

**Embrapa**

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Florestas  
Ministério da Agricultura e do Abastecimento

ISSN 1517-526X

Novembro, 2006

## **Documentos 130**

### **Produção de Mudanças de Espécies Lenhosas**

Ivar Wendling  
Leonardo Ferreira Dutra  
Fernando Grossi

Colombo, PR  
2006

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

***Embrapa Florestas***

Estrada da Ribeira, km 111 - CP 319

83411-000 - Colombo, PR - Brasil

Fone / Fax: (41) 3675-5600

Home page: [www.cnpf.embrapa.br](http://www.cnpf.embrapa.br)

E-mail: [sac@cnpf.embrapa.br](mailto:sac@cnpf.embrapa.br)

Para reclamações e sugestões *Fale com o Ouvidor*:

[www.embrapa.br/ouvidoria](http://www.embrapa.br/ouvidoria)

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: Luiz Roberto Graça

Secretária-Executiva: Elisabete Marques Oaida

Membros: Álvaro Figueredo dos Santos, Edilson Batista de Oliveira,

Honorino Roque Rodigheri, Ivar Wendling, Maria Augusta Doetzer

Rosot, Patrícia Póvoa de Mattos, Sandra Bos Mikich, Sérgio Ahrens

Supervisor editorial: Luiz Roberto Graça

Revisor de texto: Mauro Marcelo Berté

Normalização bibliográfica: Elizabeth Câmara Trevisan

Lidia Woronkoff

Fotos: Arquivo *Embrapa Florestas*

Editoração eletrônica: Mauro Marcelo Berté

1ª edição - 1ª impressão (2006): 1000 exemplares

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação - CIP

***Embrapa Florestas***

---

Wendling, Ivar.

Produção de mudas de espécies lenhosas [recurso eletrônico / Ivar Wendling, Leonardo Ferreira Dutra, Fernando Grossi. - Dados eletrônicos. - Colombo: Embrapa Florestas, 2006.

1 CD-ROM. - (Documentos / Embrapa Florestas, ISSN 1517-526X ; 130)

1. Muda - Produção. 2. Espécie florestal. 3. Reprodução vegetal. 4. Viveiro florestal. I. Dutra, Leonardo Ferreira. II. Grossi, Fernando. IV. Título. V. Série.

---

CDD (21. ed.) 634.9562

© Embrapa 2006

## **Autores**

**Ivar Wendling**

Engenheiro Florestal, Doutor, Pesquisador da  
*Embrapa Florestas.*

ivar@cnpf.embrapa.br

**Leonardo Ferreira Dutra**

Engenheiro Agrônomo, Doutor, Pesquisador da  
*Embrapa Florestas.*

leo@cnpf.embrapa.br

**Fernando Grossi**

Engenheiro Florestal, Doutor, Professor da  
Universidade Federal do Paraná.

f\_grossi@ufpr.br

## Apresentação

O objetivo principal desta publicação é servir de material didático de apoio aos “Cursos de Viveiro e Produção de Mudas” realizados pela *Embrapa Florestas* e Universidade Federal do Paraná.

A presente publicação é a segunda versão, atualizada e ampliada com base nas principais questões e demandas levantadas durante os 20 cursos já realizados, de 2002 até julho de 2006.

Com esta publicação, os autores objetivam também a prestação de uma homenagem póstuma ao pesquisador e engenheiro florestal **Márcio Pinheiro Ferrari**, o qual teve importante participação no lançamento da semente que resultou nesta série de cursos já realizados.

Sérgio Gaiad  
Chefe de Pesquisa e Desenvolvimento  
Embrapa Florestas



## Sumário

1 PLANEJAMENTO DAS INSTALAÇÕES PARA PRODUÇÃO DE MUDAS .....	09
1.1 Instalação de um viveiro .....	10
1.1.1 Tipos de viveiro .....	10
1.1.2 Escolha do local .....	10
1.1.3 Área do viveiro .....	11
1.1.4 Instalações necessárias .....	11
1.1.5 Ferramentas, máquinas, equipamentos e outros materiais necessários .....	12
1.1.6 Recipientes .....	12
1.1.7 Substratos .....	12
1.1.8 Adubação de cobertura das mudas .....	16
1.1.9 Parâmetros de qualidade das mudas .....	17
1.1.10 Pragas, doenças e ervas daninhas .....	17
1.1.11 Transporte das mudas para plantio ou venda .....	19
2 TÉCNICAS DE PRODUÇÃO DE MUDAS .....	20
2.1 Propagação sexuada .....	20
2.1.1 Quebra de dormência e teste de germinação .....	20
2.1.2 Semeadura em canteiros .....	21

|

2.1.3 Semeadura direta nos recipientes .....	22
2.1.4 Desbaste, repicagem, irrigação e dança .....	22
2.1.5 Rustificação, seleção e podas de formação .....	24
2.2 Propagação vegetativa .....	24
2.2.1 Estaquia .....	25
2.2.2 Miniestaquia .....	26
2.2.3 Mergulhia .....	28
2.2.4 Enxertia .....	29
2.2.5 Micropropagação .....	33
3 LITERATURA COMPLEMENTAR .....	50
4 ANEXO .....	52

# Produção de Mudanças de Espécies Lenhosas

---

*Ivar Wendling*

*Leonardo Ferreira Dutra*

*Fernando Grossi*

## 1 PLANEJAMENTO DAS INSTALAÇÕES PARA PRODUÇÃO DE MUDAS

O local destinado à produção de mudas é uma área com características próprias, destinada à produção, ao manejo e à proteção das mudas até que tenham características adequadas para serem transplantadas no local definitivo (praças, jardins, pomares, reflorestamentos, etc.), resistir às condições adversas do local de crescimento e apresentar um bom desenvolvimento.

O êxito de um projeto, quer tenha a finalidade de ornamentação, produção de frutos, florestas ou arborização, depende diretamente da qualidade das mudas produzidas e do sistema de produção a ser adotado, se sexuado ou assexuado, e esta depende de condições adequadas, quer sejam de instalações e manejo. No caso da propagação assexuada, são necessárias condições mais controladas para a fase inicial do processo, como casa de vegetação com umidade e temperatura controladas. No caso da propagação sexuada, as estruturas para proteção das mudas na fase inicial, em geral, são mais simples.

## 1.1 Instalações de um viveiro

### 1.1.1 Tipos de viveiro

Quanto à sua duração, os viveiros podem ser classificados em **temporários e permanentes**, e quanto a proteção do sistema radicular, em viveiros com **mudas de raiz nua e em recipientes**.

**Os viveiros temporários** destinam-se à produção de mudas em determinado local durante apenas certo período e, cumprindo as finalidades a que se destinaram, são desativados. Esses viveiros são de instalações simples, geralmente dentro da área de plantio (reflorestamentos, pomares frutíferos, grandes projetos paisagísticos etc.), visando à redução de custos de transporte das mudas e melhor adaptação das mesmas às condições climáticas do local.

**Os viveiros permanentes** têm por finalidade produzir mudas durante muitos anos, e por isso, requerem planejamento muito mais cuidadoso, uma vez que suas instalações são mais sofisticadas e onerosas, para suportar maior período de produção de mudas. Geralmente, esse tipo de viveiro é instalado próximo aos centros consumidores de mudas, razão pela qual possuem maiores dimensões que o viveiro temporário. A área do viveiro é dividida em áreas para benfeitorias, de produção de mudas e de crescimento ou viveiro de espera, que objetiva conduzir as mudas até atingirem tamanhos adequados para objetivos específicos (arborização urbana, praças, jardins, pomares, florestas etc.).

As **mudas de raízes nuas** são aquelas que não possuem proteção para o sistema radicular no momento do plantio. A semeadura é feita diretamente nos canteiros e as mudas são retiradas para o plantio, tendo-se apenas o cuidado de evitar danos às raízes, insolação direta, vento, evitando-se o ressecamento das raízes e a morte das mudas.

As **mudas produzidas em recipientes** apresentam o sistema radicular protegido, ou seja, envolto em um substrato que o recipiente contém. Os recipientes, quando biodegradáveis (palha, papel, embalagens hidrossolúveis), podem ser plantados com as mudas. Porém, para embalagens não biodegradáveis, o procedimento correto para o plantio é o de retirar a muda da embalagem para liberar as raízes e facilitar o pegamento.

### 1.1.2 Escolha do local

Na escolha do local para instalação do viveiro, os principais pontos a serem considerados são:

- 1) disponibilidade de água em qualidade e quantidades satisfatórias;
- 2) facilidade de acesso;
- 3) proximidade da área de plantio e/ou comercialização;
- 4) boa disponibilidade de mão-de-obra;
- 5) local bem arejado e ensolarado;
- 6) solo com boa drenagem;
- 7) localização à meia encosta;
- 8) a área deve ser plana ou com até 3% de declividade;
- 9) a área deve ser livre de ervas daninhas de difícil controle e de plantas que promovam o sombreamento das mudas.

### **1.1.3 Área do viveiro**

A área necessária para instalação de um viveiro depende do número e tipo de plantas a serem produzidas, do tamanho das embalagens a serem utilizadas, do percentual de germinação da semente ou de enraizamento, das perdas provenientes das seleções, da repicagem (quando for o caso) etc.

Num viveiro bem planejado, a área produtiva, ou seja, a área dos canteiros ou de recipientes, deverá possuir sempre em torno de 50% a 60% da área total, sendo o espaço restante destinado a caminhos, ruas, estradas, galpões, construções em geral e área para preparo do substrato e enchimento das embalagens.

### **1.1.4 Instalações necessárias**

O tipo e tamanho da infraestrutura necessária para a instalação de um viveiro varia de acordo com o objetivo a que se propõe. Algumas estruturas, como as casas de vegetação (estufa) e as casas de sombra (sombreadas) oferecem condições climáticas controladas para o crescimento das mudas, o que é extremamente importante, principalmente para as espécies mais sensíveis ao frio e ao calor. Entre as principais instalações, pode-se citar:

- casa do viveirista;
- galpão semi-aberto para trabalho em dias chuvosos;
- tanque ou caixa d'água para irrigação;
- depósito para insumos;
- almoxarifado para ferramentas e equipamentos;
- local de produção (sementeiras e/ou embalagens);
- casa de vegetação e casa de sombra.

### **1.1.5 Ferramentas, máquinas, equipamentos e outros materiais necessários**

Variam de acordo com a tecnologia utilizada, métodos de propagação, local, espécies a serem produzidas, tamanho do viveiro etc.

### **1.1.6 Recipientes**

Devido às limitações inerentes ao sistema de produção por raiz nua, o sistema de produção de mudas em recipientes é, sem dúvida, o mais utilizado atualmente para espécies lenhosas.

Existem diversos tipos de recipientes disponíveis no mercado ou que podem ser confeccionados com certa facilidade, destacando-se: canudos de bambu ou laminado de madeira, latas e copos descartáveis, sacos e tubetes de plástico. Os tubetes ou potes plásticos rígidos apresentam algumas vantagens em relação aos demais tipos de recipientes, a saber: menor diâmetro (ocupando menor área no viveiro), menor peso, reutilização, maior possibilidade de mecanização das operações de produção de mudas e redução considerável no custo de transporte e distribuição das mudas. Contudo, os sacos plásticos ainda são recipientes muito usados em função de seu menor preço, estruturas e tecnologias não adaptadas ao uso de tubetes.

O tamanho do recipiente varia em função da espécie a ser produzida, do tamanho final que a muda deverá atingir e do tempo de permanência das mesmas no viveiro.

### **1.1.7 Substratos**

A principal função do substrato é sustentar a muda e fornecer condições adequadas para o desenvolvimento e funcionamento do sistema radicular, assim como os nutrientes necessários ao desenvolvimento da planta. Este substrato deve ser isento de sementes de plantas invasoras, pragas e fungos patogênicos, evitando-se assim a necessidade de sua desinfestação. Desse modo, devido à estrutura e à tecnologia necessárias para a produção de um substrato de qualidade, grande parte dos viveiros comerciais adquire seus substratos de empresas especializadas. Contudo, em caso de formulação própria, deve-se dedicar especial atenção à adequada compostagem do material orgânico e desinfestação do solo, em função da presença de patógenos e sementes de plantas invasoras.

Existem diversos tipos de substratos, dentre os quais citam-se: terra de subsolo, composto orgânico, vermiculita, areia, esterco animal, serragem, casca de árvores decompostas, moínha de carvão etc. Atualmente, encontram-se no mercado substratos esterilizados, livres de pragas e doenças, formulados especialmente para

a produção de mudas, tais como: composto orgânico, húmus, espuma fenólica (para enraizamento de estacas e cultivo hidropônico) e fibra de coco, entre outros.

Recomenda-se que seja feita a mistura de dois ou mais materiais para a formulação do substrato, visando a uma boa aeração, drenagem e fornecimento de nutrientes de forma adequada. O tipo de material e a proporção de cada um na composição do substrato variam de acordo com a disponibilidade local, custo e tipo de muda a ser produzida. A seguir, encontram-se relacionados exemplos de formulação de substratos. Porém, ressalta-se que cada formulação deverá ser testada nas condições de cada local de produção e devidamente ajustada, caso haja necessidade.

Exemplos de substratos para mudas produzidas por semente:

- 80% de composto orgânico - 20% de moinha de carvão (1 a 3 mm)	- 33% de casca de pínus semi-decomposta e moída - 33% de húmus - 34% de casca de arroz carbonizada
--	--

Exemplos de substratos para mudas de propagação vegetativa:

- 60% de terra de subsolo peneirada - 40% de casca de arroz carbonizada	- 25% de casca de pínus semi-decomposta e moída - 25% de casca de arroz carbonizada - 25% de vermiculita fina - 24% de turfa ou húmus - 1% de solo vermelho
- 60% de terra - 40% de areia média	

Na Tabela 1, são apresentados grupos de substratos, com suas vantagens e desvantagens, possibilitando a tomada de decisão sobre qual substrato usar, de forma isolada ou em misturas. De modo geral, pode-se recomendar que sejam feitas misturas de materiais de grupos diferentes, o que resulta em melhoria das características e/ou propriedades do substrato obtido. O tipo de mistura, bem como a proporção de componentes dos diferentes grupos, devem ser feitas objetivando o ajuste das características e/ou propriedades físicas, uma vez que as químicas (fertilidade), normalmente, podem ser facilmente modificadas somente com práticas de adubação.

As características e/ou propriedades físicas e químicas dos substratos são variáveis em função de sua origem, método de produção/obtenção, proporções de seus componentes, entre outras características. No Tabela 2, é apresentada uma relação das características e/ou propriedades físicas e químicas de alguns substratos para produção de mudas. Na Tabela 3, é apresentada a escala de valores para interpretação de características e/ou propriedades físicas e químicas de substratos usados para produção de mudas florestais. Caso haja possibilidade, todo substrato utilizado no viveiro deverá ter suas características e/ou propriedades físicas e químicas analisadas, o que embasa melhor a formulação de misturas e adubações.

**Tabela 1.** Classificação em grupos, vantagens e desvantagens de tipos de substratos comumente utilizado na produção de mudas, baseadas em suas características físicas e químicas, origem e forma de produção, compatibilidade e funções nas misturas de substratos.

Grupo	Exemplos	Vantagens	Desvantagens
A	Composto orgânico de: esterco bovino casca de eucalipto casca de pinus bagaço de cana resíduos sólidos urbanos outros resíduos Húmus de minhoca	Produzido a partir de processos naturais; Boa consistência dentro dos recipientes; Média a alta porosidade e drenagem; Média a alta capacidade de retenção de água e nutrientes; Elevada fertilidade (macro e micronutrientes); Fácil obtenção e processamento; Baixo custo; Permite boa formação e agregação do sistema radicular das mudas.	Baixa porosidade e aeração, quando puros; Necessitam de adubações balanceadas de N e S, principalmente em cobertura; Composição química variada em função da origem do material; Podem conter sementes de plantas indesejáveis, nematóides, pequenos insetos, dependendo da forma de produção e exposição.
B	Turfas	Formadas a partir de processos naturais; Elevada capacidade de retenção de água e nutrientes, quando bem decompostas; Médias a altas concentrações de N, P e K; Alta CTC efetiva, equivalente ou superior ao grupo A.	Apresentam características físicas e químicas muito variáveis; Podem sofrer grandes oscilações de volume; Produto não renovável.
C	Casca de arroz carbonizada Cinza de caldeira de biomassa Bagaço de cana carbonizado	Baixa densidade global e alta porosidade; Apresentam boa homogeneidade no tamanho das partículas; Fácil obtenção e processamento; Baixo custo; Praticamente isentos de inóculos de doenças, plantas indesejáveis e insetos.	Reduzem a capacidade de retenção de água do substrato; Possuem pH muito elevado (> 6,5), podendo provocar deficiências de micronutrientes; Baixas concentrações de N e S; Relação C/N muito alta.
D	Vermiculita comercial	Baixa densidade e partículas grandes, elevando a aeração e drenagem; Elevada porosidade; Bem padronizada quanto às características químicas e físicas; Praticamente isenta de inóculos de doenças, plantas indesejáveis e insetos.	Quando predomina no substrato, promove a formação de sistema radicular pouco aderido; Contraí-se no uso, após vários ciclos de umedecimento e secagem; Baixas concentrações de N, P, K, Ca, S, Fe, Zn, B; Apresentam deficiências e relações inadequadas entre alguns nutrientes.
E	Terra de subsolo (características muito variáveis em função da sua textura)	Média a alta capacidade de retenção de água e nutrientes, quando não muito arenosa; Baixo custo; Fácil obtenção e processamento; Praticamente isenta de inóculos de doenças, plantas indesejáveis e insetos.	Baixa porosidade e aeração, quando mais argilosas; Baixa capacidade de retenção de água, quando mais arenosas; Baixas concentrações de nutrientes; Produto não renovável; Alta densidade.

Fonte: Wendling et al. (2002).

**Tabela 2.** Características e/ou propriedades físicas e químicas de alguns substratos usados para produção de mudas. Onde: TS = terra de subsolo; CAC = casca de arroz carbonizada; CED = casca de eucalipto decomposta; VF = vermiculta fina; HM = húmus de minhoca; COG = composto orgânico de gado.

Características	Turfa	TS	CAC	CED	VF (1)	HM (2)	80% HM		60% HM		80% COG		60% COG	
							20% CAC	40% CAC	20% CAC	20% VF	20% CAC	20% CAC	20% VF	
<b>Físicas</b>														
Densidade global (g cm <sup>-3</sup> )	-	1,2	0,25	0,4	0,12	0,45	0,40	0,36	0,34	0,50	0,43	0,36	0,36	0,36
Densidade real (g cm <sup>-3</sup> )	-	2,5	1,4	1,3	1,2	1,8	1,7	1,6	1,6	1,9	1,8	1,7	1,7	1,7
Porosidade total (%)	-	52	82	69	90	75	77	79	79	74	76	78	78	78
- microporosidade (%)	-	10	44	39	44	7	11	22	16	13	13	14	14	14
- microporosidade (%)	-	42	38	30	46	68	66	57	63	61	63	65	65	65
Retenção máxima de água (ml 50 cm <sup>-3</sup> )	-	21	19	15	23	34	33	29	32	31	32	32	32	32
Retenção máxima de água (ml g <sup>-1</sup> )	-	0,4	1,6	0,8	3,9	1,6	1,7	1,6	1,9	1,3	1,5	1,5	1,8	1,8
<b>Químicas</b>														
Matéria orgânica total (g kg <sup>-1</sup> )	773	5	510	552	-	194	257	320	218	205	266	225	225	225
N total (g kg <sup>-1</sup> )	31	0,24	6,5	10	-	8,4	8,0	7,6	6,3	11	10,1	7,9	7,9	7,9
Relação C total / N total	14	12	44	27	-	13	18	23	19	10	15	16	16	16
pH em CaCl <sub>2</sub> 0,01 M	4	4,2	6,5	6,1	5,9	6,4	6,5	6,6	6,5	6	6,3	6,3	6,3	6,3
P resina (mg dm <sup>-3</sup> )	-	2	135	120	23	1216	1000	784	761	780	651	500	500	500
K trocável (mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	15	0,2	28	22	1,8	38	36	34	29	117	99	71	71	71
Ca trocável (mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	-	10	28	273	37	188	156	124	126	144	121	101	101	101
Mg total (mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	-	2	10	64	69	183	148	114	126	54	45	60	60	60
Al trocável (mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	-	3	3	3	1	14	12	10	9	6	5	4	4	4
C.T.C. efetiva (mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	-	15	69	362	109	423	361	291	300	321	234	204	204	204

Fonte: Gonçalves e Poggiani (1996).

(1) Diâmetro médio entre 0,7 e 2 mm;

(2) Produzidos a partir de esterco de bovino de corte. Estudos resultaram em uma escala de valores para interpretação das principais características e/ou propriedades físicas e químicas de substratos para produção de mudas florestais. De maneira geral, estas recomendações também podem ser adotadas para a produção de mudas de plantas ornamentais, uma vez que não existem recomendações específicas para estas, além do fato de que as características e/ou propriedades físicas e químicas aceitáveis são similares para as diferentes espécies.

**Tabela 3.** Escala de valores para interpretação de características e/ou propriedades físicas e químicas de substratos usados para produção de mudas florestais.

Características	Níveis			
	Baixo	Médio	Alto	Adequado
<b>Físicas</b>				
Densidade global ( $\text{g cm}^{-3}$ )	< 0,25	0,25 - 0,50	> 0,50	0,45 - 0,55
Porosidade total (%)	< 55	55 - 75	> 75	75 - 85
- macroporosidade (%)	< 20	20 - 40	> 40	35 - 45
- microporosidade (%)	< 25	25 - 50	> 50	45 - 55
Capacidade máx. de retenção de água ( $\text{mL } 50 \text{ cm}^{-3}$ )	< 15	15 - 25	> 25	20 - 30
<b>Químicas</b>				
Relação C total / N total	8 a 12/1	12 a 18/1	> 18/1	8 a 12/1
pH em $\text{CaCl}_2$ 0,01 M	< 5,0	5,0 - 6,0	> 6,0	5,5 - 6,5
P resina ( $\text{mg dm}^{-3}$ )	< 200	200 - 400	> 400	400 - 800
K trocável ( $\text{mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ )	< 15	15 - 30	> 30	30 - 100
Ca trocável ( $\text{mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ )	< 100	100 - 150	> 150	100 - 200
Mg total ( $\text{mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ )	< 50	50 - 100	> 100	50 - 100
Mg total ( $\text{mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ )	< 100	100 - 200	> 200	> 200
C.T.C. efetiva ( $\text{mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ )				

Fonte: Gonçalves e Poggiani (1996).

Recomenda-se a adição de nutrientes no substrato para promover o suprimento dos elementos necessários, economizando-se tempo no processo de produção das mudas. Sua formulação e dose são variáveis em função do tipo de substrato utilizado e da espécie a ser produzida; é recomendada a realização de uma análise química do substrato, e caso haja necessidade de se proceder a correção da acidez do substrato ( $\text{pH} < 5,0$ ) e elevar o nível de fertilidade, pode-se consultar as tabelas de recomendação de adubação.

#### 1.1.8 Adubação de cobertura das mudas

Adubações periódicas em cobertura (após a germinação das sementes ou enraizamento das estacas) quase sempre são necessárias para permitir a produção de mudas de boa qualidade e em tempo menor. São realizadas quando o substrato utilizado é de baixa fertilidade ou apresenta baixa concentração de nitrogênio (N) e potássio (K), muitas vezes omitidos na adubação do substrato por apresentarem altos índices salinos, que podem provocar grandes perdas das mudas recém-germinadas. Esta adubação pode ser feita via fertirrigação (água de irrigação) ou pela aplicação individual na superfície do substrato.

Existem diversas formulações de adubação; a mais adequada dependerá da planta, da fertilidade do substrato, do manejo empregado para a produção das mudas, da fase de produção das mudas etc. Como sugestão, pode-se utilizar

25 gramas de sulfato de amônio + 60 gramas de cloreto de potássio, diluídos em 10 litros de água, a qual deverá ser ajustada em função do sistema de manejo adotado. Essa solução é suficiente para adubar 3 m<sup>2</sup> de canteiro (em torno de 300 mudas). Esta adubação também pode ser utilizada na formulação de pó, ou seja, pela aplicação de 0,05 gramas por planta da mistura acima, sem a água.

#### 1.1.9 Parâmetros de qualidade das mudas

A classificação das mudas em termos de qualidade é de fundamental importância em virtude da melhor adaptação e crescimento daquelas com melhor padrão de qualidade no plantio definitivo. Os principais parâmetros que indicam a boa qualidade de uma muda são:

- uniformidade de altura entre as mudas do lote;
- diâmetro do colo;
- rigidez da haste principal (diâmetro de colo);
- aspecto visual vigoroso (sem sintomas de deficiência, tonalidade das folhas);
- ausência de estiolamento;
- ausência de pragas e doenças na folha, no caule e nas raízes;
- ausência de plantas invasoras no substrato;
- sistema radicular e parte aérea bem desenvolvida (raiz pivotante não enrolada e fixada no solo, fora do recipiente);
- relação parte aérea/sistema radicular.

#### 1.1.10 Pragas, doenças e ervas daninhas

É interessante realizar tratamentos preventivos como a desinfestação do solo do canteiro ou substrato a ser utilizado no preenchimento dos recipientes, a fim de evitar a ocorrência de pragas, doenças e a competição por ervas daninhas. Para tanto, utiliza-se métodos químicos e/ou, mecânicos. Dentre os métodos químicos, cita-se a aplicação de herbicidas, fungicidas e inseticidas e, para os mecânicos, têm-se a catação manual, o revolvimento do solo, a aplicação de água quente, a exposição ao sol, a inundação, entre outros.

Ressalta-se a grande importância da escolha do local adequado para a instalação do viveiro, o que evita ou diminui problemas relacionados com pragas e doenças. O correto manejo diário do viveiro também é de fundamental importância na redução da ocorrência de problemas, devendo-se evitar excessos de irrigação, adubação e radiação direta logo após a germinação.

Dentre as pragas mais comuns, encontram-se a lagarta-rosca, formiga cortadeira, grilos, besouros, cochonilhas, paquinhas, pulgões e formigas. Contudo, no manejo adequado do viveiro, normalmente não se verifica muitos danos; entretanto, se o nível de infestação for elevado, torna-se necessário o combate.

As doenças que mais comumente ocorrem nos viveiros são: tombamento, podridão de raízes, ferrugens e manchas foliares. Quando o nível de danos se mostrar significativo, torna-se necessário o controle pela aplicação de fungicidas, utilizando-se dose de acordo com recomendações dos fabricantes.

Tanto em termos de pragas quanto de doenças, recomenda-se consultar um profissional capacitado quando da sua ocorrência, visando ao adequado controle, caso haja necessidade.

#### 1.1.10.1 Tombamento ou *Damping-off*

É a doença mais comum em viveiros, causada por fungos que atacam o colo das mudas originadas de sementes no estágio inicial de germinação. É uma doença que em poucos dias chega a causar a morte de todas as mudas e pode aparecer em qualquer época do ano; sua intensidade depende das características do substrato e das condições climáticas (chuva, insolação).

A infestação e proliferação é favorecida pela grande densidade de mudas nos canteiros, pela utilização de esterco não curtido no substrato, pelo excesso de umidade e pela compactação dos solos. O tombamento também pode ser disseminado de um canteiro para outro, por meio de ferramentas ou pela repicagem das mudas.

A adubação orgânica com esterco deve ser abandonada quando o mesmo não estiver bem curtido. Quando não houver substituto, curti-lo no mínimo dois meses antes da semeadura.

O tombamento é mais severo em viveiros que são excessivamente regados. Um lote de mudas saudáveis pode apresentar um severo tombamento após 1 ou 2 dias de chuva. Uma boa medida, quando aparecem os primeiros casos de tombamento, é diminuir a rega.

Como medidas preventivas ao aparecimento do tombamento, pode-se recomendar:

- a escolha adequada do local;
- a desinfestação do solo com fungicidas;
- tratamento da semente com produtos registrados para essa finalidade;
- seleção do substrato e material de cobertura.

#### 1.1.10.2 Podridão das Raízes

É um problema comum e, além de danificar o sistema radicular, também é responsável pelo tombamento das mudas no seu estágio inicial de crescimento. O ataque ao sistema radicular manifesta-se através de clorose, atrofia e murcha da parte aérea e, por vezes, morte da muda.

#### 1.1.10.3 Ferrugem Fusiforme

As folhas apresentam-se com aspecto ferruginoso, provocando um baixo crescimento ou morte das mudas. O combate pode ser feito por meio de pulverizações com fungicidas recomendadas para seu controle.

#### 1.1.10.4 Amarelecimento ou Clorose

São termos utilizados para descrever problemas de crescimento, que resultam no amarelecimento ou embranquecimento das folhagens. Todas as plantas verdes estão sujeitas a clorose, podendo causar redução no crescimento ou mortalidade das mudas. Os agentes mais comuns causadores de clorose são:

- falta ou excesso de nutrientes para as plantas;
- níveis tóxicos de produtos químicos nas folhas ou no solo;
- presença de pragas sugadoras da seiva, deixando a muda clorótica;
- fungos, bactérias e nematóides que causam danos às raízes, provocando clorose na parte aérea;
- a falta ou excesso de umidade; a alta ou a baixa temperatura do solo ou ar podem causar clorose

#### 1.1.11 Transporte das mudas para o plantio ou venda

No transporte, as mudas devem ser protegidas por lonas ou outro tipo de cobertura, de forma a evitar danos provocados pelo vento, chuva e pelo sol.

No caso de mudas produzidas em tubetes o seu transporte para o plantio pode ser feito na forma de "rocambole", onde as mudas são acondicionadas em filme plástico em pacotes de cinquenta ou mais mudas, dependendo do tamanho do tubete, com a raiz aderida ao substrato. Este processo evita o transporte do tubete para o campo, reduzindo a incidência de patógenos na área de produção das mudas.

## 2 TÉCNICAS DE PRODUÇÃO DE MUDAS

A produção de mudas de espécies lenhosas pode ser realizada pelos métodos sexuado e assexuado. O primeiro refere-se à produção de mudas por meio de sementes, e o segundo, por propagação vegetativa (partes da planta), tais como: estaquia, enxertia, mergulhia, encostia, divisão de rizomas, bulbos e touceiras. Mais recentemente, devido ao avanço das tecnologias e equipamentos, muitas espécies são propagadas pela técnica da micropropagação, que é a propagação vegetativa a partir de pequenos fragmentos da planta (explantes), realizada em condições assépticas.

### 2.1 Propagação sexuada

O principal insumo para o processo sexuado de produção de mudas é a semente. A boa qualidade das mudas depende da aquisição de sementes de produtores idôneos e credenciados junto aos órgãos governamentais competentes (MAPA, Secretarias de Agricultura etc.), para se obter garantia da qualidade das sementes. Com a dificuldade de se encontrar sementes de algumas espécies no mercado, pode-se proceder a coleta dessas em plantas matrizes previamente selecionadas, observando-se certos critérios de interesse para o objetivo pretendido (crescimento, formato da copa e tronco, produção de sementes, flores e frutos etc.).

Após a obtenção das sementes, estas devem ser armazenadas num lugar adequado, conforme indicação do produtor, o que permitirá manter seu poder germinativo por mais tempo. Sementes que facilmente perdem seu poder germinativo devem ser semeadas logo após a coleta.

#### 2.1.1 Quebra de dormência e testes de germinação

Sementes de algumas espécies apresentam dormência, ou seja, quando semeadas não germinam ou então germinam irregularmente. Nestes casos, é preciso quebrar a dormência para que as sementes germinem em maior número e em menor tempo, garantindo uma produção de mudas uniformes e de boa qualidade. Existem vários métodos para quebra de dormência, sendo que os mais comuns são:

- a) **Escarificação mecânica:** consiste em atritar as sementes contra uma superfície áspera (lixa). É indicado para sementes duras, como por exemplo o pau-ferro, o guapuruvu, o louro, a noqueira, o pessegueiro, o coqueiro, a aroeira etc.

- b) **Embebição em água:** coloca-se as sementes em água à temperatura ambiente até que se encharquem e se tornem com volume maior, o que pode levar de 1 a 4 dias, dependendo da espécie. Ex.: timbaúva, candeia, goiabeira, canela, jacarandá, arará etc.
- c) **Imersão em água fervente:** consiste em colocar as sementes em água a 80° C. Ex.: flamboyant, chuva de ouro, acácias, angico vermelho, ipês, paineira rosa, palmeiras etc.
- d) **Estratificação:** consiste em dispor as sementes entre camadas de areia úmida por períodos de até 6 meses. Ex.: fedegoso, pessegueiro, erva-mate etc.
- e) **Escarificação ácida:** consiste em imergir as sementes em ácido sulfúrico comercial. Ex.: pau-ferro, guapuruvu, chuva de ouro, barbatimão, carne de vaca, flamboyant, corticeira-do-banhado etc.

Para se ter certeza da viabilidade (poder de germinação) das sementes, podem-se realizar testes de germinação rápidos. Esses testes podem ser realizados de diversas maneiras, sendo que a mais comum é a semeadura de um determinado número de sementes em um local próprio, a fim de se determinar o número de sementes viáveis e, conseqüentemente, seu percentual de germinação.

Dependendo das condições climáticas, da disponibilidade de mão-de-obra e da quantidade e qualidade das sementes disponíveis, a produção de mudas através de sementes pode ser feita em canteiros para posterior repicagem, em canteiros para plantio com raiz nua e em recipientes por meio de semeadura direta.

### 2.1.2 Semeadura em canteiros

Existem duas variantes do processo de semeadura em canteiros, ou seja, a semeadura em canteiros para plantio de mudas com raiz nua e a semeadura em canteiros para posterior repicagem em embalagens individuais.

A semeadura em canteiros para produção de mudas com raiz nua é feita diretamente na terra e as mudas permanecem nos canteiros até o plantio definitivo. É de fácil mecanização, pois não são utilizadas embalagens. As mudas assim produzidas poderão ter custo menor, pois serão eliminadas diversas operações que demandam mão-de-obra para enchimento de embalagens, encanteiramento etc.

Na prática, recomenda-se que a profundidade de sementeira não ultrapasse duas vezes o diâmetro da semente. Após o semeio, é recomendada a colocação de uma cobertura morta (serragem, capim, sombrite etc.) sobre o canteiro, o que protegerá as sementes. Para o caso de sementes achatadas ou muito pequenas, recomenda-se o peneiramento de uma fina camada de terra sobre as sementes, além da cobertura. A colocação de um sombrite é recomendada para evitar a exposição das mudas ao excesso de insolação, chuvas fortes, ventos, pássaros etc.

Recomenda-se a sementeira em canteiros para posterior repicagem em embalagens individuais quando se desconhece a capacidade de germinação das sementes da espécie, as sementes apresentam dormência e não se conhece o método mais adequado para sua quebra, as sementes forem muito pequenas (ex.: quaresmeira) ou muito grandes (ex.: abacate) para o caso de produção em recipientes pequenos e também quando as sementes apresentarem baixo poder germinativo.

### **2.1.3 Sementeira direta nos recipientes**

Este processo é usado, principalmente, para sementes de dimensões médias, que apresentam germinação rápida e uniforme, ou para espécies que não toleram a repicagem. As vantagens desse método são: eliminação da necessidade de confecção dos canteiros para sementeira e posterior repicagem; dispensa do sombreamento para as mudas recém-repicadas; redução do prazo para produção das mudas; formação de mudas mais vigorosas; diminuição das perdas por doenças e produção de mudas com sistema radicular de melhor qualidade.

Nesse processo também é recomendada a proteção das sementes com cobertura morta (serragem, capim etc.) e, ou sombrite para evitar a exposição das mudas ao excesso de insolação, aos impactos das gotas de chuva, principalmente nos primeiros dias após a germinação.

### **2.1.4 Desbaste, repicagem, irrigação e dança**

Em torno de 30 a 50 dias após a emergência (variável em função da espécie e condições de manejo), quando as mudas atingirem em torno de 5 a 10 cm de altura, realiza-se um desbaste, por meio do arranquio ou corte, deixando-se somente uma muda por recipiente. No caso de sementeira em canteiros, um espaçamento adequado entre as mudas deve ser mantido, distribuindo-as de forma uniforme pelo canteiro.

A repicagem é o processo de seleção e transferência das mudas da embalagem ou sementeira para os sacos plásticos, tubetes ou canteiros. Deve ser feita preferencialmente em dias nublados ou chuvosos, evitando-se realizá-la nas horas mais quentes dos dias ensolarados, devido à fragilidade das mudas a temperaturas elevadas. Previamente à repicagem, deve-se tomar o cuidado de molhar bem o substrato das mudas a serem transplantadas. As mudas repicadas devem ser protegidas do excesso de insolação com sombrite 50% por, pelo menos, sete dias ou até o seu pegamento. Caso seja necessário, a área foliar e o sistema radicular devem ser reduzidos, considerando-se sempre as características de cada espécie.

A irrigação é um dos fatores de maior importância do viveiro. O excesso e a falta d'água podem comprometer qualquer uma das fases de formação das mudas. A irrigação em excesso pode lixiviar os nutrientes solúveis (especialmente o N e K), reduzir a aeração, favorecer a ocorrência de doenças, dificultar o desenvolvimento das raízes, tornar as mudas suculentas e pouco resistentes à seca e, finalmente, resulta no gasto desnecessário de água.

A escolha do equipamento adequado associa-se ao manejo do sistema como um todo, onde devem ser considerados, dentre outros fatores, o tipo de substrato e recipientes utilizados pelo produtor, a espécie escolhida para a produção de mudas, a fase em que a muda se encontra (germinação, incluindo repicagem, crescimento ou rusticificação), a época do ano em que se está produzindo e a região onde está instalado o viveiro (temperatura e regime de chuvas). Assim, em regiões de calor intenso, normalmente, a exigência das mudas por água em qualquer fase de desenvolvimento é maior que em regiões de clima mais frio. Por outro lado, alguns tipos de substratos, por terem menor capacidade de retenção de água, exigem que se aplique mais água a cada irrigação, ou que se aumente a frequência da mesma.

É importante ressaltar que para cada etapa de formação das mudas, e para diferentes tipos de recipientes, existem diferentes sistemas de irrigação, com bicos de diferentes vazões, pressão de trabalho e área de recobrimento. Existem no mercado empresas especializadas que prestam assessoria e ajudam o produtor a determinar o melhor equipamento para o seu sistema de produção.

A dança das mudas consiste na mudança de lugar para evitar que as raízes penetrem no solo, no caso de mudas produzidas em recipientes em contato com o solo e para a padronização das mudas por tamanho.

### 2.1.5 Rustificação, seleção e podas de formação

Antes de serem plantadas no local definitivo, as mudas devem sofrer um processo de rustificação que consiste em induzir uma maior resistência das mudas aos fatores ambientais adversos do campo, tais como: secas, elevada insolação, baixa fertilidade do solo etc. Pode ser realizado de diversas maneiras, entre as quais a mais recomendada é a diminuição na irrigação, a colocação das mudas em pleno sol e a redução ou mesmo suspensão da adubação.

Antes de serem encaminhadas para o plantio definitivo, deve haver um processo de seleção das mudas. Os principais critérios adotados para esta seleção no viveiro ou mesmo na compra de mudas de terceiros, variam de acordo com a espécie utilizada e a finalidade a que se destina a muda (arborização urbana, plantio de pomar, jardim, floresta etc.). Características como um sistema radicular bem desenvolvido e agregado ao substrato, rigidez da haste, número de pares de folhas, aspecto nutricional (sem sintomas de deficiência) e boa sanidade (ausência de pragas e doenças) são essenciais para todas as espécies.

As podas de formação são necessárias para mudas destinadas a formação de pomares frutíferos, arborização, reflorestamentos etc. Nas mudas frutíferas, a poda deve seguir os padrões de cada espécie, definidos em normas técnicas para condução da cultura; para o caso de mudas destinadas à arborização urbana, necessita-se realizar podas de condução que visem a formação de uma muda retilínea com a copa de, pelo menos 1,8 m acima do solo.

## 2.2 Propagação vegetativa

A propagação vegetativa, também conhecida como propagação assexuada ou clonagem, consiste na produção de mudas ou novas plantas a partir de partes ou órgãos da planta (ramos, gemas, estacas, folhas, raízes e outros), sendo denominada de reprodução assexuada. É uma antiga técnica, capaz de reproduzir as plantas selecionadas em grande quantidade, usada na floricultura, horticultura, fruticultura e na silvicultura. A razão principal para se empregar essa técnica é que se obtém indivíduos com as mesmas características da planta-mãe (florescimento, crescimento, forma, produção etc.). Outras vantagens da propagação vegetativa em relação à sexuada é que, nesta última, nem sempre se consegue obter sementes e, muitas vezes, as sementes são atacadas por pragas e doenças, apresentam baixo poder germinativo, aliada à produção de flores e frutos mais tardiamente e um maior porte das plantas, etc.

Existem vários métodos para a propagação vegetativa de plantas, dentre os quais cita-se a estaquia (microestaquia e miniestaquia), a enxertia, a separação por bulbos, a divisão de touceiras, rizomas e a propagação por meio de cultura de tecidos, cada qual com sua finalidade específica. A definição do método varia de acordo com os objetivos da técnica, da espécie envolvida, da época do ano, da habilidade do executor, do tipo e quantidade de material disponível e das condições ambientais, entre outros fatores.

### 2.2.1 Estaquia

A estaquia é o processo de propagação no qual porções das hastes (caules, ramos), folhas ou raízes são colocadas sob condições propícias ao enraizamento (leitos de enraizamento), dando origem a uma nova planta.

O tipo de estaca a ser usado varia de espécie para espécie e, às vezes, em função da época do ano. Diversas espécies apresentam folhas com capacidade de originarem plantas completas, tais como: begônia, gloxínia, língua-de-sogra, violeta africana, peperômia, sedum, camélia, ficus, etc.

As estacas de raízes são um tipo pouco comum, sendo as raízes seccionadas após a coleta, em pedaços de 5 a 15 cm de comprimento e enterradas no substrato a uma profundidade de 2,5 a 5 cm. A dificuldade do processo está na coleta das raízes e nos danos causados à planta-mãe. A propagação vegetativa por estaca radicular pode ser feita em cerejeira, pessegueiro, goiabeira, caquizeiro, ipê, manacá, quiri, etc.

As estacas caulinares podem ser herbáceas, lenhosas ou semilenhosas, o que varia em função do local de coleta e do tipo de planta. Dentre os tipos de caule, o que possui maior capacidade de enraizamento é o herbáceo, e quanto mais herbácea e nova for a estaca, maior será sua capacidade de enraizamento.

Em alguns casos, a época do ano em que se procede a coleta das estacas é de grande importância para o enraizamento. Para as espécies de difícil enraizamento, a época indicada para a coleta das estacas é aquela que coincide com o repouso vegetativo ou com a estação de crescimento, enquanto que para as espécies de fácil enraizamento, as estacas podem ser colhidas em qualquer época do ano.

As estacas lenhosas são normalmente coletadas após a queda das folhas, ou no início da nova brotação, que compreende o período de menor atividade metabólica da planta. Porém, existem plantas lenhosas que são facilmente propagadas por estaquia em qualquer época do ano, como por exemplo, o cróton, o hibisco e o *ficus*.

Para realizar a estaquia, corta-se um ramo novo, de 7 a 15 cm de comprimento, retirando-se as folhas da metade inferior e cortando-se o restante das folhas pela metade. O corte da base deverá ser feito em forma de bisel (cunha), para facilitar o enraizamento. Após a preparação da estaca, promove-se a estaquia em recipiente ou sementeira em local adequado.

### 2.2.2 Miniestaquia

A técnica de miniestaquia é uma variação da estaquia convencional. Consiste na utilização de brotações de plantas propagadas pelo método de estaquia convencional como fontes de propágulos vegetativos. Numa seqüência esquemática desta técnica, inicialmente, faz-se a poda do ápice da brotação da estaca enraizada, e em intervalos variáveis em função da época do ano, do clone/espécie, das condições nutricionais, entre outras, há emissão de novas brotações, que são coletadas e colocadas para enraizar.

A coleta de miniestacas nas mudas podadas é realizada de forma seletiva, em períodos a serem definidos conforme o vigor das brotações, colhendo-se todas aquelas que se enquadram nos padrões de miniestaca, ou seja, de 3 a 6 cm de comprimento, contendo de um a três pares de folhas, recortadas pela metade. Após serem coletadas, as miniestacas são acondicionadas em recipientes com água, para que possam chegar ao local de enraizamento em perfeitas condições de turgor.

As miniestacas são colocadas para enraizamento em casa de vegetação com umidade relativa acima de 80%, seguindo posteriormente para a casa de sombra, para uma pré-adaptação às condições de menor umidade relativa e, finalmente transferidas para pleno sol para rustificação e posterior plantio. Os períodos de permanência das miniestacas em casa de vegetação dependem da época do ano, do clone/espécie envolvido e do seu estado nutricional.

#### 2.2.2.1 Medidas para aumentar o enraizamento em plantas

Existem muitas variações quanto à capacidade de enraizamento e posterior formação de mudas entre as espécies de plantas. No geral, as plantas herbáceas e arbustivas são mais fáceis de enraizar do que as lenhosas (árvores frutíferas, florestais e algumas ornamentais), embora existam exceções.

Para plantas de difícil enraizamento, de forma geral, pode-se lançar mão de alguns tratamentos para aumentar os índices de enraizamento, ou seja:

- escolha da época adequada: geralmente as plantas lenhosas apresentam maiores índices de enraizamento na saída do inverno, ou seja, antes de lançarem brotações novas;
- tratamentos na planta-mãe que vai fornecer as estacas a serem enraizadas. Ex.: adubações e irrigações adequadas, sombreamento, anelamento, torção etc.;
- coleta de estacas mais próximas à base e ao tronco da planta quanto possível;
- melhoria das condições de enraizamento: usar substrato poroso, manter a umidade acima de 80%, promover sombreamento, manter a temperatura entre 20 e 30 °C;
- aplicação de hormônios para enraizamento;
- deixar de 1 a 3 pares de folhas recortadas ao meio nas estacas;
- diminuir ao máximo o tempo entre a coleta das estacas e sua colocação no substrato, bem como realizar seu transporte em caixas de isopor, panos ou embalagens umedecidas;
- enterrar, pelo menos, um entrenó (espaço entre dois nós consecutivos) no substrato;
- não usar estacas muito velhas e duras;
- fazer subcultivos (estaquia e enxertia consecutiva).

Se após estes tratamentos e cuidados os resultados forem insatisfatórios, deve-se utilizar outros métodos de propagação, tais como: enxertia, mergulhia e cultura de tecidos.

#### 2.2.2.2 Tratamentos com fitorreguladores de enraizamento (hormônios)

O tratamento com hormônios é um método eficiente para obtenção de raízes em estacas, principalmente em plantas de difícil enraizamento, aumentando a velocidade de formação de raízes, o número e a qualidade das raízes formadas, bem como a uniformidade de enraizamento.

Dentre os hormônios mais comumente usados no processo de enraizamento de estacas, está o ácido indolbutírico (AIB). A concentração utilizada varia de acordo com a espécie, com variações de 20 a 10.000 mg L<sup>-1</sup> (miligramas por litro, antigo ppm - partes por milhão) ou mg kg<sup>-1</sup>, sendo as maiores concentrações utilizadas para estacas de enraizamento mais difícil.

A aplicação do hormônio pode ser feita na forma de pó, misturado com talco ou na forma líquida, dissolvido em álcool etílico a 95%, acrescentando-se ainda água para completar a concentração desejada.

Para a aplicação da solução de hormônio, deve-se mergulhar cerca de 2,5 cm da base das estacas na solução, por um período que varia de alguns segundos (estacas herbáceas) a alguns minutos (estacas lenhosas), possibilitando a penetração do hormônio.

Existem no mercado hormônios enraizadores prontos para o uso, em concentrações pré-definidas, na forma de ácidos ou sais em pó, como: Hormex<sup>®</sup>, Rootone<sup>®</sup>, Hormodin<sup>®</sup>, Seradix<sup>®</sup> etc.

Assim que as estacas estiverem preparadas, devem ser tratadas com hormônios e, logo em seguida, colocadas nos recipientes ou canteiros de enraizamento.

### **2.2.3 Mergulhia**

A mergulhia é um processo de multiplicação vegetativa no qual um ramo é posto a enraizar quando ainda faz parte da planta-mãe, sendo destacado desta somente após o enraizamento. Por ser um processo rápido de propagação e por fornecer mudas enfolhadas, é utilizado com bons resultados na obtenção de plantas ornamentais. Por ser um processo de baixo rendimento e necessitar de muita mão-de-obra, é recomendado para a propagação de plantas de difícil enraizamento por meio da estaquia.

Como regra geral, recomenda-se a utilização de ramos com menos de um ano para fazer a mergulhia. A época indicada para a sua realização é o princípio da primavera.

Na mergulhia aérea, com o objetivo de facilitar o enraizamento, fazem-se incisões, anelamentos ou torções no ramo a ser propagado. O ponto lesionado é coberto com um substrato umedecido, que pode ser musgo, substrato orgânico ou qualquer outro formado pela mistura de materiais que proporcionem uma boa aeração, umidade e temperatura moderada, envolto por tecidos ou plásticos.

É recomendada a realização da mergulhia aérea em ramos de até um ano, no qual eliminam-se as brotações laterais em cerca de 15-30 cm antes da gema terminal. A mergulhia deve ser feita na época em que as plantas estejam em plena atividade de crescimento.

No ponto lesionado pode-se aplicar hormônio de enraizamento (AIB, na concentração de  $1.000 \text{ mg L}^{-1}$ ). Cuidado especial deve ser tomado para manter uma boa umidade do substrato envolto no galho, por meio de irrigações.

O tempo necessário para realizar a separação da planta-mãe do ramo que sofreu a mergulhia depende da espécie, sendo de aproximadamente dois a três meses. A melhor forma de determinar a época de remoção do ramo que sofreu mergulhia é observar a formação de raízes através do plástico transparente utilizado para envolver o substrato.

#### 2.2.4 Enxertia

A enxertia é obtida por meio da união entre duas plantas (enxerto ou cavaleiro e porta-enxerto ou cavalo). O enxerto é sempre representado por uma parte da planta que se pretende multiplicar, ao passo que o porta-enxerto é que recebe o enxerto e geralmente é uma planta jovem, com boa taxa de crescimento, proveniente de sementes ou de estacas, bastante rústica e resistente a pragas e doenças.

A enxertia é um método muito empregado na propagação de plantas; no entanto, para se ter êxito, torna-se necessário respeitar alguns princípios básicos, tais como: utilização de plantas da mesma família ou gênero; observar a época ideal de enxertia, que é variável em função da espécie e tipo de enxerto empregado; promover um contato íntimo entre as cascas vivas; utilizar fitilho para promover o contato entre enxerto e porta-enxerto; o tipo de enxertia (variável em função da planta envolvida), a experiência e cuidados do operador.

Para fazer a ligadura da parte enxertada é recomendável usar uma fita de polietileno de 1,2 cm de largura, que é de fácil aquisição e praticidade de uso, além de possuir as características de elasticidade e evitar o ressecamento da parte enxertada.

Durante a enxertia, deve-se cuidar para que os enxertos não ressequem, deixando-os em água limpa ou panos úmidos. As operações devem ser efetuadas rapidamente, realizando-se um único corte, evitando o acúmulo de resíduos na lâmina. A amarração deve ser realizada ao longo de todo o comprimento de união, certificando-se de que não haja deslocamento das partes envolvidas. Em torno de 20 a 40 dias após a enxertia, dependendo das condições locais e da espécie, retira-se o fitilho. Deverá-se efetuar a poda dos ramos do porta-enxerto para promover a dominância apical no enxerto, deixando-se somente o broto crescer.

Vários são os processos de enxertia, os quais podem ser agrupados em três grupos ou categorias distintas: borbulhia, garfagem e encostia.

#### 2.2.4.1 Borbulhia ou enxerto de gema

É o processo que consiste na justaposição de uma única gema sobre um porta-enxerto enraizado. As borbulhas podem ser destacadas com um pouco de lenho, tornando-as mais resistentes e a extração mais simples.

A enxertia por borbulhia normalmente é realizada a uma altura de 5 a 20 cm do nível do solo, de acordo com a espécie, podendo ser realizada também em qualquer ponto da planta. Uma condição essencial para se efetuar a borbulhia é que o porta-enxerto esteja soltando a casca.

Normalmente, a borbulhia é realizada em plantas jovens ou em ramos mais finos de plantas maiores (de 0,5 a 2,5 cm de diâmetro, geralmente o diâmetro de um lápis). Existem diversas modalidades de enxertia por borbulhia, sendo a borbulhia em T normal e em T invertido as principais.

Na borbulhia em T normal corta-se o cavalo com o canivete bem afiado e esterilizado (álcool) no sentido transversal; depois no sentido perpendicular de modo a formar um T. O escudo ou gema é retirado segurando-se o ramo em posição invertida. Segura-se o escudo pelo pecíolo, levanta-se a casca com o dorso da lâmina e introduz-se a borbulha, cortando-se o excesso e, posteriormente, procede-se a amarração.

No T invertido procede-se de modo semelhante ao anterior, diferindo-se, principalmente, apenas na forma de colocação da borbulha, que é invertida (Figura 1).

#### 2.2.4.2 Garfagem

É o processo que consiste em se soldar um pedaço de ramo destacado (enxerto ou garfo) sobre outro vegetal (porta-enxerto) de maneira a permitir o seu desenvolvimento. O garfo difere da borbulha por possuir normalmente mais de uma gema.

A época normal da garfagem para as plantas de folhas caducas se dá no período de repouso vegetativo (inverno) e nas folhas persistentes, dependendo da espécie, na primavera, verão e outono.

Principalmente para espécies com maior dificuldade de pegamento, é recomendada a colocação de um saco plástico amarrado com barbante na base do porta-enxerto, o que promove melhores condições ambientais e maior proteção.

Como na borbulhia, também existem diversos tipos de garfagem, sendo a garfagem em fenda cheia a mais comumente empregada. Essa consiste em decepar o porta-enxerto a uma altura determinada do solo (em torno de 10 a 20 cm) e, com um canivete, faz-se uma fenda de 2 a 4 cm, perpendicular ao sentido do diâmetro, justapondo o enxerto (com forma de cunha) com o cavalo, de forma que haja coincidência dos diâmetros ou que pelo menos um dos lados seja coincidente. Por fim, amarra-se com fitilho (Figura 2).

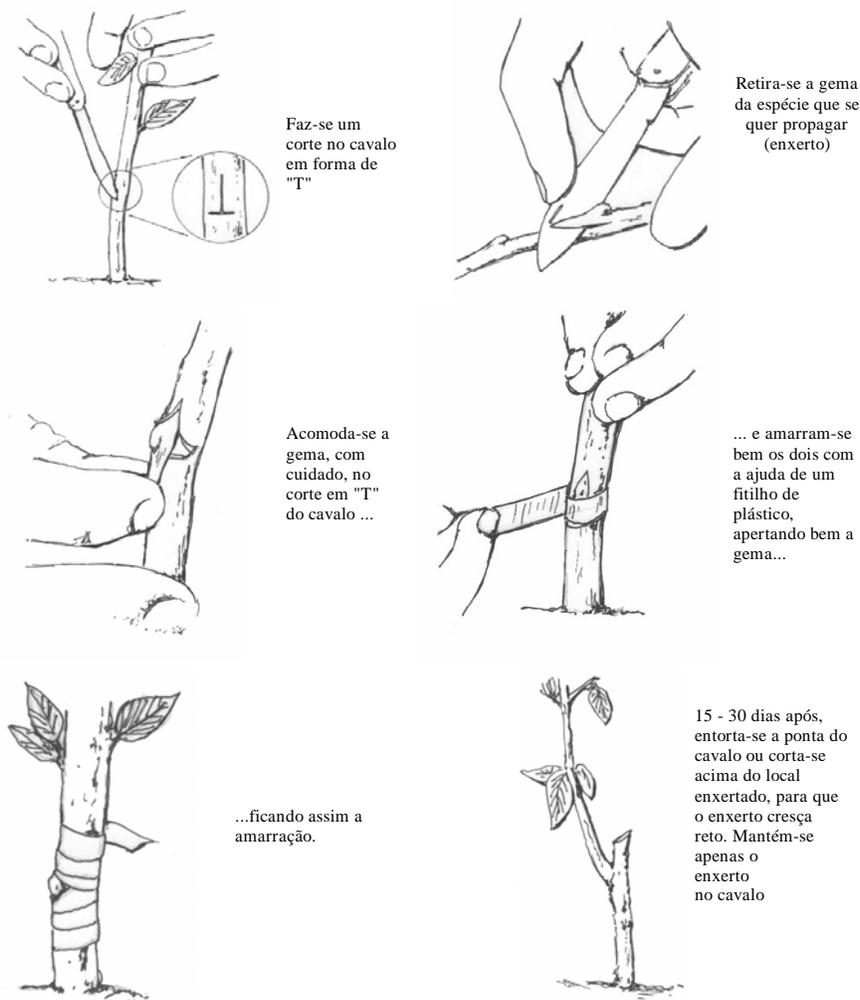


Figura 1. Enxertia por borbulhia.

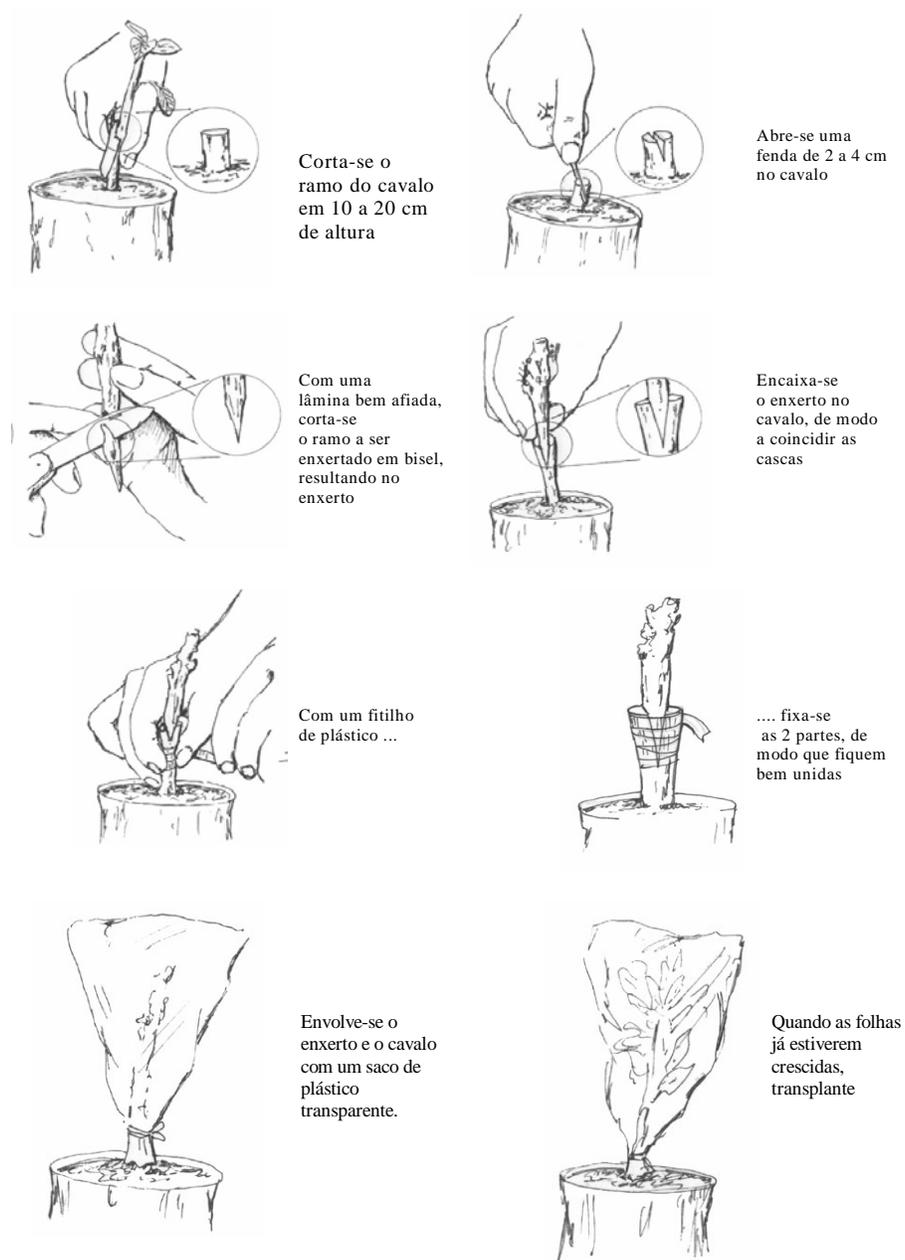


Figura 2. Enxertia por garfagem.

### 2.2.5 Micropropagação

A micropropagação, ou propagação vegetativa *in vitro*, é uma das aplicações da cultura de tecidos de mais larga utilização. Destina-se principalmente àquelas espécies que são de difícil propagação pelos métodos convencionais, permitindo a obtenção de grande número de plantas saudáveis e geneticamente uniformes em curto período de tempo. De modo geral, a micropropagação de espécies lenhosas é mais difícil que a de espécies herbáceas, devido à perda da capacidade morfo genética dos tecidos.

Sua aplicabilidade está baseada na teoria da totipotência, a qual estabelece que qualquer parte do vegetal, por menor que seja, tem capacidade de originar uma nova planta, desde que sejam fornecidas as condições adequadas. Com base nesta teoria, pode-se inferir que qualquer espécie vegetal tem a capacidade de ser micropropagada, a partir de qualquer parte da planta. Contudo, na prática, muitas espécies são difíceis de serem micropropagadas e são chamadas de recalcitrantes.

As respostas das plantas às técnicas de micropropagação são variáveis em função da espécie, variedade e/ou cultivar, época de coleta, tipo de explante utilizado e condições de cultivo. Portanto, cabe ao técnico descobrir qual a época mais adequada para coleta dos explantes e as condições que devem ser oferecidas a estes, para que expressem seu potencial para a micropropagação.

A tarefa exige experimentação intensa, até que se obtenham resultados satisfatórios. Porém, uma vez estabelecida, permite o desenvolvimento de protocolos que tem por objetivo tornar a operação prática e rotineira para uma dada espécie. Portanto, um protocolo nada mais é do que uma seqüência de procedimentos a serem aplicados para que de uma determinada espécie e/ou cultivar obtenha-se um máximo aproveitamento do material vegetal disponível.

Dentre as diferentes técnicas de cultivo *in vitro*, a micropropagação a partir de parte de segmentos de órgãos ou tecidos meristemáticos, com indução de organogênese direta é, até hoje, a mais indicada comercialmente, pelo fato de permitir menor ocorrência de variações genéticas em relação ao explante original.

A indução da multiplicação de explantes cultivados *in vitro* dá-se através da interação entre o potencial inerente do explante utilizado e os fitorreguladores. Quando nesta multiplicação ocorre a formação direta de uma ou mais gemas, esta é chamada de organogênese direta. E quando antes da formação de uma nova gema ocorre a formação de calos, esta é chamada de organogênese indireta.

Num sistema comercial de micropropagação, o objetivo é a multiplicação o mais fiel possível do material original (clonagem), para que sejam mantidas as características comerciais deste material. Assim, para a manutenção desta fidelidade, é importante que se evite a organogênese indireta, pois a formação de calo pode dar origem a instabilidades genéticas indesejáveis que virão a se multiplicar durante o processo de micropropagação, vindo a produzir indivíduos com características diferentes do original (*off types*). Este fato é comum, principalmente, em indivíduos com nível de ploidia elevado, como no caso de cultivares de bananeira.

Comercialmente, a micropropagação é empregada em diversos países. A grande maioria dos laboratórios comerciais surgiu agregado aos viveiros de companhias produtoras de mudas, com o objetivo de fornecer material propagativo livre de doenças, de acordo com as necessidades internas, ou de acelerar os métodos convencionais de propagação vegetativa. Poucas empresas utilizam a produção de mudas *in vitro* para abastecer viveiros de terceiros.

No Brasil, a aplicação comercial da micropropagação é recente. A maioria dos trabalhos é realizada por grupos em instituições públicas de pesquisa e universidades. Entretanto, poucas são as empresas que atuam na área, como são os casos de algumas empresas que produzem orquídeas e outras reflorestadoras, que têm empregado a micropropagação de árvores selecionadas.

#### 2.2.5.1 Aplicações da micropropagação

Uma das utilizações da micropropagação é a obtenção de plantas livres de vírus, por meio da cultura de ápices caulinares e meristemas, superando problemas de contaminação patogênica. Uma variação da cultura de ápice caulinar para limpeza clonal é a microenxertia. Outra indicação desta técnica é para a recuperação de árvores adultas selecionadas.

Como técnica de propagação rápida e em grande escala, a micropropagação tem sido empregada em programas de melhoramento genético vegetal. A micropropagação é uma técnica que mantém a identidade genética do genótipo. Entretanto, dependendo da espécie, pode ser mais prático e econômico utilizar outros métodos de propagação vegetativa.

A principal aplicação prática das técnicas de micropropagação tem sido na produção comercial de plantas, possibilitando sua multiplicação rápida e em períodos de tempo e espaços reduzidos.

Para justificar a utilização da propagação *in vitro*, deve-se levar em consideração que o clone a ser propagado deva ser resultado de algum tipo de seleção. Além disso, a variabilidade genética entre espécies e diferentes clones da mesma espécie pressupõem o ajuste da metodologia para cada clone. Finalmente, devem-se buscar alternativas que tornem a micropropagação um processo barato, acessível e economicamente viável. A utilização de bioreatores, embriogênese somática, entre outras técnicas, aliadas a redução de carboidratos no meio de cultura, aumento da intensidade luminosa com luz natural e promoção de trocas gasosas entre o ambiente *in vitro* e *ex vitro*, certamente tornarão a micropropagação uma técnica amplamente empregada.

#### **Outras aplicações da cultura de tecidos**

- Preservação e intercâmbio de germoplasma
- Hibridação interespecífica e intergenérica (cultura de embriões e fusão de protoplastos)
- Obtenção de plantas haplóides
- Variação somaclonal e indução de mutações
- Florescimento e fertilização *in vitro*
- Transformação de plantas
- Seleção *in vitro*

#### **2.2.5.2 Fases da micropropagação**

##### **Fase 0 - Tratamento e preparo das plantas-matrizes para coletas dos explantes**

Nesta etapa, o preparo adequado das matrizes determinará, em grande parte, o sucesso da aplicação da técnica.

As matrizes fornecedoras de explantes devem ser mantidas nas melhores condições de limpeza e fertilidade possível. Para tal, recomenda-se que sejam cultivadas em condições controladas, onde possam receber tratamento fitossanitário e nutrição mineral adequada. A parte aérea deve também, dentro do possível, ser mantida seca.

Os tratamentos fitossanitários têm por objetivo manter os agentes microbianos externos, fitopatogênicos ou não, nos níveis mais baixos possíveis, enquanto os internos (endofíticos) devem ser totalmente eliminados. Para tal, são utilizados agentes antimicrobianos de contato e sistêmicos, respectivamente.

Uma vez reduzida a carga exógena, e eliminada a carga endógena de agentes microbianos, aumentam as chances de estabelecimento dos explantes introduzidos no meio de cultivo *in vitro*.

No caso de plantas de grande porte, onde seu cultivo direto sob condições controladas é difícil, podem ser adotados métodos intermediários de propagação vegetativa antes da introdução do material *in vitro*. Estas técnicas têm por objetivo reduzir o porte do material a ser micropropagado para que este possa vir a receber o devido tratamento nutricional e fitossanitário.

Para as espécies arbóreas, a prática normalmente adotada consiste em induzir a produção de brotos rejuvenescidos através de podas drásticas da copa ou através do resgate e rejuvenescimento pela enxertia seriada. A primeira pode ser aplicada para espécies que apresentam boa capacidade de brotação, e a segunda para aquelas que não apresentam esta característica. Em ambos os casos, o porte do material a ser utilizado será reduzido, permitindo assim seu cultivo sob condições controladas.

Quanto à nutrição das matrizes, devem-se procurar formulações que venham a favorecer o crescimento e vigor vegetativo, mantendo-se adequadas as relações NPK de acordo com as características de cultivo de cada espécie e/ou cultivar. Uma planta adequadamente nutrida apresentará um melhor desempenho durante as etapas da micropropagação, em função de um melhor balanço hormonal endógeno.

### **Fase 1 - Seleção de explantes, desinfestação e estabelecimento *in vitro***

#### **Seleção de explantes**

Diversos tipos de explantes (desde uma célula até um órgão, como uma folha, uma flor ou um fruto) podem ser utilizados para iniciar a propagação *in vitro*. Na seleção dos explantes, devem ser considerados aspectos como o nível de diferenciação do tecido utilizado e a finalidade da micropropagação.

Gemas apicais tendem a apresentar maior capacidade de crescimento do que gemas axilares que estão sob efeito da dominância apical, fato comum em plantas herbáceas ornamentais e olerícolas. Em contrapartida, geralmente ocorre o contrário em espécies arbóreas. Normalmente, devido ao pequeno número de gemas apicais disponíveis ou a sua maior sensibilidade a desinfestação, é necessária a utilização de gemas axilares ou de outros tipos de meristemas, como os florais.

O maior nível de assepsia possível deve ser mantido durante a coleta, utilizando-se instrumentos limpos ou até esterilizados. O material vegetal coletado deve ser colocado em sacos plásticos, para evitar o dessecamento, devidamente identificados e imediatamente levados ao laboratório. Caso a coleta seja feita em locais distantes do laboratório, é importante que a integridade dos tecidos seja garantida, mantendo-os úmidos e à baixa temperatura. Podem-se manter os explantes em frascos tampados contendo água autoclavada ou soluções diluídas (0,05%) de hipoclorito de sódio.

O tamanho do explante depende do objetivo da micropropagação. Para eliminar microorganismos sistêmicos como vírus, bactérias ou micoplasmas, quanto menor o explante isolado, ou quanto mais isolado das regiões subjacentes vascularizadas, maior a chance de sucesso. Mesmo considerando microorganismos contaminantes superficiais, o fato de levar menos tecido para condições assépticas reduz a quantidade destes.

Por outro lado, o tamanho do explante também determina suas possibilidades de sobrevivência e capacidade de crescimento. Se o objetivo for simplesmente propagação, é mais adequado iniciar as culturas com ápices ou segmentos caulinares que contêm gemas axilares, pois, em geral, explantes muito pequenos não crescem ou demoram muito a fazê-lo.

Caso o objetivo seja obter plantas livres de doenças, deve-se procurar o tamanho do explante ideal que esteja livre do microorganismo e, ao mesmo tempo, consiga se estabelecer e crescer, depois de isolado.

Ápices e gemas laterais isolados de plântulas germinadas *in vitro*, embriões ou tecidos da semente são também utilizados como explantes iniciais de micropropagação. Entretanto, como um embrião ou plântula é resultado de recombinação gênica, constitui-se de um novo genótipo. Esse fato limita o emprego desta técnica em função da variabilidade dos genótipos e as diferenças entre os tecidos de uma plântula e de um meristema isolado de tecido menos juvenil. Contudo, a utilização deste tipo de explante apresenta vantagens do ponto de vista experimental, na determinação de um protocolo de micropropagação. A grande disponibilidade de explantes sem contaminação e a pronta capacidade de crescimento e resposta à aplicação de fitorreguladores dos tecidos juvenis permitem a condução de inúmeros testes.

### **Desinfestação**

A cultura de tecidos compreende um conjunto de técnicas que são realizadas sob rigorosa assepsia. Qualquer microorganismo que entrar em contato com

o meio de cultura terá condições de se desenvolver e, como consequência, inviabilizará a cultura. São determinantes os pré-tratamentos aplicados na planta-matriz para o sucesso desta etapa, principalmente no que se refere a microorganismos endógenos.

A contaminação em laboratórios de cultura de tecidos é dependente da espécie de planta a ser trabalhada, das condições ambientais locais, do treinamento dos técnicos e das medidas de assepsia seguidas na rotina laboratorial.

Os microorganismos estão presentes tanto nos propágulos, que serão utilizados para a retirada de explantes, como no ambiente onde a cultura será conduzida.

Várias substâncias com ação germicida são utilizadas para fazer a desinfestação dos explantes. Os mais comuns são o etanol e os compostos a base de cloro, como o hipoclorito de sódio e de cálcio. Outros agentes desinfestantes utilizados são cloreto de mercúrio, ácido clorídrico, o cloreto de benzalcônio, peróxido de hidrogênio (água oxigenada), nitrato de prata, formaldeído e óxido de etileno.

As concentrações das soluções desinfestantes, assim como as combinações dos princípios ativos desinfestantes e os tempos de exposição variam bastante. O etanol geralmente é utilizado a 70%, com tempo de exposição dos tecidos, em geral, variando de dezenas de segundos a alguns minutos. As concentrações mais comuns de cloro ativo vão de 0,5% a 2% com tempo de exposição de 10 a 20 minutos. O processo de desinfestação é realizado em câmara de fluxo laminar, utilizando vidraria previamente esterilizada.

Após a desinfestação, procede-se lavagens sucessivas com água destilada autoclavada, geralmente três, para remoção dos resíduos de cloro.

Também podem ser utilizados fungicidas e bactericidas durante a desinfestação ou incorporá-los ao meio de cultura de isolamento. Um dos fungicidas de mais ampla utilização foi o Benomyl, visto possuir amplo espectro de ação e ser pouco tóxico às culturas nas concentrações necessárias para controlar fungos. Entretanto, o fungicida Benlate® 500 teve seu ingrediente ativo (Benomyl) proibido no Brasil pelo Ministério da Saúde em 2003. Em função disso, produtos do grupo dos benzimidazóis, o mesmo do Benomyl, como Carbendazim, Thiabendazol, Thiofanato metílico podem ser empregados como substituto deste.

Os antibióticos são utilizados para controlar contaminações bacterianas endógenas. Depois de eliminados os microorganismos superficiais, os explantes podem ser transferidos para meio de cultura contendo antibiótico. Vários antibióticos são utilizados em cultura de tecidos, a exemplo de: cefatoxima, ampicilina, estreptomicina, rifampicina, kasugamicina, carbenicilina, cefalosporinas, neomicina, canamicina, cloranfenicol, tetraciclina, dentre outros. Dentre estes, alguns são mais e outros menos tóxicos aos tecidos vegetais.

Alternativa recente é o emprego do PPM (Plant Preservative Mixture). É um biocida de amplo espectro de ação em concentrações de 0,5 a 2 mL L<sup>-1</sup> combinado ou não com antibióticos com a metade de sua concentração. Pode ser usado para reduzir a contaminação de bactérias e fungos em cultura de tecidos de plantas, e em altas concentrações para reduzir contaminações endógenas.

#### **Estabelecimento *in vitro***

Nesta etapa, a manipulação do explante determina sua sobrevivência. O isolamento dos explantes deve ser realizado em câmara de fluxo laminar e com destreza para evitar, principalmente, a desidratação dos tecidos. Os instrumentos devem ser flambados após imersão em etanol absoluto e devem ser utilizados somente quando estiverem frios. Para evitar seu uso ainda quente, recomenda-se trabalhar um conjunto de instrumentos.

Um problema comum durante o isolamento de explantes é a oxidação de compostos fenólicos que são liberados pelas células danificadas com o corte. Este é particularmente mais intenso e sério no isolamento de explantes de espécies lenhosas.

A utilização de substâncias antioxidantes (ácido ascórbico, ácido cítrico, PVP) pode ser feita após a desinfestação, num último enxágüe demorado; fazendo o trabalho de isolamento de explantes em recipiente contendo a solução ou; adicionando-as ao meio de cultura, por esterilização a frio. O carvão ativado adicionado ao meio também é eficiente no controle da oxidação, pois escurece o meio e absorve compostos fenólicos presentes no ágar ou formados durante a oxidação dos compostos fenólicos. A transferência freqüente dos explantes é outra medida eficaz e fácil de ser adotada para reduzir os efeitos da oxidação.

Diversas formulações de meios de cultura têm sido utilizadas no início do cultivo. Não há formulação padrão, mas o meio de Murashige e Skoog (MS),

suas modificações e diluições têm apresentado resultados satisfatórios para diversas espécies. Entretanto, formulações especialmente desenvolvidas para espécies lenhosas têm sido empregadas. Pode ser interessante fazer um pré-condicionamento dos explantes, inoculando-os em meio nutritivo sem fitorreguladores.

Em caso de adição de fitorreguladores, as citocininas podem ser adicionadas em concentrações de 0,05 a 1 mg L<sup>-1</sup>. Auxinas e giberelinas são empregadas com menor frequência nesta etapa da micropropagação e em baixas concentrações. As auxinas podem ser empregadas em concentrações de 0,01 a 0,1 mg L<sup>-1</sup>.

### **Fase 2 - Multiplicação dos explantes mediante sucessivos subcultivos**

Nesta fase, o principal objetivo é produzir o maior número de plantas possível, no menor tempo. Não basta conseguir somente altas taxas de multiplicação em alguns explantes, e sim uma taxa média satisfatória com o mínimo de variação. A qualidade e homogeneidade das partes aéreas produzidas também são importantes, pois vai determinar o sucesso na fase de enraizamento.

Diversos meios são utilizados na fase de multiplicação. É muito comum a utilização da mesma composição básica no isolamento e na multiplicação. As variações mais frequentes dizem respeito à composição de macronutrientes, principalmente a fonte de nitrogênio utilizada e o balanço entre os íons nitrato e amônio.

As concentrações de citocininas para multiplicação estão entre 0,1 a 5,0 mg L<sup>-1</sup>. A definição do tipo e da concentração ótima de citocinina para a multiplicação constitui-se em passo importante. O excesso de citocinina no meio de cultura é tóxico, causando entufamento e falta de alongamento das culturas, encurtamento dos entrenós e vitrificação, levando a sérios problemas na fase de enraizamento.

Embora nem sempre sejam necessárias no meio de multiplicação, as auxinas são utilizadas para estimular o crescimento das partes aéreas. As concentrações de auxina são baixas se comparadas com as das citocininas para manter um balanço auxina/citocinina menor que 1. Normalmente são adicionadas concentrações menores do que 0,5 mg L<sup>-1</sup>.

O período de incubação mais comum entre repicagens é de quatro semanas, entretanto, este é muito variável entre espécies.

A taxa de proliferação das brotações nem sempre permanece constante por períodos longos. Uma variação nesta taxa é comum em culturas de brotações de plantas lenhosas, onde a taxa de multiplicação é tipicamente baixa durante

as primeiras passagens, porém aumenta à medida que o material cultivado torna-se rejuvenescido. Às vezes, a taxa de multiplicação sobe até um máximo e então diminui em subculturas sucessivas.

Em algumas espécies, o decréscimo na taxa de propagação após vários subcultivos pode exigir a eliminação da citocinina do meio por uma ou duas passagens, a redução na concentração usada ou ainda a substituição do BAP por outro composto, tal como a cinetina.

Na cultura de tecidos de algumas espécies, foi constatado que as mesmas tornam-se habituadas à citocinina. Isto resulta em multiplicação excessiva de brotos em meios livres desse hormônio, porém os brotos produzidos são pequenos e dão origem a poucas raízes adventícias de modo que as plantas são difíceis de se estabelecerem "ex vitro".

As giberelinas, especialmente o GA<sub>3</sub> são usadas eventualmente na fase de multiplicação. O efeito mais conhecido deste fitoregulador, o alongamento de partes aéreas, é explorado *in vitro* quando estas não estão em condições de serem individualizadas para o enraizamento, devido ao seu tamanho. Entretanto, nesta fase, geralmente não se consegue estimular uma resposta uniforme de alongamento em todas as partes aéreas.

Além do aspecto de eficiência, a fase de alongamento é antieconômica por demandar mão-de-obra adicional que não resulta em multiplicação, e sim, num simples ajuste das culturas. Neste sentido, deve-se buscar a otimização do balanço entre auxinas e citocininas para a indução de partes aéreas alongadas e adequadas para o processo de enraizamento. Em geral, em espécies herbáceas, concomitante com a multiplicação, ocorre o alongamento. Contudo, em espécies lenhosas, normalmente o cultivo de explantes em meio de cultura para alongamento pode ser necessário.

As condições de cultura utilizadas nesta fase são, de maneira geral, semelhantes às fornecidas na fase inicial da cultura *in vitro*.

Esta etapa caracteriza-se pela formação de raízes adventícias nas partes aéreas provenientes da multiplicação. O enraizamento de espécies herbáceas é geralmente mais fácil do que lenhosas e quanto mais juvenil for o material vegetal. Partes aéreas pequenas não enraízam bem e necessitam de uma fase intermediária de alongamento.

O enraizamento pode ser realizado tanto *in vitro* quanto *ex vitro*. No caso de enraizamento *in vitro*, as raízes são induzidas em meio de cultura, sob condições de laboratório, e as plantas transplantadas para substrato em casa-

de-vegetação. Quando o enraizamento ocorre *ex vitro*, as partes aéreas são manipuladas como microestacas e todo o processo se dá em substrato. A opção por um dos sistemas depende da qualidade das partes aéreas obtidas na multiplicação, da espécie, do genótipo e da infra-estrutura adequada. De maneira geral, o enraizamento *ex vitro* é mais eficiente, proporcionando a formação de sistema radicular melhor formado, e mais prático e econômico do que o enraizamento *in vitro*.

As auxinas (ANA, AIB e AIA) são utilizadas geralmente em concentrações da ordem de 0,1 a 1 mg L<sup>-1</sup> para enraizamento *in vitro*, enquanto que para a indução do enraizamento *ex vitro* são utilizadas concentrações de 1.000 a 6.000 mg L<sup>-1</sup> de AIB. Dependendo do grau de juvenildade do material, não há necessidade de tratamento com fitorregulador.

### **Fase 3 - Aclimatização**

A aclimatização ou aclimatação é um dos processos indispensáveis para a obtenção de uma planta micropropagada. Consiste num conjunto de técnicas que visa adaptar as plantas a um meio ambiente muito diferente daquele onde ela foi formada, no interior de um recipiente, onde são criadas condições ambientais peculiares no que se refere ao substrato composto do ar e água, luminosidade, entre outros. É uma fase intermediária de adaptação à qual a planta é submetida para, posteriormente, passar às fases de desenvolvimento no campo.

A regra para se aumentar a taxa de crescimento e/ou evitar danos ou morte às plântulas durante a aclimatização é aquela em que as condições de propagação devem ser lentamente aproximadas das condições onde as plantas serão aclimatadas (casa de vegetação). Pré-tratamentos de redução de umidade relativa nos recipientes de cultura, como a retirada das tampas ainda na sala de incubação, podem ser aplicados para aumentar a sobrevivência durante a aclimatização. Outras técnicas de pré-adaptação são a redução ou eliminação da fonte de açúcar do meio de enraizamento e aumentar a concentração de CO<sub>2</sub> e a intensidade luminosa no ambiente de incubação.

Na aclimatização, o principal meio de controle ambiental nos estágios de aclimatização é conseguido com elevação da umidade relativa do ar (UR), em particular, no início do processo. A elevada UR é geralmente conseguida pela cobertura com filme plástico sob sombrite, juntamente com nebulização freqüente.

### 2.2.5.3 Meios de cultura

#### **Preparo**

O meio da cultura deve suprir tecidos e órgãos cultivados *in vitro* com nutrientes necessários ao crescimento. Basicamente, o meio da cultura fornece macro e micronutrientes e um carboidrato (normalmente a sacarose) para substituir o carbono que a planta normalmente fixa da atmosfera pela fotossíntese. Para proporcionar um crescimento maior, normalmente incluem-se certos componentes orgânicos como vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento. Diversos outros produtos, a exemplo de sucos de frutas, leite de coco, extratos de leveduras e proteínas hidrolisadas, também podem ser usados.

Os meios de cultura são então preparados a partir de um ou todos os seguintes componentes:

#### **- Água**

É o componente utilizado em maior quantidade na preparação de meios de cultura. Por ser uma fonte potencial de impurezas que podem afetar o crescimento dos explantes, convém que sejam tomados cuidados quanto à origem da água a ser utilizada. É praticamente obrigatório o uso de água destilada ou bidestilada e deionizada ou filtrada.

#### **- Macronutrientes**

Os macronutrientes são fornecidos ao meio de cultura na forma de sais. Os macronutrientes utilizados nos meios de cultura são: nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, enxofre e cálcio.

#### **- Micronutrientes**

Os micronutrientes utilizados nos meios de cultura são: manganês, zinco, boro, cobre, molibdênio, cobalto, iodo, ferro, cloro e sódio.

#### **- Suplementos orgânicos**

O crescimento e morfogênese na cultura de tecidos podem ser aumentados por pequenas quantidades de alguns nutrientes orgânicos, entre os quais vitaminas (tiamina, ácido nicotínico, piridoxina, ácido pantotênico, ácido ascórbico, e mio-inositol), aminoácidos (glicina, caseína hidrolisada) e certos suplementos indefinidos (extrato de malte e de levedura; sucos, polpas e extratos de vários frutos, a exemplo de banana e tomate; leite ou água de coco).

**- Reguladores de crescimento**

Os reguladores de crescimento são componentes muito importantes dos meios de cultura. Sua utilização e os teores de cada regulador variarão conforme a espécie a ser cultivada *in vitro*, o tipo de explante e os objetivos de cada etapa da cultura.

Os principais grupos de hormônios vegetais (e reguladores de crescimento) são:

a) Auxinas

- AIA (ácido 3-indol acético)
- 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxi acético)
- AIB (ácido indolbutírico)
- ANA (ácido naftaleno-acético)
- Picloram (ácido-4-amino-3,5,6-tricloropicolínico)

b) Citocininas

- BAP (6-Benzilaminopurina = 6 Benzilamina)
- cinetina
- zeatina
- 2iP (2- isopenteniladenina)
- Thidiazuron (TDZ) (uma feniluréia)
- Dihidrozeatina (6-(4-hidroxi-3-metil-*trans*-2-butenil) aminopurina)

c) Giberelinas

- O ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e uma mistura de GA<sub>4</sub> e GA<sub>7</sub> são as giberelinas comercialmente disponíveis.

d) Etileno

e) Ácido abscísico

**- Açúcares**

Praticamente todas as células, tecidos e órgãos cultivados “*in vitro*” são heterotróficas e dependem de uma fonte externa de energia. Portanto, torna-se necessário incorporar ao meio de cultura uma fonte de carbono.

A fonte mais comumente utilizada é a sacarose. Outras fontes também têm sido utilizadas, tais como a maltose, rafinose, frutose, manose, galactose e lactose.

#### - Agentes geleificantes e suportes

Explantos muito pequenos, tais como meristemas, só sobrevivem em meio líquido se colocados sobre suportes de papel-filtro, também chamados suportes ou pontes de Heller. Além do papel-filtro, outros materiais porosos podem ser usados com a mesma finalidade.

O agente solidificante mais comumente utilizado é o ágar, um polissacarídeo extraído de algas marinhas. Gomas produzidas por bactérias, como “Gelrite” e o “Gel-Gro” têm dado bons resultados.

#### - Antibióticos e fungicidas

O uso de antibióticos e fungicidas justifica-se quanto há contaminação microbiana, proveniente de infecções sistêmicas das plantas matrizes. No entanto, o uso destas substâncias não deve substituir totalmente as técnicas de assepsia do explante no momento do estabelecimento *in vitro*. Vários são os antibióticos e fungicidas adicionados aos meios de cultura.

#### - Antioxidantes

Há espécies cujo estabelecimento e crescimento *in vitro* é dificultado ou limitado pela liberação de exsudatos derivados da oxidação de compostos fenólicos. O uso de antioxidantes é uma das alternativas para contornar este problema. Os principais antioxidantes acrescidos ao meio de cultura são o ácido cítrico, ácido ascórbico, PVP (polivinilpirrolidona), glutatona, cisteína, ditioneitol e rosmanol.

#### - Carvão ativado

O carvão ativado finamente moído é freqüentemente adicionado no meio em diferentes estágios da cultura de tecidos. Sua adição aos meios de cultura proporciona as seguintes vantagens: adsorve compostos exsudados dos tecidos cultivados ou presentes no ágar; evita o excesso de crescimento de calos; promove a morfogênese, particularmente a embriogênese e; promove a formação de raízes, provavelmente devido à sua capacidade em excluir a luz do meio de cultura.

#### 2.2.5.4 Laboratório de cultura de tecidos vegetais

##### **ESTRUTURA FÍSICA**

A montagem e organização de um laboratório de cultura de tecidos dependem dos objetivos a que se propõe. Um laboratório com fins comerciais, destinados exclusivamente a micropropagação com base em protocolos estabelecidos, tende a ser maior, porém, mais simples em instalações e equipamentos, que um laboratório destinado à pesquisa.

Apesar da área total necessária ser relativamente pequena, o laboratório necessita um considerável investimento em equipamentos e materiais. Inicialmente, deve-se ter idéia do movimento de pessoas e de material vegetal entre as diferentes áreas, para que as portas sejam corretamente posicionadas. As dependências do laboratório devem estar num mesmo nível, de fácil acesso, e bem distribuídas, facilitando o deslocamento de pessoas e materiais.

Normalmente, um laboratório de cultura de tecidos possui uma estrutura padrão, com algumas variações:

##### **Sala de preparo de meio de cultura e dos explantes**

Esta sala é denominada de “área suja do laboratório”. Nela, são dispostos equipamentos como *freezer*, geladeira, chapa aquecedora, destilador ou deionizador, balança analítica de precisão, potenciômetro ou pHmetro, agitador magnético, forno de microondas e dispensador de meio, além dos reagentes. A vidraria usada no preparo dos meios de cultura deve estar disponível, assim como tubos e frascos com respectivas tampas, para receber o meio quando pronto. Deve conter bancadas para o preparo dos meios e para manter os equipamentos, estantes, armários para guardar produtos químicos, vidraria, instrumentos, etc.

##### **Sala de lavagem e esterilização**

Destinada à esterilização do meio de cultura e outros materiais e à lavagem de vidraria. Nela são alocados equipamentos como autoclave e estufas para esterilização a seco. Pias grandes devem ser colocadas para facilitar a lavagem de vidraria, preferencialmente com água quente.

##### **Sala de isolamento e transferência**

Nesta área, realizam-se os trabalhos de excisão, inoculação e transferência dos explantes para os meios de cultura. Estas atividades necessitam ser efetuadas em superfície estéril e dentro de um ambiente sem risco dos

explantes serem reinfectedos e dos contaminantes entrarem no frasco de cultura. Portanto, nesta sala, a assepsia total é imprescindível. Piso e paredes devem facilitar a limpeza. Alguns laboratórios mantêm luzes germicidas (ultravioletas) ligadas quando a câmara não está em uso.

O método mais efetivo para evitar contaminações é o uso de câmaras de fluxo laminar, que promovem, com auxílio de um motor, a passagem de ar através de pré-filtros de alta eficiência. O ar, que chega à superfície de trabalho da câmara é, portanto, estéril.

### **Sala de crescimento**

Neste ambiente, com condições controladas, desenvolvem-se as culturas *in vitro*. Uma luminância de 1.000 a 5.000 lux é usualmente adequada. Uma irradiância de  $12 \text{ mmol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$  (equivalente a aproximadamente 1.000 lux) é desejável para o estabelecimento e crescimento inicial de culturas de gemas e meristemas de muitas plantas. Porém, brotações e plântulas geralmente necessitam de 3.000 lux antes da transferência para a casa de vegetação. O fotoperíodo é regulado por 'timers' e normalmente é de 16 horas por dia.

A temperatura é controlada por aparelhos de ar condicionado ligados a termostatos, que mantêm a temperatura constante, com variação de  $\pm 1$  a  $2^\circ\text{C}$ . Normalmente, utilizam-se temperaturas ao redor de  $25^\circ\text{C}$ .

### **Área de aclimatização**

As plântulas, após serem removidas dos frascos e ou tubos de ensaio, são lavadas para remover os restos de meio de cultura, sofrem uma toailete no sistema radicular e são transferidas para bandejas de isopor, contendo um substrato, as quais são levadas para a casa de vegetação com sistemas de nebulização, controle de temperatura e luminosidade.

### **EQUIPAMENTOS ESSENCIAIS**

Os equipamentos normalmente utilizados em um laboratório e suas respectivas finalidades são:

- Autoclave - esterilização de meio de cultura, vidraria e outros materiais.
- Geladeira e *Freezer* - preservação de produtos químicos, soluções-estoque, material vegetal, etc.
- Estufa incubadora tipo B.O.D - trabalhos com variação de temperatura e/ou fotoperíodo.

- Câmara de fluxo laminar - inoculação de explantes sob condição plenamente asséptica.
- Destilador e deionizador de água - água para o meio de cultura.
- Potenciômetro ou pHmetro - medir pH de meios de cultura.
- Chapa aquecedora ou forno de microondas - derreter o ágar.
- Mesa agitadora - agitação de meios líquidos.
- Balança de precisão - pesar reagentes.
- Balança analítica - pesar reagentes.
- Banho maria - manter os meios líquidos para incorporação de produtos esterilizados a frio.
- Lavador de pipetas.
- Agitadores magnéticos - preparo de soluções.
- Microscópio estereoscópico - retirada de meristemas.
- Aparelhos de ar condicionado - manter a temperatura.
- *Timers* - controle de fotoperíodo.
- Carrinho - transportar material de laboratório, culturas e meios.
- Estabilizador de voltagem - evitar danos aos equipamentos.
- Equipamento para filtragem a frio - esterilização de produtos termolábeis.
- Bomba de vácuo - aumentar a eficiência da assepsia.
- Dispensador de meio - verter meios para tubos ou frascos.
- Estufa - esterilização e secagem de vidrarias e materiais

### **INSTRUMENTOS**

Os instrumentos a serem adquiridos para um laboratório de cultura de tecidos, bem como a sua quantidade, dependem da finalidade e do tamanho do laboratório. Porém, de modo geral, os instrumentos de maior importância são:

- Pinças
- Bisturis
- Estiletes
- Lâminas para bisturi

- Tesouras
- Bandejas
- Suportes para tubos de ensaio
- Suportes para placas de Petri
- Espátulas
- Lamparinas

### **VIDRARIA**

A vidraria e sua quantidade também variam conforme o laboratório, sendo as principais:

- Balões volumétricos 1.000, 100, 200 e 500 ml
- Erlenmeyers 100, 200 e 500 ml
- Placas de petri
- Tubos de ensaio
- Frascos de 200 ml
- Provetas 1.000, 500, 250 e 100 ml
- Pipetas 1, 2, 5, 10 e 20 ml
- Funis

### **OUTROS MATERIAIS**

São ainda necessários ao laboratório outros materiais, tais como: tampas plásticas para tubos de ensaio e frascos, algodão hidrófilo, gaze, fita crepe, detergentes, desinfetantes, escovas para lavagem da vidraria, máscaras, luvas, plásticos para vedação dos tubos (vitafilm, parafilme), papel de filtro, lâmpadas incandescentes, fluorescentes e ultravioleta, recipientes para água destilada, papel toalha, papel alumínio, etiquetas adesivas, canetas, entre outros.

### 3 LITERATURA COMPLEMENTAR

ALVARENGA, L. R.; CARVALHO, V. D. Uso de substâncias promotoras de enraizamento de estacas frutíferas. Informe Agropecuário, v. 9, n. 101, p. 47-55, 1983.

BROWSE, P. M. **A propagação das plantas**. Lisboa: Europa-América, 1979. 229 p.

CARNEIRO, J. G. A. **Produção e controle de qualidade de mudas florestais**. Curitiba: UFPR: FUPEF, 1995. 451 p.

CÉSAR., H. P. **Manual prático do enxertador e criador de mudas de árvores frutíferas e dos arbustos ornamentais**. 7. ed. São Paulo: Nobel, 1975. 158 p.

DAVIDE, A. C. **Propagação de espécies florestais**. Belo Horizonte: CEMIG, 1995. 40 p.

DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation: technology and application**. London: Kluwer Academic, 1993. 484 p.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2<sup>nd</sup> ed. Edington: Exegetics, 1996. v. 1, 574 p. Part 1 - The technology.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2<sup>nd</sup> ed. Edington: Exegetics, 1996. v. 2, 786 p. Part 2 - In practice.

GONÇALVES, J. L. M.; POGGIANI, F. Substratos para produção de mudas florestais. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DO SOLO, 13., 1996, Águas de Lindóia. [Anais...]. São Paulo: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo: Sociedade Latino Americana de Ciência do Solo, 1996. 1 CD-ROM.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: ABCTP; EMBRAPA-CNPQ, 1998. p. 183-260.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 6<sup>th</sup>. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. 770 p.

HILL, L. **Segredos da propagação de plantas**. São Paulo: New Barkeville, 1996. 234 p.

LOPES, L. C.; BARBOSA, J. G. **Propagação de plantas ornamentais**. Viçosa: UFV, 1988. 30 p. (UFV. Boletim, 267).

PÁDUA, T. Propagação de árvores frutíferas. **Informe Agropecuário**, v. 9, n. 101, p. 11-19, 1983.

PAIVA, H. N.; GOMES, J. M. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Viçosa: UFV, 1995. 40 p. (UFV. Boletim, 322).

PASQUAL, M. **Meios de cultura**. Lavras: UFLA: FAEPE, 2001. 74 p.

PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; DUTRA, L. F. **Aplicações no melhoramento genético de plantas**. Lavras: UFLA: 2001. 79 p.

PIERIK, R. L. M. Handicaps for the large scale commercial application of micropropagation. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 230, p. 63-71, 1988.

PRADO, N. J. S.; FARIA, J. M. R.; DAVIDE, A. C.; FONSECA, E. M. B.; ROLIM, A. B. **Viveiro florestal: implantação e técnicas de produção de mudas**. Belo Horizonte: CEMIG, 1996. 24 p.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.) **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academics, 1991. p. 71-93.

ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales. In: \_\_\_\_\_. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. p. 1-17.

SIMÃO, S. **Manual de fruticultura**. São Paulo: Agronômica CERES, 1971. 530 p.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G. de; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRIGIDO, M. de M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2000. 128 p.

TORRES, K. C. **Tissue culture techniques for horticultural crops**. New York: Chapman & Hall, 1989. 285 p.

VASIL, I. K.; THORPE, T. A. (Ed.). **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. 593 p.

WENDLING, I.; GATTO, A.; PAIVA, H. N.; GONCALVES, W. **Planejamento e instalação de viveiros**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2001. 120 p. (Coleção jardinagem e paisagismo, 1; Série produção de mudas ornamentais).

|

## **ANEXO**



## GLOSSÁRIO DE TERMOS TÉCNICOS

**ABA (Ácido abscísico)** – hormônio vegetal envolvido na inibição do crescimento da parte aérea, dentre outros efeitos.

**Ágar** - polissacarídeo extraído de algas marinhas. É utilizado como agente geleificante em cultura de tecidos de plantas.

**Água deionizada** – água purificada de baixa condutividade, cujos cátions e ânions foram removidos, por meio de sua passagem por uma resina de troca iônica.

**Água destilada** – água purificada pelo processo de destilação, onde é aquecida e seu vapor condensado em uma coluna de destilação.

**Auxinas** – indutores de raiz (AIA - ácido indolil-acético, AIB - Ácido Indol butírico, ANA - Ácido naftaleno acético, 2,4-D (diclorofenoxiacético); Picloram, Dicamba, etc.

**Biorreator** – Recipiente onde ocorre uma reação biológica, em geral, fermentação ou biotransformação.

**Calo** – grupo ou massa de células com crescimento desordenado, as quais podem apresentar certo grau de diferenciação.

**Citocininas** – indutores de gemas (BAP-Benzil amino purina ou BA- Benzil adenina, Cinetina, Zeatina, 2IP – 2 isopentil adenina, TDZ – Thiaduzuron)

**Desinfestação** – eliminação de microorganismos superficiais em um explante, utilizando-se soluções desinfestantes.

**Etileno** – Hormônio envolvido na senescência e abscisão foliar e na maturação e amadurecimento de frutos.

**Ex vitro** – ‘fora do vidro’. Termo utilizado para contrastar com processos efetuados *in vitro*.

**Explante** – segmento vegetal utilizado para início da micropropagação

**Fitohormônio ou hormônio vegetal** – substância orgânica produzida pela planta, de baixa massa molecular que, em pequenas concentrações, promove, inibe ou modifica processos fisiológicos, geralmente em locais diferentes daquele onde foi produzida.

**Fitorreguladores ou reguladores de crescimento** – substâncias sintéticas, não produzidas naturalmente que, quando aplicadas à planta em quantidades diminutas, estimulam, inibem ou modificam o crescimento ou o desenvolvimento (efeitos semelhantes aos dos fitohormônios).

**Giberelinas** - promovem o alongamento das gemas (GA3 – ácido giberélico)

***In vitro*** – dentro do vidro

**Organogênese** – geração de órgãos

**Ploidia** – tamanho do genoma

**Recalcitrantes** – 1) Genótipo de difícil regeneração ou transformação *in vitro*; 2) Semente intolerante à dessecação e ao armazenamento a baixas temperaturas, geralmente, com baixa longevidade e; 3) Refere-se a materiais não biodegradáveis no solo.

**Regeneração** – em cultura de tecidos de plantas, significa uma resposta morfo genética de um explante a um estímulo, que resulta na formação de parte aérea, embrião, propágulo ou planta.

**Repicagem** – transferência de material vegetal em cultivo, sem subdividi-lo, para um novo meio nutritivo.

**Subcultivo** – cultura de tecido constituído na subdivisão de material já estabelecido *in vitro*, sua transferência para novo meio nutritivo.

**Varição somaclonal** – variação espontânea de plantas regeneradas de cultura de células ou tecidos *in vitro*.