

Nota / Note

BAIXA TEMPERATURA PARA EXPLANTES DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA 'MARUBAKAIDO' *IN VITRO* DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO

Jonny Everson Scherwinski Pereira^{1*}; Gerson Renan de Luces Fortes²; João Baptista da Silva³

¹ Pós-Graduando do Depto. de Fitotecnia - FAEM/UFPel, C.P. 354 - CEP: 96001-970 - Pelotas, RS.

² Embrapa Clima Temperado, C.P. 403 - CEP: 96001-970 - Pelotas, RS.

³ Depto. de Física e Matemática - UFPel, C.P. 354 - CEP: 96010-900 - Pelotas, RS.

*Autor correspondente <jscherwi@ufpel.tche.br>

RESUMO: O processo de aclimatização da macieira leva a uma parada no crescimento vegetativo das plantas que pode perdurar por alguns meses. Com o objetivo de maximizar o crescimento de plantas durante a aclimatização, brotações do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido', originárias de cultivo *in vitro*, com 1,0 a 2,0 cm de comprimento, foram inoculadas e mantidas em meio "MS" por 0; 240; 480; 720; 960; 1200 e 1440 horas, sob temperatura de $4\pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $4,2 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com cinco repetições. Após os tratamentos, as brotações foram enraizadas e transplantadas para casa de vegetação, onde crescimento, número de gemas e comprimento dos entrenós foram avaliados, quinzenalmente, por um período de 90 dias. A percentagem de sobrevivência também foi avaliada após um mês de aclimatização. Brotações submetidas à baixa temperatura por 720 h proporcionaram maior crescimento e comprimento dos entrenós das plantas. Contudo, afetaram negativamente o aspecto das brotações *in vitro*, causando um decréscimo na percentagem de sobrevivência das plantas, durante o período de aclimatização.

Palavras-chave: *Malus* sp., micropropagação, dormência, aclimação, crescimento

LOW TEMPERATURE FOR 'MARUBAKAIDO' APPLE ROOTSTOCK EXPLANTS *IN VITRO* DURING ACCLIMATIZATION

ABSTRACT: The process of acclimatization for apple plantlets leads to the stopping of the vegetative plant growth which could last a few months. To improve plant growth of apple rootstock 'Marubakaido' during the acclimatization process, explants from *in vitro* culture 1.0 to 2.0 cm long were cultivated in MS medium and chilled for 0; 240; 480; 720; 960; 1200 and 1440 hours at $4\pm 1^\circ\text{C}$ in a 16 hour photoperiod at $4.2 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ light intensity. The experiment was carried out in a randomized complete block design, with five replications. After chilling the explants were rooted and transplanted to greenhouse conditions where their growth, internode lengths, bud number and dry matter of aerial part and roots were observed, each fifteen days, during three consecutive months. Percentage plant survival was also evaluated after a month of acclimatization. Explants treated for 720 h produced taller plants with elongated internodes which, however, affected negatively the *in vitro* explant aspect leading to a decrease in plant survival during acclimatization.

Key words: *Malus* sp., micropropagation, dormancy, acclimatation, growth

INTRODUÇÃO

A aclimatização é uma etapa muito importante da micropropagação. Durante o crescimento *in vitro* plantas desenvolvem-se sob condições controladas, possuindo baixa ou nenhuma atividade fotossintética, e quando sofrem o processo da aclimatização ficam sujeitas a um forte estresse ambiental, podendo ocorrer a morte das mesmas. Desta forma, o processo compreendido entre o transplante das plântulas produzidas *in vitro* e o total estabelecimento em casa de vegetação é complexo e um fator limitante para a micropropagação de algumas espécies (Van Huylenbroeck & Debergh, 1996; Ross-Karsten et al., 1998).

Alguns pesquisadores têm investigado a

transferência das plântulas a partir das condições *in vitro* para a casa de vegetação. Especificamente para macieira, as plantas quando transplantadas, apresentam uma parada no crescimento vegetativo que pode perdurar por vários meses, chegando a formar gemas terminais escamosas típicas de dormência, mesmo sob condições controladas de crescimento, quando em casa de vegetação (Ribas & Zanette, 1992; Pereira, 1999; Pereira & Fortes, 2000).

Objetivou-se, com esse trabalho, otimizar o crescimento de plantas de macieira durante o processo de aclimatização, a partir de brotações cultivadas *in vitro* em diferentes períodos a baixa temperatura. Espera-se, desta forma, reduzir a permanência das mesmas em casa de vegetação.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado na Embrapa Clima Temperado (Pelotas, RS), nos meses de novembro de 1997 a abril de 1998. Brotações do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' (*Malus prunifolia*), oriundas do cultivo *in vitro*, apresentando 2 a 3 pares de folhas e com 1,0 a 2,0 cm de comprimento, foram inoculadas em meio de Murashige & Skoog (1962), sem a presença de reguladores de crescimento vegetal e, em seguida, transferidas para câmara de crescimento, modelo "Percival I-60", com controle de temperatura e fotoperíodo, onde as brotações foram então mantidas por 0; 240; 480; 720; 960; 1200 e 1440 h, sob temperatura de $4\pm 1^\circ\text{C}$. Utilizaram-se frascos de 250 mL com 40 mL de meio de cultura, inoculando-se 10 brotações por frasco. Todos os tratamentos foram submetidos ao fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de $4,2 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40W branca fria.

Após os tratamentos terem cumprido os respectivos períodos em baixa temperatura, por três vezes, as brotações foram enraizadas em meio de cultura "MS" reduzido pela metade da sua concentração original, acrescido de 100 mg L^{-1} de mio-inositol, $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido indolbutírico (AIB), 30 g L^{-1} de sacarose e 6 g L^{-1} de ágar (conforme metodologia proposta por Fortes & Zanol, 1995); foram transplantadas para as condições de casa de vegetação, utilizando-se bandejas de semeadura (72 células), com substrato composto por terra de encosta, vermiculita e esterco bovino na proporção de 1:1:1, previamente esterilizado com brometo de metila.

As plantas, durante as duas primeiras semanas de aclimatização, foram mantidas em ambiente com duas folhas de sombrite, proporcionando uma interceptação luminosa em torno de 30%, e irrigadas diariamente, mantendo-se as folhas e o substrato sempre úmidos. Após este período, avaliou-se quinzenalmente o crescimento das plantas durante 90 dias. O crescimento das plantas foi estimado pelo comprimento compreendido entre a região do colo e a inserção da última folha.

Ao final deste período, avaliou-se, para cada tratamento, comprimento dos entrenós, número de gemas e a massa seca de raízes e da parte aérea das plantas. A percentagem de sobrevivência foi avaliada após 30 dias de permanência das mesmas sob casa de vegetação. O período de aclimatização das plântulas foi de 30 dias, compreendido entre o transplante ao total estabelecimento em casa de vegetação.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados sendo que cada tratamento foi repetido 5 vezes. Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente com o auxílio do Sistema de Análise Estatística para microcomputadores (SANEST) (Zonta & Machado, 1984). Os dados foram submetidos à análise de variância para um nível de significância de 5%, fazendo-se a comparação das médias pelo Teste F. Os

dados expressos em percentagem foram transformados segundo arco seno da raiz quadrada de $(x/100)$. Para o número de gemas, a transformação usada foi raiz quadrada de $x + 0,5$. Os dados sobre tamanho de plantas, comprimento de entrenós e massa seca de raízes e parte aérea não foram transformados. Embora significativos pelo Teste F, convencionou-se apresentar os resultados referentes à sobrevivência de plantas e percentagem final de crescimento como valores médios seguidos pelos respectivos desvios padrões.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a permanência das brotações sob baixa temperatura, foi observado, após 720 h, que as mesmas começaram a apresentar um aspecto amarelado, acentuadamente nos tratamentos a 960, 1200 e 1440 h. Foi também observado queda de folhas, especialmente das brotações dos dois últimos tratamentos. Além disso, as brotações não apresentaram bom enraizamento na medida em que se aumentou o tempo de permanência das mesmas em baixa temperatura. Assim, o enraizamento das brotações tratadas por 960, 1200 e 1440 h, foi praticamente nulo, o que não permitiu avaliar as variáveis destes tratamentos.

Os efeitos da baixa temperatura, caracterizados pela senescência das folhas, ainda durante as condições *in vitro*, indicam que as brotações, nestas condições, foram induzidas à dormência pela ação da temperatura. Este fato é normalmente observado sob condições naturais, principalmente no outono e inverno, quando os fatores ambientais restringem o crescimento das plantas. Uma diminuição da temperatura e/ou fotoperíodo pode conduzir, num primeiro momento, à parada de crescimento das brotações e, num segundo momento, a entrada em dormência das mesmas (Champagnat, 1992). Hopkins (1995) observou que a resposta das plantas às condições adversas são reguladas internamente por fatores hormonais. Assim, a parada do crescimento das plantas normalmente é acompanhada pelo aumento dos níveis endógenos de inibidores, como o ácido abscísico. Segundo Dietrich (1985), este hormônio apresenta um efeito marcante sobre a dormência das plantas e a queda das folhas, além de inibir vários processos de crescimento. Isto poderia explicar também o fato das brotações tratadas por 960, 1200 e 1440 h terem apresentado um índice de enraizamento praticamente nulo, após 21 dias de permanência em meio de enraizamento. Zanette (1982), estudando a relação entre dormência e regeneração do sistema radicular em porta-enxertos de macieira, observou que no início do inverno, quando a dormência das gemas era máxima, a regeneração das raízes foi nula ou quase nula, sugerindo haver uma correlação direta entre os dois sistemas. Gemas dormentes exerceriam um efeito inibitório sobre a rizogênese pela ação correlativa da parte aérea sobre o sistema radicular da planta.

Durante as três vezes em que o experimento foi realizado, verificou-se que os explantes mantidos por até cinco meses à temperatura de $4\pm 1^\circ\text{C}$ retomavam o crescimento, mesmo sob as condições de baixa temperatura. Este comportamento sugere que estas brotações poderiam ter acumulado um número suficiente de horas de frio, retornando ao crescimento mesmo em temperatura baixa, sem serem inibidas. Lundergan & Janick (1979), trabalhando na conservação *in vitro* de explantes de macieira da cv. Golden Delicious com temperaturas de 1 a 4°C , observaram também que após 12 meses de estocagem as brotações retomavam o crescimento. Porém, os autores não discutiram as possíveis causas deste crescimento.

O aumento no tempo de permanência das brotações à baixa temperatura afetou a taxa de sobrevivência das plantas após um mês de permanência destas em casa de vegetação. Brotações mantidas por até 240 h a temperatura de $4\pm 1^\circ\text{C}$ mostraram-se não afetadas pelo tratamento, apresentando uma taxa de sobrevivência em torno de 80%. Porém, a mesma declinou com o aumento do período de permanência das brotações sob essas condições, chegando a alcançar 44% de sobrevivência aquelas submetidas a 720 h (Figura 1).

Preece & Sutter (1991) relatam o estresse hídrico, provocado por mudanças de ambiente, e a baixa capacidade fotossintética das plantas entre as possíveis causas da baixa taxa de sobrevivência das plantas na aclimatização. Grattapaglia & Machado (1990) mencionam que o tipo de sistema radicular obtido durante a fase de enraizamento *in vitro* tem um papel fundamental na sobrevivência das plantas durante a aclimatização. Uma parte aérea transpirando a taxas muito acima da capacidade de absorção do sistema radicular prejudicam a sobrevivência, podendo a planta murchar e morrer. Além disso, plântulas com estresse, causado pela súbita mudança de ambiente podem ter a sobrevivência comprometida em casa de vegetação. Tais fatos poderiam explicar a diminuição na taxa de sobrevivência das plantas, originárias de brotações tratadas sob condições *in vitro*, à medida em que foram submetidas a maiores períodos de baixas temperaturas.

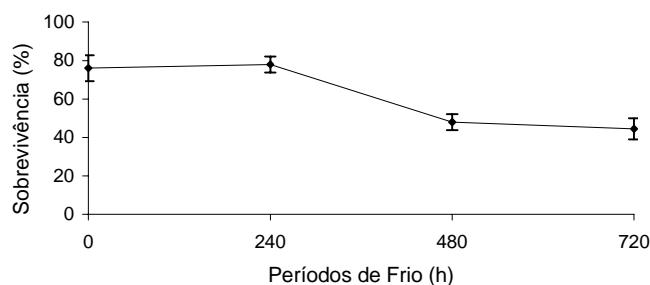


Figura 1 - Percentagem de sobrevivência do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido, após um mês de permanência em casa de vegetação.

Verificou-se um pequeno aumento na altura das plantas em relação aos períodos de estratificação. Brotações submetidas a 720 h foram as que originaram plantas de maior comprimento em casa de vegetação. No período final de avaliação (90 dias), as plantas deste tratamento apresentaram um tamanho médio de 2,48 cm, enquanto que as testemunhas, originárias de brotações que não receberam tratamento, e que cresceram durante os primeiros 60 dias, atingiam em média 2,23 cm de altura. Em seguida, essas plantas interromperam seu crescimento e não mais voltaram a apresentar diferenças de tamanho no decorrer das avaliações. Além disso, verificou-se a formação de uma estrutura de roseta de folhas (entufamento) na parte apical das plantas, sintoma característico do alongamento deficiente dos entrenós. Comportamento semelhante foi observado nas plantas originadas de brotações que receberam 240 e 480 h. Já nas plantas originárias de brotações tratadas por 720 h, houve maior alongamento dos entrenós (Figura 3), proporcionando melhor distribuição das folhas. Nestas plantas, a parada de crescimento foi observada somente após 75 dias de permanência das mesmas em casa de vegetação.

Fica evidente que o crescimento deficiente de plantas de macieira recém aclimatizadas, seja devido às condições adversas que estas encontram no momento do transplante. Além disso, questiona-se o estado funcional das raízes no que diz respeito à nutrição das plantas logo após o transplante e também possíveis inibições correlativas exercidas por diferentes órgãos da planta (Pereira & Fortes, 2000). Para MacClelland (1990), as raízes formadas *in vitro* são pouco funcionais por não apresentarem pêlos radiculares, além de propiciarem pobre conexão vascular com a parte aérea das plantas, resultando numa restrita transferência de água e nutrientes para a parte aérea, comprometendo o crescimento. Debergh (1991) cita que durante a aclimatização, plantas obtidas pelo cultivo *in vitro* sofrem mudanças fisiológicas e morfológicas em resposta às alterações do ambiente e à utilização das reservas acumuladas ainda durante o período *in vitro*, sendo a principal forma da planta sustentar o seu crescimento durante as primeiras semanas em casa de vegetação. Desta forma, pode-se supor que, neste trabalho, o teor inicial de reservas nas plantas não tratadas (testemunhas) tenha sido suficiente para favorecer o crescimento inicial observado. Já para Pereira & Fortes (2000), outros órgãos, como por exemplo as folhas, também poderiam apresentar alguma influência sobre o crescimento das plantas durante as primeiras semanas de aclimatização por causarem um efeito inibitório sobre o alongamento dos entrenós, anulando a organogênese e, conseqüentemente, o crescimento por completo das plantas. Assim, o simples desfolhamento, alguns dias após a aclimatização, seriam suficientes para melhorar o crescimento das plantas em casa de vegetação.

Na Figura 2 observa-se o crescimento das plantas em função de diferentes períodos de avaliação. Verificou-se, de uma maneira geral, que as plantas cresceram ao longo do período estudado, apresentando, contudo, uma diminuição na intensidade de crescimento após 60 dias de permanência em casa de vegetação. A altura máxima das plantas (2,51 cm) foi alcançada aos 72 dias.

Segundo Tomlinson et al. (1985), a parada de crescimento de uma planta, independentemente do fator causador, deve ser considerada como dormência. Da mesma forma, Cottignies (1987) afirma que condições desfavoráveis de crescimento, como nutrição mineral deficiente e mudanças de ambiente podem provocar a parada de crescimento das plantas, levando as mesmas à dormência. Além disso, esta parada de crescimento nem sempre é acompanhada pela queda de folhas e pela formação de gemas dormentes, podendo-se observar, nestes casos, a formação de roseta de folhas no ápice.

Ribas & Zanette (1992), trabalhando com a cv. Gala, observaram também que durante a aclimatização das plântulas provenientes do cultivo *in vitro*, estas cresciam durante um mês, apresentando em seguida uma inibição do seu crescimento, chegando a formar gemas terminais típicas de dormência. No presente trabalho não foi verificada a formação de gemas dormentes nas plantas durante o processo de aclimatização. Além disso, verificou-se que a parada de crescimento destas aconteceu mais tarde, aos 60 dias. Estas diferenças podem estar associadas ao genótipo em questão.

O tratamento das brotações com baixa temperatura, além de proporcionar plantas de maior tamanho, apresentou um efeito significativo no comprimento dos entrenós e na percentagem final de crescimento das plantas. Este efeito significativo não foi verificado, porém, nos tratamentos analisados para o número de gemas, massa seca da parte aérea e das raízes das plantas.

A baixa temperatura não intensificou o surgimento de novas gemas no período final de avaliação, contudo, proporcionou um comportamento linear ascendente em relação ao comprimento dos entrenós, como pode ser visto pela Figura 3. Borbowska & Powell (1979) e Dennis (1994) têm descrito que tratamentos à baixa temperatura são eficientes para promover o crescimento das plantas. Além do mais, é conhecido o efeito das baixas temperaturas sobre a síntese dos promotores de crescimento, principalmente as giberelinas, que estão diretamente relacionadas com a elongação dos entrenós.

Os melhores resultados para a percentagem final de crescimento das plantas foram obtidos quando as brotações foram tratadas por 720 h a frio. Neste tratamento, a percentagem de crescimento final das plantas, em casa de vegetação, foi de cerca de 70%. Nas plantas originadas de brotações não tratadas, a percentagem de crescimento observada foi aproximadamente de 24%. Brotações mantidas por 240 h à baixa temperatura proporcionaram um crescimento

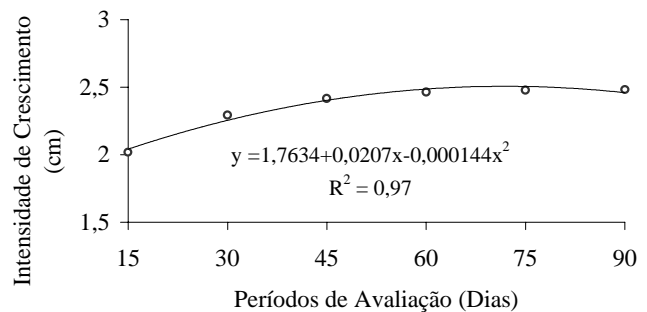


Figura 2 - Altura das plantas, oriundas de brotações *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido, em função do período de avaliação.

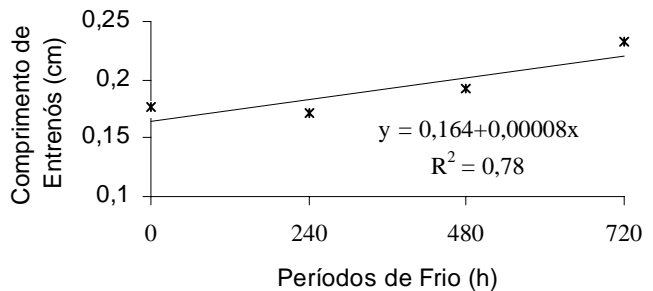


Figura 3 - Comprimento dos entrenós, das plantas originárias de brotações *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido, em função de diferentes períodos de tratamento à baixa temperatura.

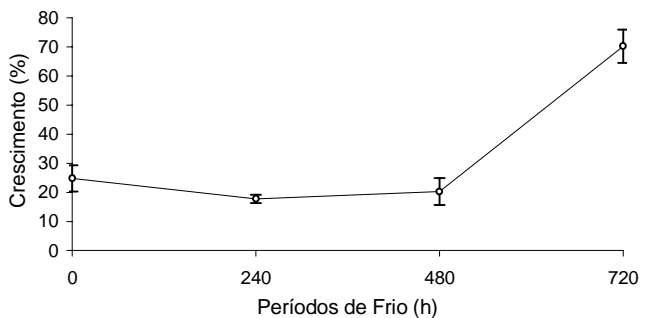


Figura 4 - Percentagem final de crescimento das plantas, originárias de brotações *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido, em função de diferentes períodos de tratamento à baixa temperatura.

final das plantas em cerca de 17%. Já nas brotações tratadas por 480 h, a percentagem final de crescimento das plantas foi de aproximadamente 20% (Figura 4). Estes resultados confirmam que o tratamento das brotações por 720 h foi o que apresentou os melhores resultados de crescimento das plantas.

CONCLUSÕES

Brotações *in vitro* de macieira tratadas a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ por períodos acima de 240 h apresentam decréscimo na sobrevivência quando são aclimatização.

Brotações de macieira sob condições *in vitro* tratadas com baixa temperatura ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$) por até 720 h proporcionam plantas de maior comprimento em casa de vegetação.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pelo apoio financeiro, e a Embrapa Clima Temperado, pelo desenvolvimento deste trabalho de pesquisa em sua unidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORBOWSKA, B.; POWELL, L.E. The dormancy status of apple buds as determined by an *in vitro* Culture System. **HortScience**, v.104, p.796-799, 1979.
- CHAMPAGNAT, P. Dormance des bourgeons chez les végétaux ligneux. In: CÔME, D. (Ed.) **Les végétaux et le froid**. Paris: Hérmann, Éditeurs des Sciences et des Arts, 1992. p.203-260.
- COTTIGNIES, A. Dormance. **Annales des Sciences Naturelles, Botanique**, v.8, p.93-142, 1987.
- DEBERGH, P.C. Acclimatization techniques of plants from *in vitro*. **Acta Horticulturae**, n.289, p.291-300, 1991.
- DENNIS, F.G. Dormancy: what we know (and don't know). **HortScience**, v.29, p.1249-1254, 1994.
- DIETRICH, S.M.C. Inibidores de crescimento. In: FERRI, M.G. (Ed.) **Fisiologia vegetal 2**. São Paulo: EPU, 1985. v.2, p.193-212.
- FORTES, G.R.L.; ZANOL, G. Uso do ácido indolbutírico no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*). In: REUNIÃO TÉCNICA DE FRUTICULTURA, 4, Porto Alegre, 1995. **Resumos**. Porto Alegre, 1995. p.89-91.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP; EMBRAPA, CNPH, 1990. p.99-169.
- HOPKINS, W.G. **Introduction to plant physiology**. New York: John Wiley & Sons, 1995. 464p.
- LUNDERGAN, C.A.; JANICK, J. Regulation of apple shoot proliferation and growth *in vitro*. **Horticultural Research**, v.20, p.19-24, 1979.
- MACLELLAND, M.T. The effects of *in vitro* and *ex vitro* root initiation subsequent microcutting root quality in three woody plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.23, p.115-123, 1990.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v.15, p.473-479, 1962.
- PEREIRA, J.E.S. Parada do crescimento de plantas do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) durante a aclimatização: efeito de baixa temperatura e do ácido giberélico. Pelotas, 1999. 93p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas.
- PEREIRA, J.E.S.; FORTES, G.R. DE L. Desfolhamento e baixa temperatura em plantas micropropagadas de macieira como forma de superar a parada do crescimento durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p.135-145, 2000.
- PREECE, J.E.; SUTTER, E.J. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Ed.) **Micropropagation, technology and application**. London: Kluwer Academic, 1991. p.71-93.
- RIBAS, L.L.F.; ZANETTE, F. Parada de crescimento de mudas de macieira da cv. Gala, clone FZ, durante a aclimatização em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.14, p.145-152, 1992.
- ROSS-KARSTENS, G.S.; EBERT, G.; LUDDERS, P. Influence of *in vitro* growth conditions on stomatal density, index and aperture of grape, coffee and banana plantlets. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v.4, p.21-27, 1998.
- TOMLINSON, P.B.; OLDEMAN, R.A.A.; HALLÉ, F. La dormance des bourgeons. In: COLLOQUE INTERNATIONAL SUR L'ARBRE. Montpellier: Naturalia Monspeliense, 1985. p.5-23.
- VAN HUYLENBROECK, J.M.; DEBERGH, P.C. Physiological aspects in acclimatization of micropropagated plantlets. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v.2, p.136-141, 1996.
- ZANETTE, F. Efeito de algumas temperaturas de estocagem sobre a quebra de dormência das gemas e a regeneração do sistema radical de porta-enxertos de macieira. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, v.4, p.43-47, 1982.
- ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. **SANEST**: sistema de análise estatística para microcomputadores. Pelotas: UFPel; SEI, 1984.

Recebido em 04.11.99