

ACLIMATAÇÃO DE PLANTAS PROVENIENTES DA CULTURA *IN VITRO*¹

ANTONIO TADEU DA SILVA², MOACIR PASQUAL³, JORGE SUSUMO ISHIDA⁴
e LUÍS EDUARDO CORRÊA ANTUNES⁵

RESUMO - Objetivou-se estudar o efeito das idades das raízes emergidas *in vitro*, substratos e espécie na capacidade de aclimação após sair da cultura de tecidos para casa de vegetação. Utilizaram-se as espécies pau-santo (*Kielmeyera coreacea*), mandioca (*Manihot esculenta*), batata-doce (*Ipomoea batatas*) e amora-preta (*Rubus idaeus*), em três idades: 0-3, 7-10 e 15-18 dias após o enraizamento, e quatro substratos: mistura de subsolo (latossolo roxo - textura muito argilosa) + areia + esterco de curral (1:1:2); compostagem orgânica; composto orgânico comercial e vermiculita em flocos médios. A resposta das plantas foi avaliada através de três parâmetros: sobrevivência, número de folhas e área foliar. Com relação ao primeiro parâmetro, o maior índice de sobrevivência está ligado à espécie, não sofrendo influência de nenhum dos substratos nem da idade de enraizamento, porém, após sete dias de enraizamento *in vitro* as plântulas mostraram maior tolerância a aclimação, que é uma característica própria de cada espécie. O número de folhas mostrou diferenças apenas para o fator espécies. As respostas relativas à área foliar foram lineares em todas as espécies até os 35 dias após o transplante. A espécie *Manihot esculenta* foi a que apresentou maior crescimento da área foliar, embora mostrando maiores dificuldades para aclimatar-se.

Termos para indexação: cultura de tecidos, enraizamento, pau-santo, batata-doce, amora-preta.

ACCLIMATIZATION OF PLANTS PRODUCED BY IN-VITRO CULTURE

ABSTRACT - The purpose of the presente work was to study the effects of age of *in-vitro* rooting, substrate, and species, on the acclimatization of plants grow from explants under tissue culture conditions in green-house. The species used were *Kielmeyera coreacea*, *Manihot esculenta*, *Ipomoea batatas* and *Rubus idaeus*, at three ages: 0-3, 7-10 and 15-18 days after rooting, and four substrates: a) soil (purple latosol - of high argillaceous texture) + sand + (1:1:2); b) organic compost; c) commercial organic compost and d) vermiculite. The best surviving index is related to species, and it is not affected by substrate or by age of rooting, but seven days after *in-vitro* rooting the plantlets showed better tolerance to acclimatization, which is a characteristic of each species. The leaf number showed linear response to all species until 35 days after the beginning of the experiment. *Manihot esculenta* showed the best leaf area growth, in spite of exhibiting difficulties for acclimatization.

Index terms: tissue culture, rooting, *Kielmeyera coreacea*, *Manihot esculenta*, *Ipomoea batatas*, *Rubus idaeus*.

INTRODUÇÃO

A aclimação é o processo pelo qual as plantas produzidas em condições controladas são transferidas para um ambiente com as condições climáticas naturais; estas novas condições devem ser passadas às plantas progressivamente, de forma que elas não sofram estresses que possam culminar em danos profundos ou mesmo em sua morte.

¹ Aceito para publicação em 17 de outubro de 1994.

² Eng. Agr., M.Sc., Dep. de Agric., ESAL.

³ Eng. Agr., Dr., Prof. Titular, Esc. Sup. de Agric. de Lavras (ESAL), Caixa Postal 37, CEP 37200-000 Lavras, MG. Bolsista do CNPq.

⁴ Em curso de Agron. na ESAL. Bolsista do CNPq.

⁵ Pós Graduando/Fitot. - ESAL - Bolsista do CNPq.

Há dados segundo os quais o crescimento em extensão é mais sensível, e quando as plantas sofrem um estresse ou enfrentam condições adversas, surge um desequilíbrio no mecanismo estomático, podendo imediatamente apresentar o déficit hídrico nas células das regiões mais tenras. Segundo Sutter & Hutzell (1984), a remoção das plântulas das condições *in vitro* provoca um estresse crítico, sendo então necessário manter a umidade alta e a temperatura amena.

Brainerd & Fuchigami (1981) relatam a necessidade da aclimação das plantas provenientes da cultura *in vitro*, por que estas são sensíveis e tenras, pois não desenvolvem a cutícula, resultando em alta evapotranspiração, e sua parede celular não apresenta rigidez suficiente para a sustentação; as folhas são delgadas e suaves, fotossinteticamente inativas, deixando a planta em franco heterotrofismo; os estômatos não operam eficientemente, provocando, assim, estresses nas primeiras horas após sair dos tubos de ensaio.

Para maior sucesso da aclimação, recomenda-se iniciar com uma pré-aclimação em locais à meia-sombra, onde alguns fatores da camada atmosférica possam ser passados para as plantas lentamente. Esta pré-aclimação pode estender-se por até meses, quando se comprovar a capacidade das plantinhas de sobreviverem no referido ambiente (Arruda & Reis, 1965; Thomaziello & Oliveira, 1977). O esclarecimento definitivo sobre como e quais os fatores morfo-fisiológicos ou bioquímicos exercem influências na regulação dos mecanismos de tolerância aos estresses, provocando mudanças de ambiente para as plântulas produzidas *in vitro*, contribuirá para melhor aplicação tecnológica em maior gama de espécies.

O objetivo do presente trabalho foi verificar se há diferenças entre as idades das raízes emergidas *in vitro*, e se há influência do substrato e entre espécies, na sobrevivência e crescimento de plantas provenientes da cultura de tecidos, após pré-aclimação.

MATERIAL E MÉTODOS

As plântulas foram obtidas através do micro-cultivo *in vitro* em meio de cultura modificado "MS" (Murashige &

Skog, 1962). Após a emergência das raízes nos explantes (caule com uma gema axilar) de cada tubo, estabeleceram-se as idades de enraizamento. Houve uma pré-aclimação por um período de 48 horas, com as plântulas dentro dos tubos destampados, ainda com meio de cultura, em sala arejada e sombreada, temperatura ambiente de 20 a 22°C.

Posteriormente, foi instalado o experimento, com os seguintes tratamentos: substratos: 1) solo (latossolo roxo - textura muito argilosa) + areia + esterco (1:1:2); 2) compostagem orgânica (Gomes & Pacheco, 1988); 3) composto orgânico comercial e 4) vermiculita em flocos médios; idade de enraizamento: após a emergência das raízes, foram estabelecidos os tratamentos para idade em 0-3 dias como idade 1; 7-10 dias como idade 2 e 15-18 dias como idade 3; Espécies: as espécies foram classificadas pelo grau de facilidade de aclimatar-se nas condições de casa de vegetação: Amora-preta (*Rubus idaeus*), por ser rústica e de fácil aclimação, recebeu nota A; batata-doce (*Ipomoea batatas*), herbácea, também rústica e de ótima aclimação, recebeu nota A; Mandioca (*Manihot esculenta* cv. mantiqueira), com média facilidade, nota B; pau-santo (*Kielmeyera coreacea*), considerado problemático, por sobreviver nos cerrados, e de difícil aclimação, nota C.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (primeiro experimento), em fatorial de (4)2 x 3 com três repetições, num total de 48 tratamentos, com 144 unidades, sendo a parcela constituída de três vasos (100 ml) com uma planta em cada, somando 432 plantas no total.

Após a pré-aclimação, as plântulas foram transplantadas para vasos (100 ml) com os respectivos substratos e removidas para casa de vegetação. As avaliações foram efetuadas 28 dias após o transplantio, considerando a percentagem de sobrevivência, cujos dados foram transformados em $\arcsin \sqrt{\%}$.

As plântulas pré-aclimatadas foram retiradas dos tubos, lavadas em água corrente, e transplantadas em substrato orgânico (Gomes & Pacheco, 1988) e levadas imediatamente para casa de vegetação à meia sombra, com nebulização intermitente e ventilação forçada.

A avaliação foi feita através do percentual de plantas sobreviventes, número de folhas (NF) e área foliar (AF). O número de folhas foi tomado por contagem de todas as plantas da parcela e da qual extraiu-se a média (NFT/3); o mesmo aconteceu quanto à área foliar: para que pudesse ser estimada, foram medidas as maiores dimensões e calculou-se o produto (l x c), conforme o método de Barros et al. (1973). Utilizou-se um fator de correção, calculado pela média de dez folhas de cada espécie, passando no integrador eletrônico, para determinar a constante (K=área concentrada/área calculada). Com o uso da fórmula $AF = AC \times K$, onde AC = área calculada e K = constante, encontrou-se a área foliar de cada parcela: para a mandioca,

$K = 0,545$; para a batata-doce, $K = 0,686$; e para amora-preta, $K = 0,956$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise estatística demonstrou significância apenas quanto a espécies, idade de enraizamento e interação entre estes dois fatores. O desdobramento desta interação, considerando-se a idade de enraizamento dentro de espécies, revelou efeito significativo em todas as espécies, à exceção de "pau-santo".

Pela Fig. 1, verifica-se que até a idade três (15-18 dias) de enraizamento, a resposta para a sobrevivência foi linear crescente, mostrando, assim, que este fator é extremamente importante, pois as espécies pau-santo, mandioca e batata-doce, que conseguiram sobreviver, mostraram o mesmo comportamento perante a idade de enraizamento. Verificou-se que a partir da idade dois (7-10 dias), as plântulas das espécies fáceis de se aclimatarem mostraram maior índice de sobrevivência.

A Tabela 1 apresenta as médias dos dados não transformados do percentual de plantas sobreviventes por espécie em cada idade. A análise estatística revelou diferenças entre as espécies, quanto à capacidade de sobrevivência em casa de vegetação.

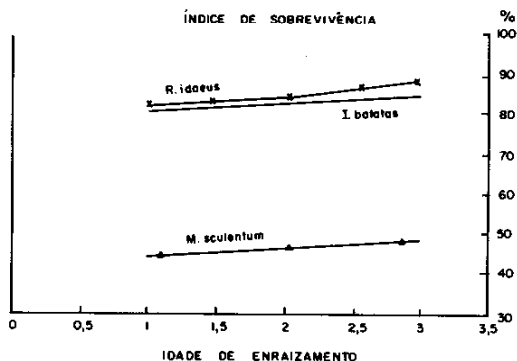


FIG 1. Comportamento do índice de sobrevivência das espécies aclimatadas, e curvas de regressão em função da idade do enraizamento *in vitro*, em dias após a emergência das raízes.

TABELA 1. Valores médios de sobrevivência das espécies aclimatadas em casa de vegetação.

Espécies/idade	I	II	III
Pau-santo	0,5 C	1,2 C	0,8 C
Mandioca	48,5 B	52,1 B	56,0 B
Batata-doce	97,3 A	98,0 A	99,2 A
Amora-preta	96,2 A	98,3 A	99,6 A

DMS = 6,669

As médias seguidas da mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Nota-se que as espécies batata-doce e amora-preta não diferiram, tendo ótima capacidade de aclimação mesmo a partir da primeira idade, enquanto que a mandioca ficou bem abaixo da média, embora seu comportamento também tenha sido linear (Fig. 1).

Quanto ao pau-santo, sua baixa percentagem de sobrevivência observada demonstra que o sistema adotado foi totalmente ineficiente, pois todas as plantas que não suportaram o estresse da aclimação tiveram morte rápida, não chegando nem a apresentar os sintomas de deficiência hídrica, relatados por diversos autores. O insucesso com o pau-santo pode estar relacionado com as observações de Brainerd & Fuchigami (1981), que relatam a deficiência de cera epicuticular nas folhas e elevado volume de espaços intercelulares no mesófilo e outras partes e pequena resposta estomática nas plântulas produzidas no cultivo *in vitro*.

Observa-se que ocorreram significativas diferenças no NF quanto aos fatores espécies e idade de enraizamento. A época de coleta não apresentou efeito no NF.

A Fig. 2 expressa a resposta linear da idade de enraizamento dos explantes *in vitro*. Verifica-se que ao sair dos tubos as plântulas estavam em pleno desenvolvimento, não apresentando estagnação de crescimento, fato este que é comum nas plântulas, quando ainda no interior dos tubos. Também, por estes dados, pode-se verificar que com o enraizamento dos explantes ocorre aumento de crescimento das plântulas, e, portanto, deve-se considerar a idade de enraizamento dos explantes ao se fazer a remoção das plântulas para a pré-aclimação; conseqüentemente, plântulas com maior idade terão melhor resposta, pois o NF sofreu ajuste linear.

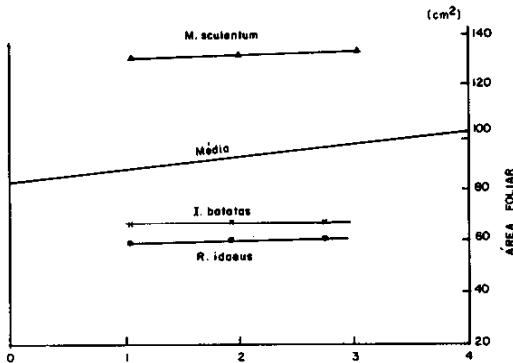


FIG. 2. Comportamento do crescimento da área foliar nas espécies aclimatadas, e curvas de regressão em função da idade do enraizamento *in vitro*, em dias após a emergência das raízes.

Na Tabela 2, nota-se que as espécies apresentaram diferenças quanto ao NF, e que a mandioca apresentou menos folhas que a batata-doce e amora-preta, as quais, por sua vez, não diferiram entre si. Essa similaridade apresentada entre as duas espécies ocorreu também quanto ao índice de sobrevivência e o grau de aclimação. As espécies batata-doce e amora-preta apresentam muita similaridade no que se refere à aclimação *in vitro* e alta rusticidade. Não ocorreu interação dos fatores quanto a este parâmetro.

Houve interação dos fatores espécies x idade no que se refere à área foliar. Como não houve diferença quanto à época de coletas, o período de cinco em cinco dias em que se realizaram as coletas não foi um intervalo de tempo suficiente para se avaliar o desenvolvimento das plantas em condições de casa de vegetação, porque neste período, as plântulas não chegaram a se desenvolver significativamente.

O efeito do desdobramento das idades dentro das espécies foi significativo quanto à AF das espécies

TABELA 2. Valores médios do NF das espécies avaliadas em casa de vegetação.

Espécies	Mandioca	Batata-doce	Amora-preta
Médias	2,36 B	5,39 A	5,48 A

DMS = 0,641

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

mandioca e batata-doce, que receberam ajuste linear, ao passo que quanto à amora-preta não houve efeito significativo.

Pela Fig. 3, observa-se que a resposta do crescimento foliar em batata-doce e mandioca foi linear com a idade de enraizamento, ou seja, as plântulas de maior idade obtiveram um crescimento maior quando levadas para casa de vegetação. Porém, a amora-preta não se portou da mesma forma, embora, até então, fosse tida como semelhante à batata-doce.

Esse comportamento encontrado em amora-preta mostra que essa espécie é muito mais rústica que a batata-doce, certamente por ser uma espécie lenhosa, ao passo que a batata-doce é herbácea.

Embora a mandioca tenha apresentado NF menor, ela conseguiu superar, evidenciando um maior crescimento da lâmina foliar, pois na Tabela 3 verifica-se que a mandioca foi superior à batata-doce na AF, embora as parcelas com mandioca tivessem um estande bem menor.

Os resultados mostraram que quanto ao NF e AF o período estimado para avaliação de cinco em cinco dias não foi suficiente para as plântulas apresenta-

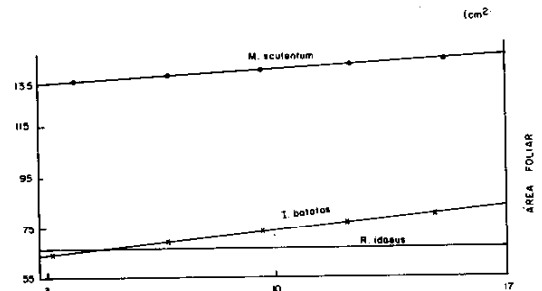


FIG. 3. Curva de regressão para AF das espécies aclimatadas em função da idade de enraizamento *in vitro*.

TABELA 3. Valores médios da AF das espécies aclimatadas e desenvolvidas na casa de vegetação.

Espécies	Mandioca	Batata-doce	Amora-preta
Médias (cm ²)	81,26 A	58,8 B	42,31 C

DMS = 14,9891

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

rem diferenças no desenvolvimento. Por outro lado, a idade de enraizamento *in vitro*, avaliada de sete em sete dias apresentou diferenças, o que mostra que a partir do sétimo dia após a emergência das raízes as plântulas estão aptas a serem repassadas para a aclimação. Quanto à época de coletas, que representa o instante de as plantas deixarem a casa de vegetação para ir ao local definitivo, mostrou-se que a partir do trigésimo dia essas plantas estão aclimatadas para ir ao campo.

CONCLUSÕES

1. Os substratos não influenciam a sobrevivência das plântulas da cultura de tecidos na aclimação.
2. As espécies mostram comportamento diferente quanto à capacidade de aclimação.
3. A sobrevivência não chega a ser influenciada por nenhum dos fatores avaliados.
4. A resposta da idade de enraizamento *in vitro* até os 18 dias após a emergência das raízes é linear crescente.
5. O intervalo de cinco em cinco dias não é suficiente para observar o crescimento de plântulas durante a aclimação.
6. O número de folhas não varia significativamente em nenhuma das espécies, porém a área foliar depende da espécie e idade de enraizamento, pois a espécie que melhor aclimatou-se não foi a de melhor

desenvolvimento foliar.

REFERÊNCIAS

- ARRUDA, H.V. de; REIS, A.J. Sombreamento de mudas de cafeeiro na eova por ocasião do plantio. *Revista de Agricultura*, Piracicaba, v.11, n.1, p.7-12, 1965.
- BARROS, R.S.; MAESTRI, M.; VIEIRA, M.; BRAGA FILHO, L. Determinação da área foliar de folhas de café *Coffea arabica* L. cv. Bourbon. *Revista Ceres*, v.20, n.107, p.44-53, 1973.
- BRAINERD, K.E.; FUCCHIGAMI, L.O. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v.107, n.5, p.515-518, 1981.
- GOMES, W.R.; PACHECO, E. *Composto Orgânico*. Lavras: ESAL, 1988. 11p. (Boletim Técnico, 11).
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for growth and bioassays in tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, v.15, n.3, p.173-197, 1962.
- SUTTER, E.G.; HUTZELL, M. Use of humidity tests and antitranspirant on the acclimatization of tissue cultured plant to the greenhouse. *Scientia Horticulturae*, v.23, p.303-312, 1984.
- THOMAZIELLO, R.A.; OLIVEIRA, E.G. *Formação de viveiro de café*. Campinas: CAFI, 1977. 20p.