fungos micorrízicos arbusculares no início da fase de enraizamento promoveu alterações na arquitetura do sistema radicular do porta-enxerto M.9, mas essas modificações tenderam a desaparecer ao longo do período experimental. Essas observações indicam que as alterações ocorridas, além de temporárias, foram resultado de interações com outras variáveis, como hormônios.

As diferenças entre os porta-enxertos ocorreram porque o sistema radicular das plantas é geneticamente determinado e pode ser afetado por fatores ambientais como nutrição mineral, disponibilidade de água, temperatura e microrganismos do solo. Um dos efeitos mais comuns da presença da associação micorrízica é o aumento no número de ramificações das raízes. Esse aumento no número de raízes é importantes em relação a ancoragem e absorção de nutrientes e água (BERTA & FUSCONI, 1998). A presença da

associação micorrízica pode aumentar ou diminuir a atividade meristemática dos ápices radiculares e, conseqüentemente, variar o tamanho deles. Entretanto, as alterações na arquitetura radicular podem também ser causadas por efeitos nutricionais ou hormonais, que agem sozinhos ou em conjunto com a associação.

Trabalhos realizados por RAVOLANIRINA *et al.* (1989) e BRANZANTI *et al.* (1992) demonstraram que a melhor época para a inoculação dos fungos micorrízicos arbusculares é no início da fase de aclimatização, quando as plantas têm apenas primórdios radiculares. Os benefícios da inoculação no início da fase de aclimatização têm sido demonstrado para diversas espécies de plantas micropropagadas. No entanto, algumas plantas se desenvolvem melhor quando a inoculação micorrízica ocorre após a fase de aclimatização. Para a macieira existem trabalhos que recomendam a inoculação antes da fase de aclimatização (BRANZANTI *et al.*, 1992) ou após essa fase (UOSUKAINEN & VESTEBERG, 1994). A confrontação desses trabalhos com os resultados do presente trabalho reafirmam que para cada espécie de planta existe uma combinação específica de fungo micorrízico, substrato e época de inoculação.

Com o porta-enxerto M.9, também houve efeito significativo da época de introdução dos fungos micorrízicos arbusculares no sistema de produção de mudas. Esse porta-enxerto teve reduções significativas no número e no comprimento total de raízes quando a inoculação micorrízica ocorreu antes da fase de enraizamento. A redução observada no número e comprimento de raízes no porta-enxerto M.9 inoculado com fungos micorrízicos arbusculares antes da fase de enraizamento pode ser devida ao consumo de fotossintatos pelo simbionte fúngico, em detrimento das raízes. Esses resultados estão, em parte, de acordo com os trabalhos de MASCHKE *et al.* (1996) e YANO *et al.* (1996), que verificaram que plantas colonizadas com fungos micorrízicos arbusculares apresentavam uma redução no comprimento individual de raízes e um aumento no número de eixos radiculares. Estes pesquisadores também trabalharam com mudas previamente enraizadas, e não com a presença dos fungos micorrízicos arbusculares na fase de enraizamento, como descrito neste trabalho. Os dados obtidos neste trabalho mostram que, nas condições utilizadas e no período avaliado, os fungos micorrízicos arbusculares utilizados constituíram-se também em um dreno de energia para a planta, com reflexos negativos no crescimento delas. Isso aponta para a necessidade de seleção de outros fungos micorrízicos

arbusculares para a aclimatização do porta-enxerto M.9 e a seleção de outras épocas para a sua introdução.

A biota não micorrízica do solo teve efeito sobre o crescimento e o desenvolvimento dos porta-enxertos. As plantas que receberam adição da biota do solo antes da fase de enraizamento apresentaram comportamento similar aos das plantas que receberam a inoculação micorrízica após a fase de enraizamento. Essas observações indicam que os outros microrganismos do solo também têm efeito sobre o desenvolvimento dos porta-enxertos, e podem promover o seu crescimento e desenvolvimento. A presença dos outros microrganismos nos tratamentos não inoculados com fungos micorrízicos arbusculares promoveu modificações na distribuição das raízes e no comprimentos dessas. Dessa forma, houve indícios de que não é somente a presença dos fungos micorrízicos arbusculares que pode alterar a arquitetura do sistema radicular, mas sim toda a população de microrganismos presentes ao redor das raízes.

A utilização de uma mistura de fungos micorrízicos arbusculares como inoculante não garantiu sua eficiência em todas as situações propostas no presente trabalho. A especificidade fungo-planta não existe nas associações micorrízicas arbusculares, embora ocorram diferenças entre isolados de fungos quanto à capacidade de promover o crescimento e o desenvolvimento de uma mesma espécie. Essa variação pode ser interpretada como um tipo de especificidade funcional do hospedeiro (FORTUNA *et al.*, 1992). Na mistura de fungos micorrízicos arbusculares utilizada como inoculante neste trabalho é possível que um ou mais isolados de fungos micorrízicos arbusculares, menos eficientes em promover o crescimento e o desenvolvimento das plantas, tenham sido mais competitivos para colonizar as raízes nas condições em que o porta-enxerto M.9 se desenvolveu.

Os efeitos da presença dos fungos micorrízicos arbusculares foram maiores quando a inoculação ocorreu logo após a aplicação de ácido indolibutírico, ou seja, quando as plantas ainda deveriam ter em seus tecidos níveis altos de auxina exógena ou de seus metabólitos. A comparação entre os dois porta-enxertos indica que a simples presença da associação micorrízica não foi suficiente para promover alterações na arquitetura radicular, que somente ocorreram quando a inoculação micorrízica aconteceu antes da fase de enraizamento. Essa observação indica que a aplicação exógena de ácido indolibutírico possa ter efeito sobre os parâmetros relacionados ao sistema radicular. A variedade de

efeitos freqüentemente ocasionados pela auxina depende de numerosos fatores, incluindo o estágio de desenvolvimento do tecido ou órgão, a concentração de auxina, o tipo de auxina (natural ou sintética) e da presença e concentração de outros hormônios (SALISBURY & ROSS, 1993; FOSKET, 1994; MOHR & SCHOPFER, 1995). Uma peculiaridade da auxina é que este hormônio pode causar diferentes efeitos em diferentes espécies vegetais, ou diferentes efeitos na mesma espécie de planta em tempos diferentes (DAVIES, 1994). A concentração desse hormônio nos tecidos pode também desencadear diferentes respostas, a concentração determina se o efeito será estimulador ou inibitório. As modificações na arquitetura radicular observadas nestes experimentos poderiam ser explicados pela combinação de efeitos da aplicação de auxina exógena e da presença do fungo simbiote no momento que se iniciou o processo de enraizamento da planta, que produziram alterações no número e comprimento de raízes dos porta-enxertos. A interação entre aplicação exógena de ácido indolibutírico e a presença de fungos micorrízicos arbusculares foi verificada por DUTRA *et al.* (1996) para dois porta-enxertos de citros. Eles demonstraram que as plantas inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares e que receberam aplicação exógena de auxina apresentavam um maior número de estruturas fúngicas. As observações feitas no presente trabalho abrem perspectivas para o aprofundamento de estudo relacionados à quantidade e à concentração de hormônios aplicados aos porta-enxertos e seu efeito sobre o crescimento e desenvolvimento da planta quando associadas a fungos micorrízicos arbusculares.

O estabelecimento da associação micorrízica induz mudanças na composição mineral e na fisiologia dos tecidos da planta, e como consequência, na exsudação radicular (AZCÓN-AGUILAR & BAREA, 1992). Esse fato, junto com o desenvolvimento do micélio fúngico ao redor da raiz, produz modificações químicas e físicas do ambiente ao redor da micorriza. Os efeitos verificados no crescimento e desenvolvimento do sistema radicular dos porta-enxertos conduzem à recomendação de que novas pesquisas sejam realizadas, a fim de averiguar as implicações futuras dessas modificações ocorridas pela presença do associação micorrízica e dos outros microrganismos do solo. A possibilidade de manipular os fungos micorrízicos arbusculares em combinação com outros microrganismos do solo depende de um melhor entendimento dos sistemas produtivos e da adequada seleção de inoculantes a ser utilizado. A seleção dos inoculantes pode ser fundamentada em critérios como compatibilidade com a planta e eficiência em promover o

crescimento dessa, mas a aplicação dessas ferramentas biotecnológicas avançará quando os mecanismos e a base molecular das interações entre microrganismos da rizosfera, fungos micorrízicos arbusculares e raízes forem conhecidos e entendidos. Através de estudos específicos será possível obter informações sobre as condições em que os fungos micorrízicos arbusculares poderão ter sinergismo com outros microrganismos do solo (ANDRADE *et al.*, 1998). Desta forma, a inoculação de fungos micorrízicos arbusculares junto com outros microrganismos poderá assegurar o estabelecimento das micorrizas e aumentar os benefícios oriundos dessa associação

A presença da associação micorrízica na fase inicial do enraizamento do porta-enxerto Marubakaido mostrou-se importante e com potencial de utilização, pelo papel que ela pode desempenhar na produção de mudas de boa sanidade e vigor, com condições de melhor estabelecimento no viveiro ou a campo. Contudo, para o porta-enxerto M.9 é importante estabelecer novos protocolos de inoculação, iniciando-se pela seleção de outros fungos micorrízicos arbusculares, visto que a mistura utilizada no presente trabalho foi contraproducente em termos de promover o crescimento e desenvolvimento deste porta-enxerto. Outra possibilidade para utilização de fungos micorrízicos arbusculares em plantas do porta-enxerto M.9 é a inoculação micorrízica mais tarde, ou seja, em fase de viveiro.

Os resultados obtidos no presente trabalho abrem a perspectiva de serem aprofundados alguns aspectos básicos e aplicados, relacionados com sistema de produção de mudas micropropagadas. Por exemplo, deve verificar-se o efeito da aplicação de diversas concentrações de auxina e a presença de fungos micorrízicos arbusculares, e desenvolver estudos que verifiquem o efeito da biota não micorrízica do solo sobre o crescimento e desenvolvimento dos porta-enxertos. O melhor entendimento desses efeitos poderá contribuir para o fornecimento ao produtor não apenas de plantas, mas sim de uma comunidade em cuja rizosfera haverá microrganismos que atuem na nutrição e na proteção contra estresses bióticos e abióticos.

O presente trabalho inseriu-se no projeto “Seleção de Clones de Porta-Enxertos de Macieira e de Fungos Micorrízicos Tolerantes a Condições Edáficas Prevalentes em Solos Ácidos da Região Sul - Santa Catarina”, que tem por objetivos o desenvolvimento de técnicas para produção de mudas de macieira para as condições de solos ácidos, através da propagação em massa de clones selecionados, seleção de espécies de fungos micorrízicos

arbusculares eficientes e tolerantes às condições de estresses edáficos e produção de inóculo em escala experimental por técnicas de cultivo em vasos, chegando-se à produção de mudas de porta-enxerto de macieira micropropagadas e micorrizadas. A seleção de isolados de fungos micorrízicos arbusculares está sendo realizada por outro pesquisador, e neste momento é possível reunir os esforços dos componentes do grupo de pesquisa e desenvolver novos protocolos de aclimatização e inoculação micorrízica, com vistas à obtenção de mudas saudáveis dos porta-enxertos de macieira. É necessário agora que equipes ligadas ao setor produtivo desenvolvam as tecnologias combinando os resultados dos esforços dos componentes do projeto: a produção de plantas micropropagadas, protocolos de aclimatização e micorrização e os fungos selecionados para as condições do sul do Brasil.

Ferramentas biotecnológicas forneceram a base para os estudos que caracterizaram as necessidades nutricionais, os processos de crescimento e desenvolvimento das mudas micropropagadas e inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares, com o estabelecimento do melhor momento para a inoculação. Neste momento, é preciso verificar as interações existentes entre os fungos micorrízicos arbusculares e hormônios, bem como desenvolver estudos relacionados aos efeitos promovidos pelos outros microrganismos do solo. Avanços nessas áreas poderão fornecer informações para aumentar o potencial de utilização das técnicas biotecnológicas.

O protocolo de enraizamento, aclimatização e inoculação de fungos micorrízicos arbusculares abordado neste trabalho, apesar dos resultados pouco promissores obtidos para o porta-enxerto M.9, não está limitado simplesmente a plantas de macieira, mas também pode ser aplicado a outras espécies de interesse econômico e ecológico. Esse protocolo pode ser ajustado às diferentes espécies vegetais de interesse das empresas ou viveristas. Os ajustes no protocolo permitirão que as empresas produzam mudas de plantas em curtos períodos de tempo, com alta qualidade e homogeneidade.

7. CONCLUSÕES

- ◆ A poda de raízes teve efeito negativo sobre o crescimento e o desenvolvimento de parte aérea e promoveu alterações na arquitetura do sistema radicular do porta-enxerto Marubakaido micropropagado.
- ◆ A inoculação da mistura de fungos micorrízicos arbusculares aumentou o desenvolvimento de parte aérea e radicular do porta-enxerto Marubakaido, e esse efeito foi mais acentuado quando a inoculação foi realizada antes da fase de enraizamento.
- ◆ A inoculação da mistura de fungos micorrízicos arbusculares reduziu o desenvolvimento de parte aérea e radicular do porta-enxerto M.9, e esse efeito foi mais acentuado quando a inoculação foi realizada antes da fase de enraizamento.
- ◆ A inoculação micorrízica promoveu um aumento na ramificação das raízes do porta-enxerto Marubakaido, formando um sistema radicular potencialmente mais eficiente na absorção de nutrientes do solo.
- ◆ Os procedimentos de enraizamento, aclimatização e inoculação da mistura de fungos micorrízicos arbusculares abordados neste trabalho mostraram-se promissores para o porta-enxerto Marubakaido.

ANEXOS

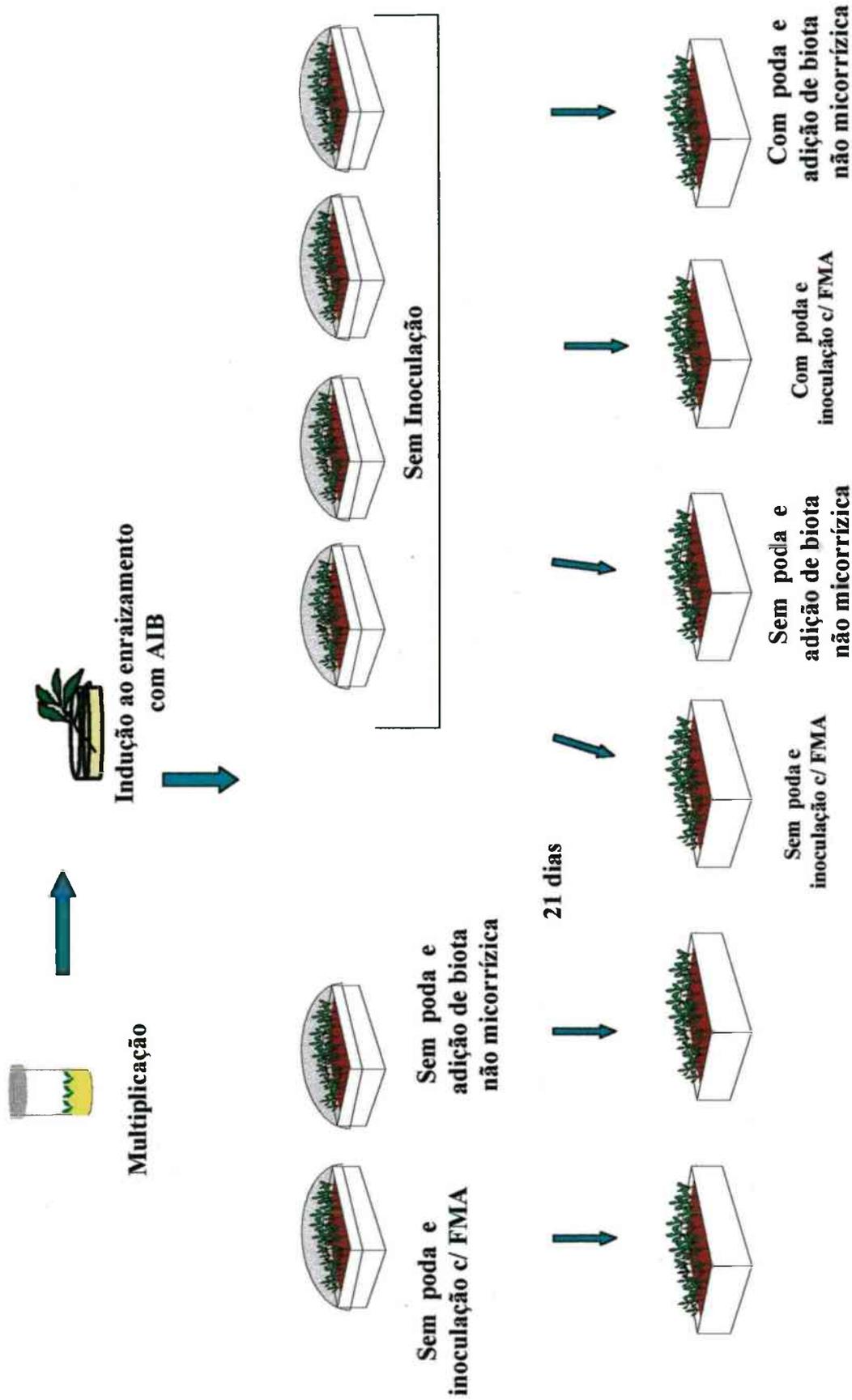
Anexo 1: Análise química¹ e componentes do substrato utilizado nos experimentos de inoculação micorrízica e aclimatização dos porta-enxertos Marubakaido e M.9 micropropagados.

pH	SMP	Alumínio cmol _c .dm ³	Ca + Mg cmol _c .dm ³	Fósforo mg/dm ³	Potássio mg/dm ³	Matéria Orgânica (%)
5,52	6,5	0,06	4,53	50	200	1,95

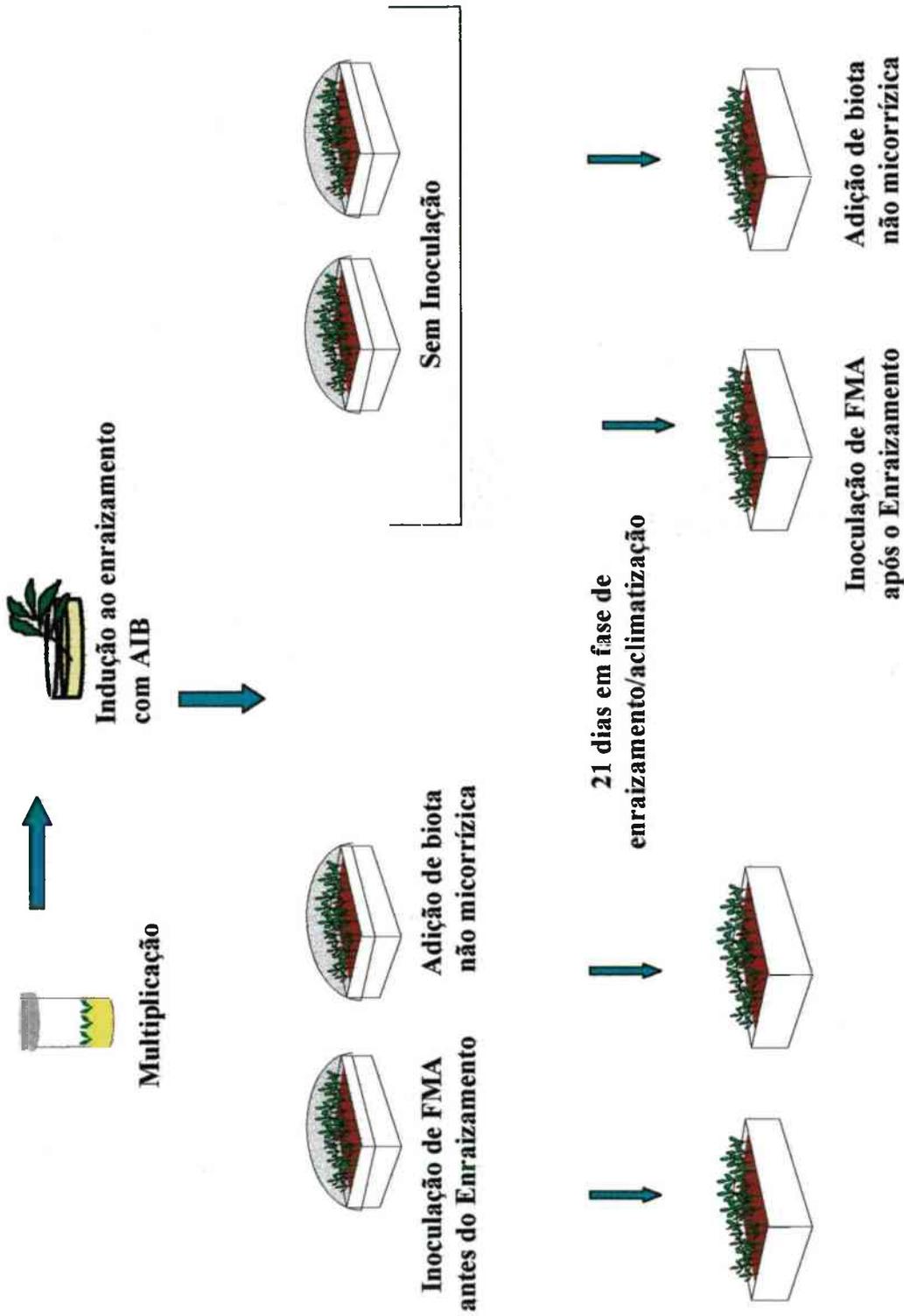
¹Análise realizada pelo Laboratório de Solos - Departamento de Engenharia Rural - Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal de Santa Catarina.

O substrato utilizou os seguintes componentes:

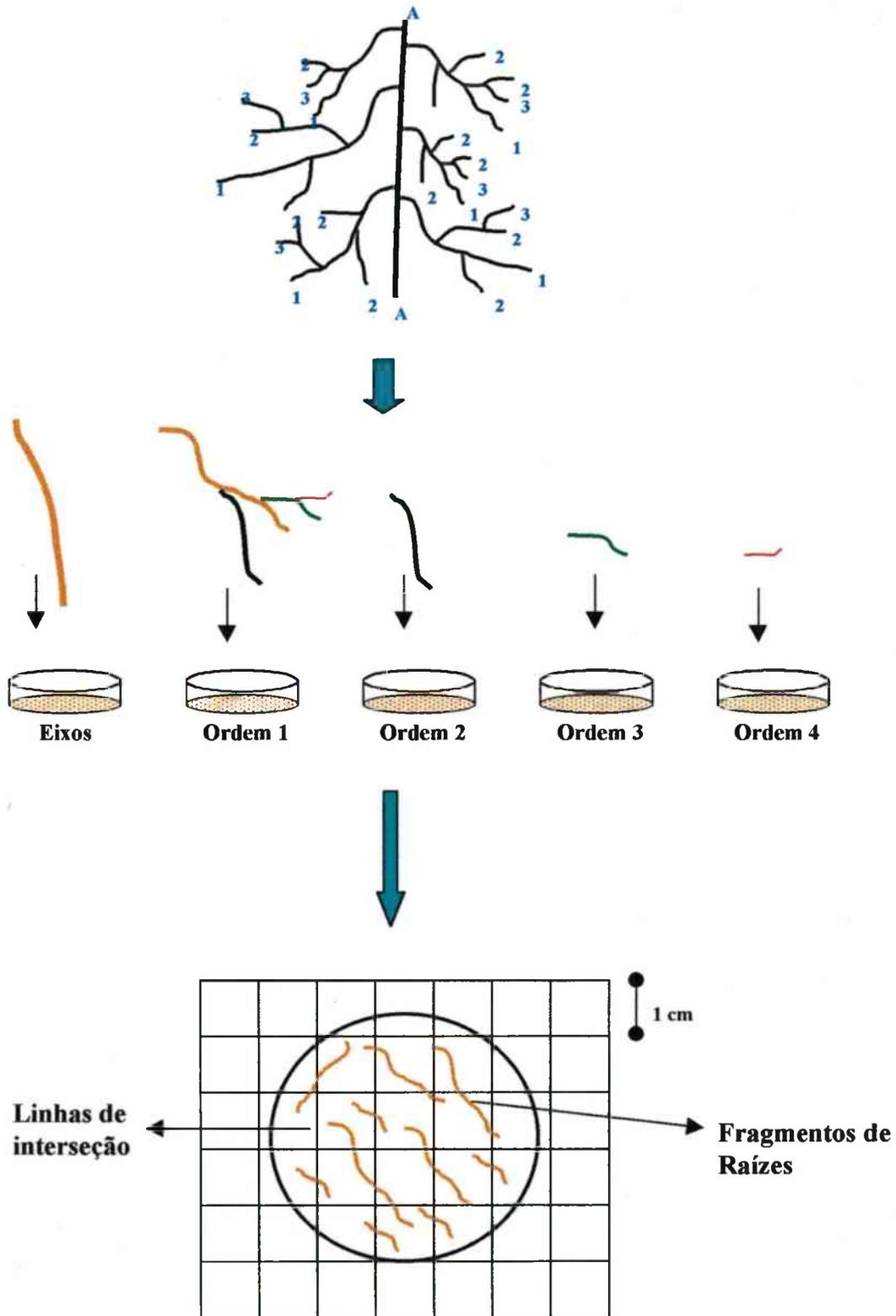
- Solo coletado em Florianópolis e classificado como Terra Roxa Estruturada, subsolo.
- Areia de construção (média) lavada e peneirada (entre 0,297 mm - 2,000 mm)
- Composto termofílico de resíduos orgânicos de coleta seletiva na Universidade Federal de Santa Catarina.



Anexo 2 - Procedimentos de aclimatização e inoculação de fungos micorrízicos arbusculares no porta-enxerto de macieira Marubakaido micropropagado submetido ou não à poda de raízes.



Anexo 3 - Procedimentos de aclimatização e inoculação de fungos micorrízicos arbusculares nos porta-enxertos de macieira M.9 e Marubakaido micropropagados.



Anexo 4 - Esquema da metodologia utilizada para avaliação do comprimento radicular

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, G., MIHARA, K. L., LINDERMAN, R. G. & BETHLENFALVAY, G. J. Soil aggregation status and rhizobacteria in the mycorrhizosphere. **Plant and Soil**, New York, v.202, p.89-96. 1998.
- AZCÓN-AGUILAR, C., BARCELÓ, A., VIDAL, M. T. & DE LA VIÑA, G. Further studies on the influence of mycorrhizae on growth and development of micropropagated avocado plants. **Agronomie**, Paris, v.12, n.10, p.837-840. 1992.
- AZCÓN-AGUILAR, C., ENCINA, C. L., AZCÓN, R. & BAREA, J. M. Effect of arbuscular mycorrhiza on the growth and development of micropropagated annona-cherimola plants. **Agricultural Science in Finland**, Helsinki, v.3, n.3, p.281-287. 1994.
- AZCÓN-AGUILAR, C. & BAREA, J. M. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.68, n.4, p.24. 1997.
- AZCÓN-AGUILAR, C., CANTOS, M., TRONCOSO, A., & BAREA, J. M. Beneficial effect of arbuscular mycorrhizas on acclimatization of micropropagated cassava plantlets. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.72, n.1, p.63-71. 1997.
- BAREA, J. M., AZCÓN, R. & AZCÓN-AGUILAR, C. Mycorrhiza and crops. In: I. Tommerup (Ed.), **Advances in Plant Pathology**. V.9. Mycorrhiza: a synthesis. Academic Press, London, pp.167-189. 1993.
- BERNTSON, G. M. Modelling root architecture: are there tradeoffs between efficiency and potential of resource acquisition?. **New Phytologist**, Cambridge, v.127, p.483-493. 1994.
- BERNTSON, G. M. Topological scaling and plant root system architecture: development and functional hierarchies. **New Phytologist**, Cambridge, v.135, p.621-634. 1997.
- BERTA, G., FUSCONI, A., TROTA, A. & SCANNERINI, S. Morphogenetic modifications induced by the mycorrhizal fungus *Glomus* strain E₃ in the root system of *Allium porrum* L. **New Phytologist**, Cambridge, v.114, p.207-215. 1990.

- BERTA, G., FUSCONI, A. & TROTTA, T. VA mycorrhizal infection and the morphology and function of root systems. **Environmental and Experimental Botany**, New York, v.33, n.1, p.159-173. 1993.
- BERTA, G., TROTTA, A., FUSCONI, A., HOOKER, J. E., MUNRO, M., ATKINSON, D., GIOVANETTI, M., MORINI, S., FORTUNA, P., TISSERANT, B., GIANINAZZI-PEARSON, V. & GIANINAZZI, S. Arbuscular mycorrhizal induced changes to plant growth and root system morphology in *Prunus cerasifera* L. **Tree Physiology**, Victoria, v.15, p.281-293. 1995.
- BERTA, G. & FUSCONI, A. Effects of arbuscular mycorrhizal infection on root system structure and longevity. In: **COST-ACTION 821 Biotechnology - Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil-plant systems**. Ed. S. Gianinazzi & H. Schuepp, p.197. 1998.
- BLAL B. & GIANINAZZI-PEARSON V. Interest of mycorrhiza for the production of micropropagated oil palm clones. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.29, p.39-43. 1989.
- BLAL, B., MOREL, C., GIANINAZZI-PEARSON, V., FARDEAU, J. C. & GIANINAZZI, S. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae on phosphate fertilizer efficiency in two tropical acid soils planted with micropropagated oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.9, n.1, p.43-48. 1990.
- BRANZANTI, B., GIANINAZZI-PEARSON, V., GIANINAZZI, S., PREDIERI, S., BARALDI, R. Influence of artificial substrata on mycorrhization of micropropagated fruit-trees in a horticultural system. In: **Mycorrhizas in Ecosystems** (Alexander I. J., Fitter A. H., Lewis D. H., Read D. J., eds) CAB International, Oxon (UK). p.333-339. 1991.
- BRANZANTI, B., GIANINAZZI-PEARSON, V. & GIANINAZZI, S. Influence of phosphate fertilization on the growth and nutrient status of micropropagated apple infected with endomycorrhizal fungi during the weaning stage. **Agronomie**, Paris, v.12, p.841-845. 1992.
- BRUNDRETT, M., PICHE, Y. & PETERSON, R. L. A developmental study of early stages in vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.63, p.184-194. 1985.

- BRUNDRETT, M., MELVILLE, L. & PETERSON, L. **Practical Methods in Mycorrhiza Research**. Guelph, Ontario, Canada, 80p, 1994.
- BRUNDRETT, M., BOUGHER, N., GROVE, T. & MALAJCZUK, N. **Working with mycorrhizas in forestry and agriculture**. ACIAR – Australian Centre for international agricultural research. Canberra, Australia. 374p. 1996.
- DAVIES, P. J. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: **Plant Hormones and their role in plant growth and development**. Peter J. Davies ed. Kluwer Academic Publishers. AA Dordrecht, The Netherlands. p.1-11. 1990.
- DEBERGH, P. C. & MAENE, L. J. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.14, p.335-345. 1981.
- DENARDI, F. Porta-Enxertos. In: **Manual da Cultura da Macieira**. Ed. Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária S.A. Florianópolis, SC, Brasil, p.92-132, 1985.
- DONNELLY, D. J., VIDAVER, W. E. & LEE, K. Y. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.4, n.1, p.43-50. 1985.
- DUTRA, P. V., ABAD, M., ALMELA, V. & AGUSTÍ, M. Auxin interaction the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck Smith improves vegetative growth of two citrus rootstocks. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.66, p.77-83. 1996.
- ENNOS, A. R & FITTER, A. H. Comparative functional-morphology of the anchorage systems of annual dicots **Functional Ecology**, Oxford, v.6, n.1, p.71-78. 1992.
- ESTAÚN, V., CALVET, C. & CAMPRUBI, A. Arbuscular mycorrhizae and growth enhancement of micropropagated *Prunus* rootstock in different soilless mixes. **Agricultural Science in Finland**, Helsinki, v.3, p.263-267. 1994.
- FITTER, A. H. Functional significance of root morphology and root system architecture. In: **Ecological interaction in soil**. Fitter AH (ed) Blackwell, Oxford, p.87-106. 1985.
- FITTER, A. H. An architectural approach to the comparative ecology of plant root systems. **New Phytologist**, Cambridge, v.106, (Suppl), p.61-77. 1987.
- FITTER, A. H., STICKLAND, R. S., HARVEY, M. L. & WILSON, G. W. Architectural Analysis of Plant Root Systems. 1. Architectural correlates of exploitation efficiency. **New Phytologist**, Cambridge, v.118, p.375-382. 1991.

- FOSKET, D. E. *Plant Growth and Development*. San Diego: Academic Press, 1994. 580p.
- FORTUNA, P., CITERNESI, S., MORINI, S., GIOVANNETTI, M. & LORETI, F. Infectivity and effectiveness of different species of arbuscular mycorrhizal fungi in micropropagated plants of mrs-2/5 plum rootstock. *Agronomie*, Paris, v.12, n.10, p.825-829. 1992
- FORTUNA, P., CITERNESI, A. S., MORINI, S. Æ. O., VITAGLIANO, C. & GIOVANNETTI, M. Influence of arbuscular mycorrhizae and phosphate on shoot apical growth of micropropagated apple and plum rootstocks. *New Phytologist*, Cambridge, v.16, p.757-763. 1996
- FORTUNA, P., MORINI, S. & GIOVANNETTI, M. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on in vivo root initiation and development of micropropagated plum shoots. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, v.73, n.1, p.19-28. 1998.
- FRÁGUAS, C. B., HOFFMANN, A., PASQUAL, M. & CHALFUN, N.N.J. Efeitos da pré-aclimatização e da poda de raízes na sobrevivência e crescimento de mudas micropropagadas de macieira 'Marubakaido'. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 2, 1997, Gramado. **Programas e Resumos**. Gramado: FAO, 1997. 257p. p. 24.
- GEORGE, E. F. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Part 1. The Technology. 2.Ed., Edington: Exegetics, 1993, 574p.
- GIANINAZZI, S., TROUVELOT, A. & GIANINAZZI-PEARSON, V. Conceptual approaches for the rational use of VA endomycorrhizae in agriculture - possibilities and limitations. *Agriculture Ecosystems & Environment*, Amsterdam, v.29, n.1-4, p.153-161. 1990.
- GRANGER, R. L., PLENCHETTE, C. & FORTIN, J.A. Effects of a vesicular arbuscular (VA) endomycorrhizal fungus (*Glomus epigaeum*) on the growth and leaf mineral content of two apple clones propagated *in vitro*. *Canadian Journal of Plant Science*, Ottawa, n.63, p.551-555. 1983.
- GROUT, B. W. W. & ASTON, M. J. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. *Horticulture Research*, Edinburgh, v.17, p.1-7. 1977.
- GUILLEMIN, J. P., GIANINAZZI, S., GIANINAZZI-PEARSON, V. & MARCHAL, J. Contribution of endomycorrhizas to biological protection of micropropagated

- pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) against *Phytophthora cinnamomi* Rands. **Agricultural Science in Finland**, Helsinki, v.3, p.241-251, 1994.
- HARLEY, J. L. & SMITH, S. E. **Mycorrhizal Symbiosis**. London-New York, Academic Press, 483p. 1983.
- HARTMANN, H. T., KESTER, D. E. & DAVIES, F. T. Plant propagation – principles and practices. Englewood Cliffs, New Jersey. Prentice Hall. 5^a ed. 647p. 1990.
- HETRICK, B. A., LESLIE, J. F & THOMPSON, WILSON, G.. Physiological and topological assessmental effects of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus on root architecture of big bluestem. **New Phytologist**, Cambridge, v.110, p.85-96. 1988.
- HETRICK, B. A. D. Mycorrhizas and Root Architecture. **Experientia**, Basel, v.47, p.355-362. 1991.
- HETRICK, B. A. D., WILSON, G. W. T. & LESLIE, J. F. Root architecture of warm-season and cool-season grasses - relationship to mycorrhizal dependence. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.69, n.1, p.112-118. 1991.
- HETRICK, B. A. D., WILSON, G. W. T. & TODD, T. C. Relationships of mycorrhizal symbiosis, rooting strategy, and phenology among tallgrass prairie forbs. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.70, p.1521-1528. 1992.
- HOOKER, J. E. & ATKINSON, D. Application of computer-aided image analysis to studies of arbuscular endomycorrhizal fungi effects on plant root system morphology and dynamics. **Agronomie**, Paris, v.12, p.821-824. 1992.
- HOOKER, J. E., GIANINAZZI, S., VESTBERG, M., BAREA, J. M. & ATKINSON, D. The application of arbuscular mycorrhizal fungi to micropropagation systems - an opportunity to reduce chemical inputs. **Agricultural Science in Finland**, Helsinki, v.3, n.3, p.227-232. 1994.
- HOOKER, J.E., FORBES, P. & NORMAN, J.R. Impact of Arbuscular Mycorrhizal fungi on root system development. In: **COST-ACTION 821 Biotechnology - Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil-plant systems**. Ed. S. Gianinazzi & H. Schuepp, p.197. 1996.
- INFORME CONJUNTURAL. Instituto Cepa/SC – Instituto de Planejamento e Economia Agrícola de Santa Catarina. **Secretaria de Estado do Desenvolvimento Rural e da Agricultura**. Encarte Semanal, Ano XVII, n.726: Florianópolis. Abril 1999.

- JAIZMEVEGA, M. C., & AZCÓN, R. Responses of some tropical and subtropical cultures to endomycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, Berlim, v.5, n.3, p.213-217.1995.
- KOSKE, R. E. & GEMMA, J. N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**, Cambridge, v.92, n.4, p.486-505. 1989.
- LOVATO, P. E., SCHUEPP, H., TROUVELOT, A. & GIANINAZZI, S. Application of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in orchards and ornamental plants. *In: Mycorrhizas: structure, function, molecular biology and technology*. Ed. Varma,, A. & Hock, B.) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p. 443-467. 1995.
- LOVATO, P. E., TROUVELOT, A., GIANINAZZI-PEARSON, V. & GIANINAZZI, S. Micorrização de plantas micropropagadas. *In: Avanços em Fundamentos e Aplicação de Micorrizas*. José Osvaldo Siqueira, ed. Lavras: Universidade Federal de Lavras. p. 175-201. 1996
- LYNCH, J. Root Architecture and Plant Productivity. **Plant Physiology**, Washington, v.109, p.7-13. 1995.
- MARSCHNER, H.. **Mineral nutrition of higher plants**. 2ª edição. Academic Press. Harcourt Brace & Company, Publishers. London. 889p. 1995.
- MASCHKE, M., BERTA, G., GIANINAZZI, S. & MONCOUSIN, C. Effect of endomycorrhizal infection on root system development in the apple rootstock (*Malus domestica* Borkh.) M26. *In: Mycorrhizas in integrated systems from genes to plant development*. Eds. C. Azcón-Aguilar & J.M. Barea, p.349-352. 1996.
- MATSUBARA, Y., KARIKOMI, T., IKUTA, M., HORI, H. ISHIKAWA, S., HARADA, T. Effects of arbuscular mycorrhizal fungus inoculation on growth of apple (*Malus* ssp) seedlings. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Tokyo, v.65, n.2, p.297-302. 1996.
- McCLELLAND, M. T. & SMITH, M. A. L. The challenge of commercial production cost accounting in nursery management - a practical exercise **Hortscience**, Alexandria, v.24, n.5, p.733-736. 1989.
- MOHR, H. & SCHOPFER, P. **Plant Physiology**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1995, 627p.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Reviews of Plant Physiology**, Palo Alto, v.25, p.135-166. 1974.

- NEWMANN, E. A method of estimating the total length of root in a sample. **Journal of Applied Ecology**, v.3, p.139-145. 1966.
- NIELSEN, K. L., LYNCH, J. P. & WEISS, H. N. Fractal geometry of bean root systems: correlations between spatial and fractal dimension. **American Journal of Botany**, Columbus, v.84, n.1, p.26-33. 1997.
- NORMAN, J. R., ATKINSON, D. & HOOKER, J. E. Arbuscular mycorrhizal fungal-induced alteration and induced resistance to the root pathogen *Phytophthora fragariae*. **Plant and Soil**, New York, v.185, p.191-198. 1996.
- OLIEN, W. C., HEGWOOD, C. P. & SPIERS, J. M. Planting methods affect early growth and root distribution of muscadine vines. **Hortscience**, Alexandria, v.28, n.11, p.1089-1091. 1993.
- PEDROTTI, E. L. & VOLTOLINI, J. A. Enraizamento ex vitro e aclimatização dos porta-enxertos de macieira Marubakaido e M.9. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 2, 1997, Gramado. **Programas e Resumos**. Gramado: FAO, 1997. 257p. p. 76.
- PELLERIN, S. & PAGES, L. Evaluation of parameters describing the root system architecture of field grown maize plants (*Zea mays* L.) II. Density, length and branching of first-order lateral roots. **Plant and Soil**, New York, v.164, p.169-176. 1994.
- PHILLIPS, J. M. & HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transaction of the British Mycological Society**, London, v.55, n.1, p.158-161. 1970
- PINOCHET, J., FERNANDEZ, C., JAIZME, M. D. & TENOURY, P. Micropropagated banana infected with *Meloidogyne javanica* responds to *Glomus intraradices* and phosphorus **Hortscience**, Alexandria, v.2, n.1, p.101-103.1997
- PRICE, N. S., RONCADORI, R. W. & HUSSY, R. S. Cotton root growth as influenced by phosphorus nutrition and vesicular-arbuscular mycorrhizas. **New Phytologist**, Cambridge, v.111, p.61-66. 1989.
- RAPPARINI, F., BARALDI, R., BERTAZZA, G., BRANZANTI, B., PREDIERI, S. Vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation of micropropagated fruit-trees. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.69, n.6, p.1101-1109.1994

- RAVOLANIRINA, F., BLAL, B., GIANINAZZI, S. & GIANINAZZI-PEARSON, V. Mise au point d'une méthode d'endomycorhization de vitroplants. **Fruits**, Paris, v.44, p.165-170. 1989.
- REICH, L. Rates of infection and effects of five vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on apple. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.68, p.233-239. 1988.
- SALAMANCA, C. P., HERRERA, M. A. & BAREA, J. M. Mycorrhizal inoculation of micropropagated woody legumes used in revegetation programmes for desertified Mediterranean ecosystems. **Agronomie**, Paris, v.12, p.869-872. 1992.
- SALISBURY, F. B. & ROSS, C. W. **Plant Physiology** 4^a ed. Belmont: Wadsworth Publishing Company, Belmont, California. 682p. 1993.
- SATTELMACHER, B., GERENDAS, J., THOMS, K., BRÜCK, H. & BAGDADY, H. Interaction between root growth and mineral nutrition. **Environmental and Experimental Botany**, New York, v.33, p.63-73. 1993.
- SCHELLENBAUM, L., BERTA, G., RAVOLANIRINA, F., TISSERANT, B., GIANINAZZI, S. & FITTER, A.H. Influence of endomycorrhizal infection on root morphology in a micropropagated woody plant species (*Vitis vinifera*, L.) **Annals of Botany**, London, v.68, p.135-141. 1991.
- SCHREINER, R. P. & BETHLENFALVAY, G. J. Mycorrhizal interactions in sustainable agriculture. **Critical Reviews in Biotechnology**, Cleveland, v.15, n.3-4, p.271-285. 1995.
- SCHUBERT, A., MAZZITELLI, M., ARIUSSO, O. & EYNARD, I. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on micropropagated grapevines - influence of endophyte strain, p-fertilization and growth-medium. **Vitis**, Siebeldingen, v. 29, n.1, p.5-13. 1990.
- SCHUBERT, A., BODRINO, C. & GRIBAUDO, I. Vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) micropropagated plants. **Agronomie**, Paris, v.12, p.847-850. 1992.
- SCHUCH, M. W. & PETERS, J. A. Multiplicação *in vitro* de brotações de macieira cultivares Marubakaido (*Malus prunifolia*, Willd, Borkh) e Megumi (*Malus domestica*, Brokl). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.28, n.4, p.433-437. 1993.

- SCHWAB, S. M., MENGE, J.A. & TINKER, P. B. Regulation of nutrient transfer between host and fungus in vesicular arbuscular mycorrhizas **New Phytologist**, Cambridge, v.117, n.3, p.387-398. 1991.
- SMITH, S. E. & READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. 2^a Edition. Academic Press, Inc. Harcourt Brace & Company, Publishers. San Diego, California. 605p. 1997.
- SMITH, S. E. & GIANINAZZI-PEARSON, V. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.39, p.221-244. 1988.
- STOKES, A., BALL, J., FITTER, A.H., BRAIN, P., COUTTS, M.P. An experimental investigation of the resistance of model root systems to uprooting. **Annals of Botany**, London, v.78, n.4, p.415-421. 1996.
- TAUBE-BAAB, H. & BALTRUSCHAT, H. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of young apple trees in apple replant disease soil. **Journal of Plant Disease and Protection**, v.100, n.5, p.474-481. 1993.
- TAYLOR, H. M. & ARKIN, G. F. Root zone modification: fundamentals and alternatives. *In: Modifying the root environment to reduce crop stress*. Eds. ARKIN, G.F. & TAYLOR, H. M. St. Joseph: America Society of Agricultural Engineers, p. 3-16. 1981.
- TENNANT, D. A test of a modified line intersection method of measuring root length. **Journal of Ecology**, Oxford, v.63, p.995-1001. 1975.
- TISSERANT, B., SCHELLENBAUM, L., GIANINAZZI-PEARSON, V., GIANINAZZI, S. & BERTA, G. Influence of infection by endomycorrhizal fungus on root development and architecture in *Platanus acerifolia*. **Allionia**, Torino, v.30, p.171-181. 1992.
- THOMAS, P. & RAVINDRA, M. B. Effects of pruning or removal of in vitro formed roots on ex vitro regeneration and growth in micropropagated grapes. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.51, n.3, p.177-180. 1997.
- TROTTA, A., CARMINATI, C., SCHELLENBAUM, L., SCANNERINI, S., FUSCONI, A. & BERTA, G. Correlation Between Root Morphogenesis , VA Mycorrhizal Infection and Phosphorus Nutrition. **Plant Roots and Their Environment**, p.333-339. 1991.

- TROUVELOT, A., KOUGH, J. L. & GIANINAZZI-PEARSON, V. Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: **Mycorrhizes: physiologie et génétique**. 1st EMS / 1^{er} SEM, Dijon, INRA, Paris, p 217-220. 1986.
- UOSUKAINEN, M. & VESTBERG, M. Effect of inoculation with arbuscular mycorrhizas on rooting, weaning and subsequent growth of micropropagated *Malus* (L.) Moench. **Agriculture Science in Finland**, Helsinki, v.3, p.269-279. 1994.
- UOSUKAINEN, M. & VESTBERG, M. Timing of AMF inoculation to microcuttings of crab apple cv. Marjatta. In: **COST-ACTION 821 Biotechnology - Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil-plant systems**, (ed S. Gianinazzi e H. Schuepp), p. 209-210. 1996.
- VARMA, A. & SCHUEPP, H. Mycorrhization of the commercially important micropropagated plants. **Critical Reviews in Biotechnology**, Cleveland, v.15, n.3-4, p.313-328. 1995.
- VESTBERG, M. Arbuscular mycorrhizal inoculation of micropropagated strawberry and field observations in Finland. **Agronomie**, Paris, v.12, p.865-867. 1992.
- VESTBERG, M. & ESTAÚN, V. Micropropagated plants, an opportunity to positively manage mycorrhizal activities. In: **Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems**. Eds. S. Gianinazzi & H. Schüepp. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland. p. 217-226. 1994.
- VIDAL, M. T.; AZCÓN-AGUILAR, C. & BAREA, J. M. Mycorrhizal inoculation enhances growth and development of micropropagated plants of avocado. **HortScience**, Alexandria, v.27, n.7, p.785-787. 1992.
- WELANDER, M. *In vitro* rooting of the apple rootstock M26 in adult and juvenile growth phases and acclimatization of plantlets. **Plant Physiology**, Washigton, v.58, p.231-238. 1983.
- YANO, K., YAMAUCHI, A. & KONO, Y. Modification of root system morphology in a peanut seedling inoculated with arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall. **Japanese Journal of Crop Science**, Tokyo, v.65, n.2, p.361-367. 1996.
- YUI, E., CORREA, D. M. & PASQUAL, M. Micropropagação da macieira (*Malus domestica* Borkh.) – multiplicação *in vitro* da cultivar 'Golden Delicious' In: Anais

da II Reunião Brasileira de Fisiologia Vegetal. p. 216. Silveira, J. A.G., Vitorello, V.A., Machado, E.C. & Carelli, M.L.C. eds. Fev 1989. 296p.

ZIMMERMAN, R. H. & FORDHAM, Simplified method for rooting apple cultivares *in vitro*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.110, p.34-38. 1985.