

## Avaliação do crescimento de plantas de morangueiro durante a aclimatização *ex vitro*.<sup>1</sup>

Eunice Oliveira Calvete<sup>2</sup>; Atelene Normann Kämpf<sup>3</sup>; Homero Bergamaschi<sup>3</sup>; Rafael Henrique Schüür Daudt<sup>3</sup>

2/ UPF - FAMV C. Postal 611, 99.001-070 Passo Fundo-RS; 3/UFRGS, C. Postal 776, 91.501-970 Porto Alegre-RS; e.mail: calveteu@upf.tche.br

### RESUMO

A fim de otimizar a micropropagação de morangueiro *cv* Campinas, reduzindo as perdas durante a aclimatização, foi realizado este trabalho na Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O objetivo foi correlacionar a presença de sacarose no tecido vegetal com a produção de biomassa, na aclimatização. As plântulas desenvolvidas *in vitro*, após permanecerem três semanas na etapa de enraizamento, em quatro concentrações de sacarose (15, 30, 45 e 60 g L<sup>-1</sup>), foram transplantadas para bandejas de isopor de 72 células. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com cinco repetições. Cada parcela constituiu-se de 36 mudas, totalizando 720 plantas. Foram avaliadas as taxas de sobreviventes (%) e de crescimento (mg semana<sup>-1</sup>), área foliar (cm<sup>2</sup>), massa seca da parte aérea (mg), área foliar específica (cm<sup>2</sup> mg<sup>-1</sup>), razão de massa foliar (mg mg<sup>-1</sup>) e razão da área foliar (cm<sup>2</sup> mg mg<sup>-1</sup>). Estabeleceu-se a dosagem de 45g L<sup>-1</sup> de sacarose em meio MS para o cultivo de morangueiro *cv* Campinas, como a melhor concentração para a produção de biomassa *ex vitro*. Também foi verificado que essas mudas necessitaram de três a quatro semanas para se adaptarem às novas condições ambientais, e somente após, retomaram o crescimento.

**Palavras chave:** *Fragaria* X *ananas* Duch., análise de crescimento, biomassa, sacarose.

### ABSTRACT

**Evaluation of the growth of strawberry plants during *ex vitro* acclimatization.**

A study was carried out in the Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul to optimize the process of micropropagation of strawberry plants (cultivar Campinas) and to reduce plant losses during acclimatization. The objective of this experiment was to relate plant tissue sucrose levels to biomass production during acclimatization. Strawberry seedlings were grown *in vitro*, rooted for three weeks under four sucrose levels (15, 30, 45, and 60 g L<sup>-1</sup>), and transplanted to polyethylene trays bearing 72 cells. The experimental units were arranged in a complete randomized blocks design with five replications. Each plot comprised 36 seedlings and a total of 720 plants. There were evaluated the plant's survival rate (%), growing rate (mg week<sup>-1</sup>), leaf area (cm<sup>2</sup>), dry matter (mg) of the above ground plant parts, specific leaf area (cm<sup>2</sup> mg<sup>-1</sup>), leaf mass ratio (mg mg<sup>-1</sup>), and leaf area ratio (cm<sup>2</sup> mg mg<sup>-1</sup>). Best *ex vitro* biomass production, was obtained using 45 g L<sup>-1</sup> sucrose rate, in MS medium for growth of Campinas strawberry plants. Also, strawberry seedlings needed three to four weeks to adapt themselves to the new ambient conditions and to resume their growing.

**Keywords:** *Fragaria* X *ananas* Duch., growth evaluation, biomass, sucrose.

(Aceito para publicação em 16 de agosto de 2000)

O morangueiro (*Fragaria* x *ananas* Duch.) é uma planta multiplicada por via vegetativa, e quando são utilizadas plantas matrizes infestadas, ocorre a disseminação de patógenos como vírus (transmitidos por afídeos), micoplasmas e fungos do solo. No caso de contaminação por vírus, a propagação vegetativa proporciona o acúmulo de viroses após anos de sucessivos cultivos, resultando em significativa redução na produção, o que pode atingir níveis de 50 a 60%.

Uma das formas de realizar a limpeza clonal é a cultura de meristema. Esta técnica se destaca dos métodos convencionais por ter, como uma das

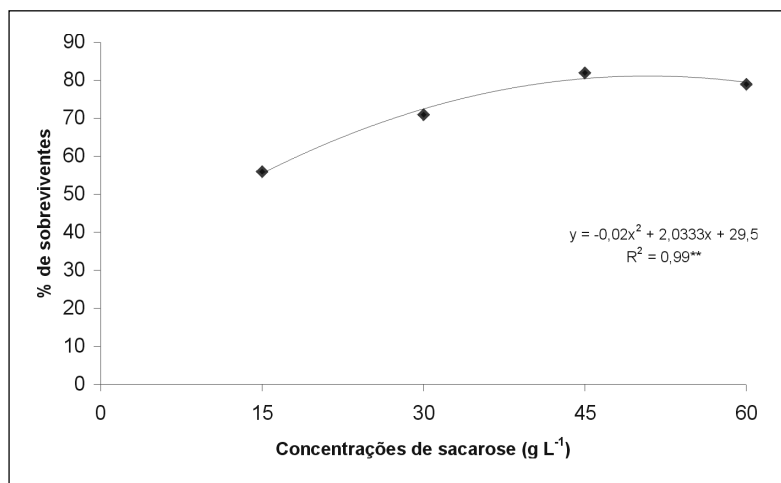
suas aplicações primordiais, a produção e a manutenção das plantas isentas de viroses *in vitro*. Entretanto, a passagem das plantas para condições *ex vitro* podem trazer consequências como baixa taxa de sobrevivência.

Plantas desenvolvidas por micropropagação são expostas a um meio de cultivo asséptico, com carboidratos e reguladores de crescimento, elevada umidade relativa do ar, baixa irradiação e limitados potenciais osmótico e baixa troca de CO<sub>2</sub>. Estes fatores contribuem para uma alta taxa de multiplicação, mas também induzem ao aparecimento de anormalidades anatômicas, morfológicas e fisiológicas,

as quais interferem no estágio de transplante e aclimatização, causando baixa taxa de sobrevivência *ex vitro* (Campostrini & Otoni, 1996).

Alguns autores sugerem alterações na composição química do meio, entre outras, como forma de melhorar a eficiência fotossintética e as relações hídricas das plantas, mudando para o estado autotrófico ainda *in vitro*. Capellades *et al.* (1991) trabalhando com roseira, observaram que a presença de 5% de sacarose por litro no meio *in vitro*, durante o estágio de endurecimento, melhorou a função foliar. Carbonos assimilados, oriundos da sacarose no meio, foram estocados nas folhas,

<sup>1</sup> Parte integrante da tese de Doutorado do primeiro autor, realizada no Departamento de Horticultura e Silvicultura da UFRGS.



**Figura 1.** Efeito das concentrações de sacarose na fase *in vitro* sobre a % de mudas sobreviventes de morangueiro cv Campinas, durante a aclimatização *ex vitro*. Porto Alegre, UFRGS, 1997.

que agiram como órgãos de reserva, liberando energia durante a aclimatização. Segundo este autor, o amido é a principal fonte de reserva usada pelas plantas durante a aclimatização *ex vitro*. O acúmulo de grandes reservas de amido nas folhas da cultura *in vitro* é necessário para a sobrevivência das plantas durante as duas primeiras semanas *ex vitro* (Wardle *et al.*, 1979).

No Canadá, Hsider e Desjardins (1994) avaliaram a fotossíntese em plântulas de morangueiro com diferentes idades e sob várias concentrações de sacarose (0, 1, 3 e 5%), durante o enraizamento *in vitro*. A capacidade fotossintética foi influenciada pelo nível de sacarose no meio de cultivo. As plantas crescidas em meio com baixo nível de sacarose (0 e 1%) apresentaram maior taxa de fotossíntese.

A partir dos dados de crescimento pode-se avaliar, de forma precisa, as causas de alterações no desenvolvimento de plantas geneticamente diferentes ou entre plantas crescendo em ambientes diferentes. O crescimento de uma planta pode ser estudado através de medidas lineares (altura, comprimento entre outros), da superfície (área foliar), da massa e unidades estruturais (Benincasa, 1988).

Com o objetivo de avaliar o crescimento de mudas de morangueiro da cv Campinas, obtidas em meios de cultivo com diferentes concentrações de sacarose, foram analisadas, neste traba-

lho, várias características durante o processo de aclimatização *ex vitro*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Mudas de morangueiro cv Campinas foram desenvolvidas *in vitro*. Após as etapas de isolamento de ápices caulinares e multiplicação, as plântulas foram colocadas em meio de enraizamento de Murashige & Skoog-MS (1962), acrescido de 0,005 mg L<sup>-1</sup> de BAP (benzilaminopurina) e 6 g de ágar em quatro concentrações de sacarose (15, 30, 45 e 60 g L<sup>-1</sup>). Após permanecerem por 3 semanas *in vitro*, foram transplantadas para bandejas de isopor com 72 células. Estas foram preenchidas com uma mistura contendo turfa preta moída (45%), casca de arroz queimada (22,5%), casca de acácia-negra (22,5%) e vermiculita (10%). Esta mistura foi considerada, após estudo preliminar, como uma das melhores com relação ao crescimento de plantas de morangueiro. A adubação de base administrada ao substrato foi de 0,5 g L<sup>-1</sup> da fórmula 4-14-7, em pH 5,6, a cada 15 dias, em volume de 110 mL por planta.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com cinco repetições. Cada parcela constituiu-se de 36 plantas, com uma planta por célula, totalizando 720 plantas.

Durante as três primeiras semanas, as plântulas permaneceram em uma ten-

da úmida, coberta com uma manta de polipropileno “não tecido” - NOVOTEX AGRO 50N (FITESA/ Gravataí-RS), previamente estudada e selecionada dentre outros materiais (Calvete *et al.*, 1999) e sobre uma bancada de concreto com uma lâmina de água de 2 cm. Nesta etapa, as plantas foram irrigadas diariamente com um vaporizador manual, produzindo uma névoa fina. Posteriormente, as plantas ficaram por uma semana com as cortinas laterais levantadas. Após quatro semanas, a cobertura foi retirada, sendo as plantas transferidas para uma bancada onde a irrigação era feita por nebulização, com frequência diária.

O experimento foi instalado em 06 de agosto de 1997, sendo efetuadas avaliações a partir do dia 11, semanalmente, até o dia 29 de setembro do referido ano. Foram registradas alterações na temperatura e na umidade relativa do ar em termohigrógrafo de registro semanal, instalado na bancada do experimento.

Foram avaliadas a taxa de sobrevivência (%), área foliar (cm<sup>2</sup>) e massa seca da parte aérea (mg). A taxa foliar de crescimento (mg semana<sup>-1</sup>), área foliar específica (cm<sup>2</sup> mg<sup>-1</sup>), razão de massa foliar (mg mg<sup>-1</sup>) e razão da área foliar (cm<sup>2</sup> mg<sup>-1</sup>) foram determinadas conforme Benincasa (1988).

A taxa de sobrevivência foi determinada aos 21 dias após a retirada das plantas do cultivo *in vitro*, através da contagem das plantas sobreviventes. Para avaliação das demais variáveis utilizaram-se duas plantas por parcela.

A área foliar foi determinada através de um planímetro eletrônico portátil, modelo LI-3000 (LI-COR Inc.).

Os resultados foram submetidos à análise de variância e de regressão a 1% ou a 5% de significância, pelo software SANEST.

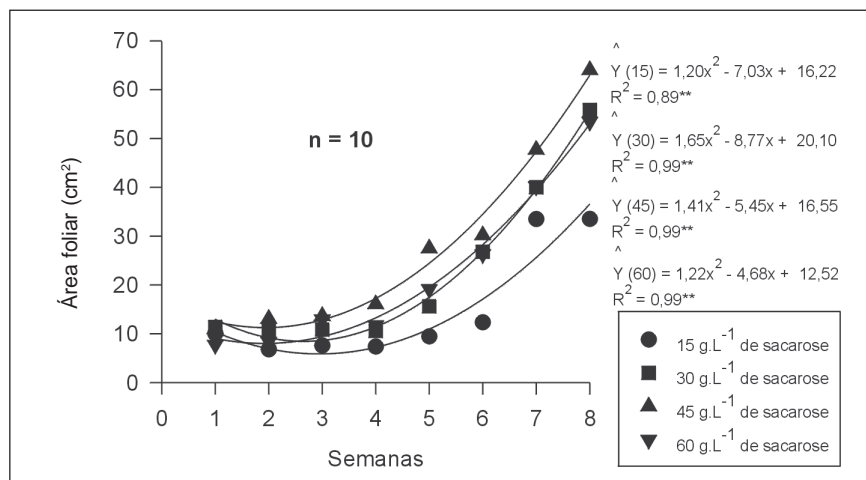
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito da aclimatização sobre as mudas produzidas em diferentes dosagens de sacarose foi inicialmente avaliado, através da porcentagem de sobreviventes. A amplitude de resposta variou de 82 a 56% para as dosagens de 45 e 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose, respectivamente (Figura 1). As médias apresentaram resposta quadrática aos tratamentos, com R<sup>2</sup>=0,99\*.

Entre as possíveis causas da baixa taxa de sobrevivência em plantas aclimatizadas *ex vitro*, encontra-se o estresse hídrico provocado pela mudança de ambiente (Brainerd & Fuchigami, 1981) e a baixa capacidade fotossintética (Preece & Sutter, 1991). Conforme Hdider & Desjardins (1994) maior teor em sacarose no tecido foliar está relacionado com menor taxa de fotossíntese. Este fato pode ter compensado a deficiência na capacidade fotossintética natural nas plantas durante a aclimatização *ex vitro*. Os dados encontrados concordam com as análises realizadas por Cappelades *et al.* (1991) e Wardle *et al.* (1979).

A taxa média de crescimento das mudas de morangueiro ao longo de 8 semanas, foi maior nas concentrações mais baixas de sacarose, diminuindo a diferença nas doses mais concentradas (Tabela 1). A taxa de crescimento indica a velocidade média de crescimento ao longo do período observado (Benincasa, 1988). As mudas obtidas *in vitro* nas concentrações mais elevadas de sacarose, mostraram maior taxa de sobrevivência *ex vitro* (Figura 1) com crescimento mais rápido (Tabela 1). Segundo Brown (1984), as taxas de crescimento mais elevadas ocorrem quando a planta é grande suficientemente para explorar em maior grau todos os fatores ambientais. Na verdade, diferenças interespecíficas de taxas de crescimento podem se dever a vários fatores como alterações fisiológicas, alocação da matéria seca, morfologia, mudanças climáticas ou eventos fenológicos (Poorter & Pothman, 1992).

A expansão da área foliar durante a aclimatização foi semelhante em todos os tratamentos, porém com intensidades variadas (Figura 2). Até a terceira semana não houve variação entre os tratamentos, mostrando que, provavelmente, a influência do ambiente foi maior do que o efeito das dosagens de sacarose. Somente na quarta semana começaram a ocorrer as variações entre cada tratamento, continuando até o final do período de aclimatização. A maior área foliar encontrada nas plantas oriundas do tratamento de 45 g L<sup>-1</sup> concorda com os resultados encontrados por Riquelme *et al.* (1991), na Argentina, em plântulas de morangueiro. O índice



**Figura 2.** Efeito das concentrações de sacarose na fase *in vitro* sobre a área foliar em morangueiro cv Campinas, durante a aclimatização *ex vitro*. Porto Alegre, UFRGS, 1997.

**Tabela 1.** Taxa de crescimento médio e razão de área foliar na aclimatização de mudas de morangueiro cv. Campinas. Porto Alegre, UFRGS, 1997.

Concentrações de sacarose (g L <sup>-1</sup> )	Taxa de crescimento médio (mg semana <sup>-1</sup> )	Razão de área foliar (mg mg <sup>-1</sup> )
15	0,013	241,32
30	0,023	243,93
45	0,028	216,31
60	0,029	205,43

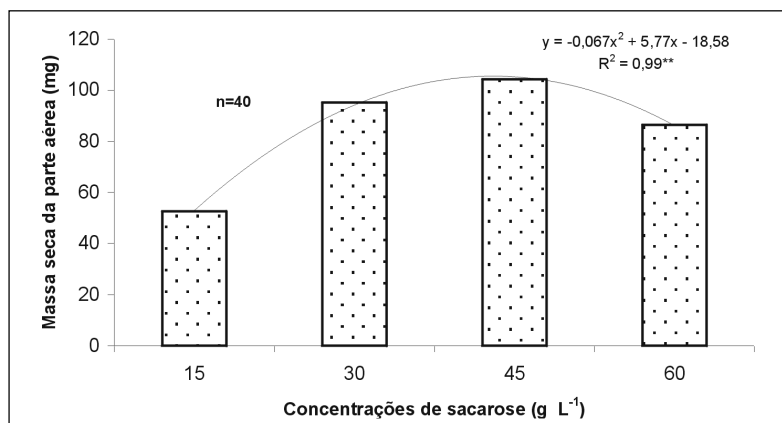
de área foliar também é uma característica, entre outras, utilizado para caracterizar a cobertura vegetal formada por uma população de plantas (Thomas, 1980) e para o estudo da penetração da luz na planta (Haynes, 1980).

Cerca de 90% da matéria seca acumulada pelas plantas, ao longo do seu crescimento, resultam da atividade fotossintética e o restante depende da absorção de minerais do meio (Benincasa, 1988). A distribuição da matéria seca nas diferentes partes da planta tem sido descrita através das relações entre a massa seca dessas. Brouwer (1962), numa revisão sobre o assunto, afirma que uma parte dessas correlações é fixada geneticamente e, dentro desses limites, as condições externas podem ter um efeito modificador. Apesar das plantas oriundas de meio *in vitro*, com altas concentrações de sacarose, apresentarem baixa taxa de fotossíntese (Huylensbroeck *et al.*, 1996; Hdider & Desjardins, 1994), elas podem acumular mais reserva, liberando energia durante a aclimatização (Cappelades *et al.*, 1991; Wardle *et al.*, 1979) e, com

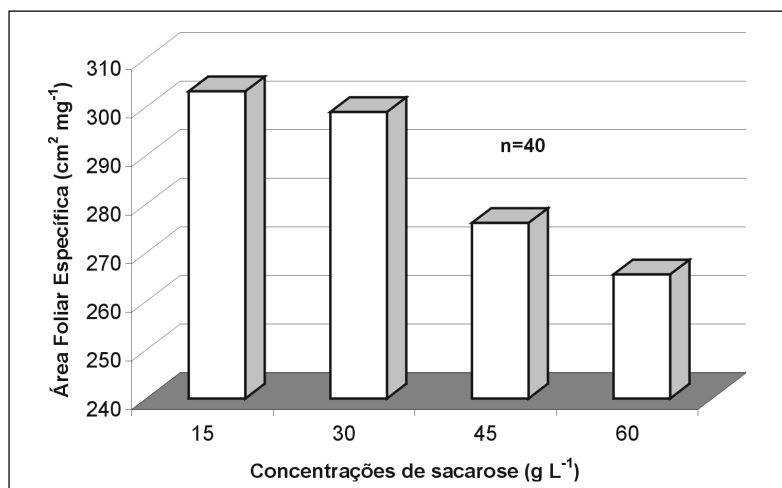
isto, proporcionar maior crescimento e desenvolvimento foliar *ex vitro*.

A relação entre as doses de sacarose durante a fase *in vitro* e a média da massa seca da parte aérea durante a aclimatização, teve resposta quadrática (Figura 3). Houve um incremento na massa seca da parte aérea até a concentração de 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Calcula-se em 44,1 g L<sup>-1</sup> a dosagem de sacarose necessária para atingir a máxima biomassa (105,6 mg), durante o período de aclimatização ( $y = -18,58 + 5,77x - 0,067x^2$ ), confirmando os dados de Riquelme *et al.* (1991), para os quais a dosagem de 40 g L<sup>-1</sup> de sacarose *in vitro* determinou aumento significativo na massa seca das plantas *ex vitro*.

Observou-se que, à medida que aumentaram as concentrações de sacarose aplicadas *in vitro*, diminuiu a área foliar específica nas mudas em aclimatização (Figura 4). Menor área foliar útil significa maior eficiência da folha (Benincasa, 1988). O uso de concentrações mais elevadas de sacarose, no meio de cultivo, aumentou a eficiência das folhas de morangueiro na aclimatização.



**Figura 3.** Relação entre a concentração de sacarose no meio de cultivo *in vitro* e a média da massa seca da parte aérea de mudas de morangueiro cv Campinas durante o período de aclimatização. Porto Alegre, UFRGS, 1997.



**Figura 4.** Área foliar específica em mudas de morangueiro cv Campinas em diferentes concentrações de sacarose, na aclimatização *ex vitro*. Porto Alegre, UFRGS, 1997.

Na formação de mudas de morangueiro da cultivar Campinas, a mais alta concentração de sacarose resultou em maior formação de raízes e, consequentemente, menor razão de massa foliar. Pela relação matéria seca da folha/matéria seca total, obteve-se amplitude de variação entre 0,82 mg. mg<sup>-1</sup> (no tratamento de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose) e 0,77 mg. mg<sup>-1</sup> (no tratamento de 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose).

Conforme Benincasa (1988), a razão de massa da folha é um componente fisiológico. As folhas são os centros da produção da matéria seca (fotossíntese) e o resto da planta depende da exportação de material da folha. A razão de massa das folhas expressa a fração de

matéria seca não exportada das folhas para o resto da planta. Estes conceitos sugerem que plantas produzidas nas concentrações de 15 e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, com menor taxa de crescimento, apresentaram menor exportação de fotoassimilados para o restante da planta.

A razão de área foliar expressa a razão entre a área foliar útil para a fotossíntese e a massa total da planta, sendo um componente morfo-fisiológico (Benincasa, 1988). Portanto, é a área das folhas (em cm²) que está sendo utilizada para produzir 1 mg de matéria seca. Seguindo a mesma tendência observada na taxa de crescimento, a razão de área foliar apresentou menor valor

(205,43 mg. mg<sup>-1</sup>) na dosagem maior (60 g L<sup>-1</sup> de sacarose) (Tabela 1), para a qual se observa a menor área foliar específica (260 cm². mg<sup>-1</sup>) e a menor razão de peso foliar (0,77 mg. mg<sup>-1</sup>).

Os resultados deste experimento evidenciaram a importância da análise de crescimento das plantas, através de várias características analisadas em conjunto e não apenas do número de folha e/ou a altura da planta, inferindo, assim, uma resposta melhor no crescimento do morangueiro cv Campinas durante o processo de aclimatização *ex vitro*. Também observou-se que, com a dosagem de 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose em meio MS, houve maior produção de biomassa *ex vitro*.

## AGRADECIMENTOS

Ao colega Engº Agrº Dr. Carlos Alberto Forcelini, professor da Faculdade de Agronomia da Universidade de Passo Fundo, pela ajuda na elaboração do abstract.

## LITERATURA CITADA

- BENINCASA, M.M.P. *Análise de crescimento de plantas (noções básicas)*. Jaboticabal: FUNEP, 1988. 42 p.
- BRAINERD, K.E.; FUCHIGAMI, L.H. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 106, n. 4, p. 515-518, 1981.
- BROUWER, R. Distribution of dry matter in the plant. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, v. 10, n. 5, p. 361-376, 1962.
- BROWN, R.H. Growth of the green plant. In: TESAR, M.B. *Physiological basis of crop growth and development*. Madison: American Society of Agronomy, 1984. p. 153-174.
- CALVETE, E.O.; FRANÇA, S.; BERGAMASCHI, H.; KÄMPF, A.N. Determinações micrometeorológica sob diferentes materiais de cobertura para aclimatização *ex vitro*. *Revista Brasileira de Agrometeorologia*, Santa Maria, v. 7, n. 2, p. 151-156, 1999.
- CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W.C. *Aclimação de plantas: abordagens recentes*. Brasília: CNPH/EMBRAPA, 1996. 12 p.
- CAPELLADES, M.; LEMEUR, R.; DEBERGH, P. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 25, n. 1, p. 21-26, 1991.
- HAYNES, R.J. Competitive aspects of the grass-legume association. *Advances in Agronomy*, v. 33, p. 227-261, 1980.

- HDIDER, C.; DESJARDINS, Y. Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 1, n. 36, p. 27-33, 1994.
- HUYLENBROECK, J.M.V.; DEBERGH, P.C.; HUYLENBROECK, J.M.V. Impact of sugar concentration *in vitro* on photosynthesis and carbon metabolism during *ex vitro* acclimatization of *Spathiphyllum* plantlets. *Physiologia Plantarum*, v. 96, n. 2, p. 298-304, 1996.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, v. 15, p. 473-497, 1962.
- POORTER, H.; POTHMAN, P. Growth and carbon economy of fast-growing and a slow-growing grass species as dependent on ontogeny. *New Phytologist*, v. 120, n. 1, p. 159-166, 1992.
- PREECE, J.E.; SUTTER, E.J. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Eds). *Micropropagation, technology and application*. London: Kluwer Academic, 1991. p. 71-93.
- RIQUELME, C.; GUIÑAZU, M.E.; TIZIO, R. Pre-acondicionamiento y aclimatacion en condiciones de invernáculo de plântulas micropropagadas de frutilla, menta, papa y vid. *Phyton*, v. 52, n. 1, p.73-82, 1991.
- THOMAS, R.G. The structure of the mature plant. In: BACKER, M.J.; WILLIAMS, W.A. *White Clover*. Walingford: C.A.B. International, 1987. p. 1-30.
- WARDLE, K.; QUINIAN, A.; SIMPKINS, I. Absciscic acid and the regulation of water loss in plantlets of *Brassica oleraceae* L. var. Botrytis regenerated through apical meristem culture *Annals of Botany*, n.43, p.745-752, 1979.