

Maio e Junho de 1995

VOL. XLII

Nº 241

Viçosa - Minas Gerais

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

## CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS PROVENIENTES DA CULTURA DE TECIDOS<sup>1</sup>

Antônio Tadeu da Silva<sup>2</sup>

Moacir Pasqual<sup>2</sup>

Luís Eduardo Corrêa Antunes<sup>2</sup>

Gladyston Rodrigues Carvalho<sup>2</sup>

José Darlan Ramos<sup>2</sup>

### 1. INTRODUÇÃO

A aclimação é o processo pelo qual as plantas produzidas em condições controladas são transferidas para um ambiente com as condições climáticas naturais; essas novas condições devem ser passadas às plantas progressivamente, de forma que elas sofram menores estresses, que podem culminar em injúrias profundas ou mesmo em morte.

O crescimento e desenvolvimento das plantas dependem da progressiva formação dos tecidos dos órgãos e da expansão e diferenciação celular que ocorrem continuamente nas regiões meristemáticas (1).

Há dados de que o crescimento em extensão é mais sensível e quando as plantas sofrem estresse ou enfrentam condições adversas surge desequilíbrio no mecanismo estomático, podendo imediatamente apresentar o déficit hídrico nas células das regiões mais tenras (1). O déficit hídrico é mais pronunciado nos tecidos em desenvolvimento e uma

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 30.12.1993.

<sup>2</sup> Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras. Cx. Postal 37. 37200-000 Lavras, MG.

vez surgida a escassez de água todas as funções bioquímicas e as reações físicoquímicas apresentam desorganização (11).

Com a interrupção de rotas e o surgimento de produtos secundários ou terciários, que geralmente são radicais e causam toxidez às células, há uma paralisação de todo o sistema que estava em desenvolvimento. Segundo SUTTER e HUTZEL (12), a remoção das plântulas das condições *in vitro* provoca estresse crítico, sendo então necessário manter a umidade alta e a temperatura amena. A suplementação luminosa e o enriquecimento da atmosfera com CO<sup>2</sup> também podem minimizar os problemas e auxiliar algumas espécies de plântulas a passar de heterotróficas a autotróficas.

GROUT e MILLAN (6), trabalhando com plântulas de couve-flor *in vitro*, transferidas para a aclimatação, mostraram que a atividade fotossintética foi insuficiente, ocorrendo desbalanço de carbono nos tecidos palissádicos, e as folhas formadas não estavam suficientemente constituídas para o autotrofismo.

Plântulas de morango, ao serem transferidas para aclimatação, tinham, de acordo com GROUT e MILLAN (6), baixa taxa de fixação de carbono, uma vez que as folhas formadas *in vitro* não conseguiam se auto-sustentarem suficientemente. O autotrofismo e o aumento subsequente e significativo do número de folhas, bem como uma indução da eficiência dessas folhas, poderiam contribuir para a sobrevivência das plantas.

Foi demonstrado que os estresses sofridos pelas plântulas afetam todos os parâmetros de crescimento, reduzindo, dessa maneira, a produção vegetal. O efeito de qualquer estresse altera os processos de consumo de nutrientes, metabolismo de carboidratos e de proteínas e translocação de íons; as enzimas que são liberadas com interrupção de rotas estão intimamente ligadas aos processos de desenvolvimento nas plântulas (11).

PIERIK e MARANDI (8) observaram que plântulas de *Rubus idaeus*, obtidas *in vitro*, apresentaram mais área foliar ao serem inoculadas com fungos micorrízicos de gênero *Glomus* e ao serem transplantadas em substrato mineral para casa de vegetação.

CARVALHO e CALDINI (4) relatam em seus estudos que o déficit hídrico, decorrido com as estações das secas, levam as plantas a diminuir o número e a expansão das folhas, ficando o sistema radicular enrijecido, delgado e com baixa eficiência.

A fase de aclimatação deve se encerrar logo que as plântulas apresentem eficiência nos órgãos especializados, passando de heterotróficas para autotróficas (1). O número de folhas e área foliar são bons indicativos para acompanhar a capacidade das plântulas de se auto-sustentarem na fase de aclimatação. As plântulas que superarem o estresse da aclimatação apresentarão bom desenvolvimento, enquanto as demais

serão portadoras de algum prejuízo fisiológico, culminando com estagnação aparente (1).

O objetivo do presente trabalho foi estudar o crescimento e o desenvolvimento de *Manihot esculenta*, *Ipomoea batatas* e *Rubus idaeus* provenientes da cultura de tecidos e submetidas à aclimatação em casa de vegetação.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no laboratório de cultura de tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras (MG).

O experimento constou dos seguintes tratamentos:

a) Espécies: mandioca (*Manihot esculenta*), batata-doce (*Ipomoea batatas*) e amora-preta (*Rubus idaeus*).

As plantas foram obtidas pelo cultivo *in vitro* em meio 'MS' de cultura (7). Após a emergência das raízes nos dois brotos de cada tubo, estabeleceram-se as idades de enraizamento. Houve pré-aclimatação por um período de 48 horas, com as plantas dentro dos tubos destampados, ainda com o meio de cultura, em sala arejada e sombreada.

b) Idade de enraizamento: I) 3 dias após a emergência das raízes; II) 7 dias; e III) 17 dias após a emissão das raízes, quando as plantas passaram para a pré-aclimatação.

c) Épocas de coletas: após a pré-aclimatação, as plantas foram transplantadas em substrato e levadas para casa de vegetação; a primeira época de avaliação se deu aos 20 dias após o transplante; e as demais se seguiram de 5 em 5 dias, até a quarta época.

As plantas pré-aclimatadas foram retiradas dos tubos, lavadas em água corrente e transplantadas em substrato orgânico desenvolvido por GOMES e PACHECO (5) e levadas imediatamente para casa de vegetação à meia-sombra, com nebulização e ventilação forçadas.

Os dados foram coletados nas épocas pré-estabelecidas. Os parâmetros avaliados foram número de folhas (NF) e área foliar (AF). O número de folhas foi tomado por contagem de todas as plantas da parcela, da qual extraiu-se a média (NFT/3); o mesmo aconteceu para a área foliar, que para ser estimada mediram-se as maiores dimensões e calculou-se o produto ( $l \times c$ ), conforme metodologia de BARROS *et alii.* (2). Utilizou-se fator de correção, calculado pela média de 10 folhas de cada espécie, passando no integrador eletrônico para determinar a constante ( $K = \text{área encontrada}/\text{área calculada}$ ). Com o uso da fórmula  $AF = AC \times K$ , em que  $AC = \text{área calculada}$  e  $K = \text{constante}$ , 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  $K = 0,956$ .

O delineamento experimental usado foi inteiramente casualizado com esquema fatorial de  $3^2 \times 4$ , com quatro repetições, 144 parcelas, sendo cada unidade experimental constituída de três vasos com uma planta em cada, totalizando 432 plantas avaliadas.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Quadro 1 são apresentados os resultados das análises de variância referentes ao número de folhas e à área foliar de plantas das espécies *Manihot esculenta*, *Ipomoea batatas* e *Rubus idaeus*, avaliadas sob a influência da idade de enraizamento *in vitro* e no decorrer do tempo em casa de vegetação.

Observa-se que ocorreram significativas diferenças no NF para os fatores espécies e idade de enraizamento. A época de coleta não apresentou efeito no número de folhas, ou seja, com o passar do tempo as plantas não emitiram novas folhas durante o período estudado, mostrando que para seu desenvolvimento as plantas aumentaram a sua eficiência, ocorrendo expansão dos órgãos existentes em vez do aparecimento de novos órgãos da parte aérea.

QUADRO 1 - Resumo de análise de variância do número de folhas (NF) e área foliar (AF) das espécies *Manihot esculenta*, *Ipomoea batatas* e *Rubus idaeus* aclimatadas em casa de vegetação

F.V.	GL	Quadrados médios			
		(NF) <sup>1</sup>		(AF) cm <sup>2</sup>	
Espécie (S)	2	7,70	**	1240,31	**
Idade (I)	2	0,502	*	1131,82	**
S x I	4	0,136	NS	171,77	*
Época (E)	3	0,210	NS	69,766	NS
S x E	6	0,012	NS	16,997	NS
I x E	6	0,021	NS	104,77	NS
S x I x E	12	0,0756	NS	33,887	NS
Resíduo	108	0,1350		75,069	
C.V.		8,19%		2,67%	

<sup>1</sup> Dados transformados para  $\sqrt{NF}$

\* Significativo a 5% de probabilidade.

\*\* Significativo a 1% de probabilidade.

NS Não-significativo.

A Figura 1 expressa a resposta linear (nível de 5% de significância, pelo teste F) da idade de enraizamento dos brotos nas condições *in vitro*. Verifica-se que ao sair dos tubos as plantas estavam em pleno desenvolvimento, não apresentando estagnação de crescimento, fato comum para as plantas, quando ainda no interior dos tubos. Também, por estes dados, pode-se verificar que, com o enraizamento dos brotos ocorre aumento de crescimento das plantas e, portanto, deve-se considerar a idade de enraizamento dos brotos ao se fazer a remoção das plantas para a pré-aclimatação.

No Quadro 2, nota-se que as espécies apresentaram diferenças quanto ao número de folhas 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 para o índice de sobrevivência e o grau de aclimatação. As espécies batata-doce e amora-preta apresentam muita similaridade no que se refere à aclimatação, pois, segundo SILVA *et alii* (10) são de fácil aclimatação, têm excelente comportamento *in vitro* e alta rusticidade. Não ocorreu interação dos fatores para este parâmetro.

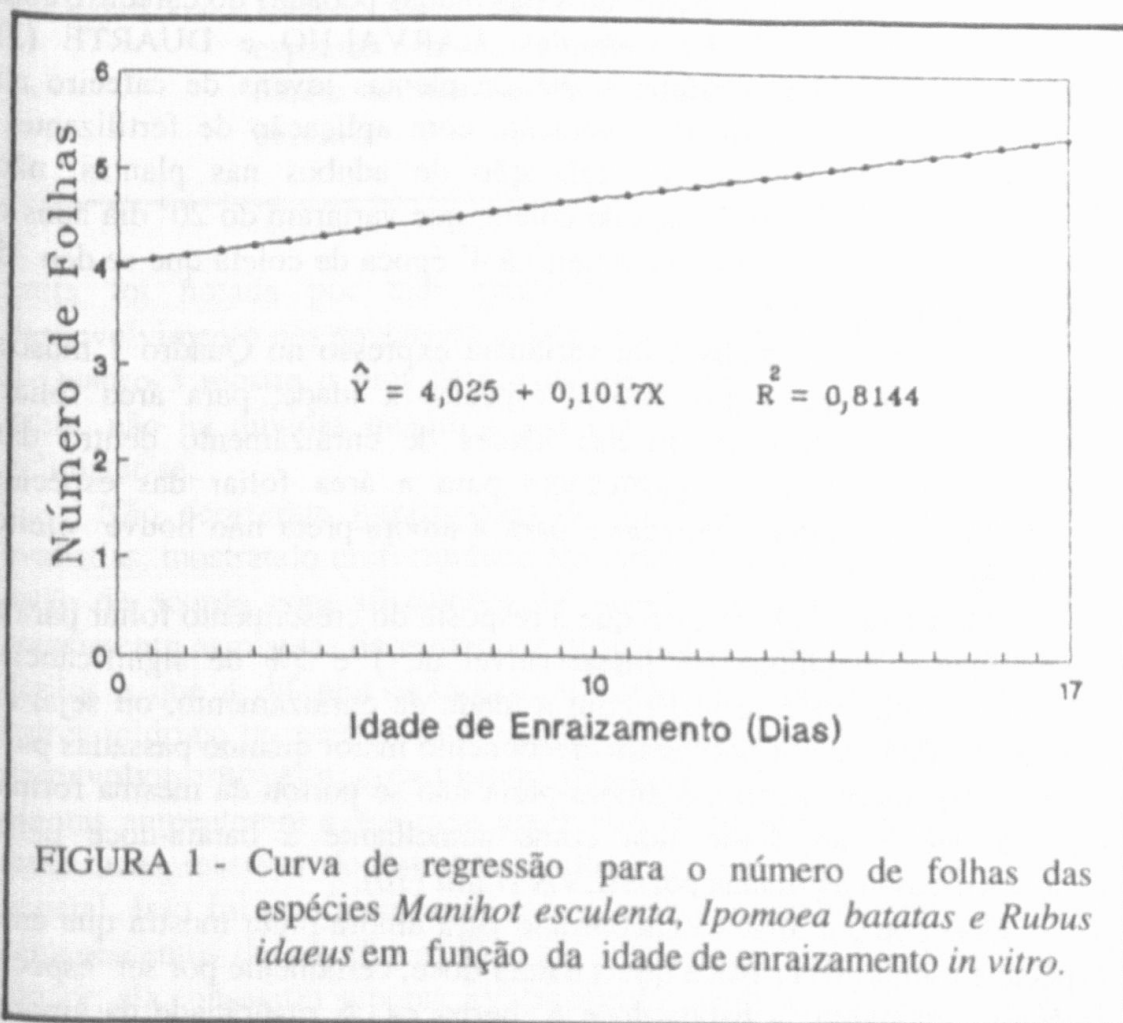


FIGURA 1 - Curva de regressão para o número de folhas das espécies *Manihot esculenta*, *Ipomoea batatas* e *Rubus idaeus* em função da idade de enraizamento *in vitro*.

QUADRO 2 - Valores médios do número de folhas das espécies *Manihot esculenta*, *Ipomoea batatas* e *Rubus idaeus* em casa de vegetação\*

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

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

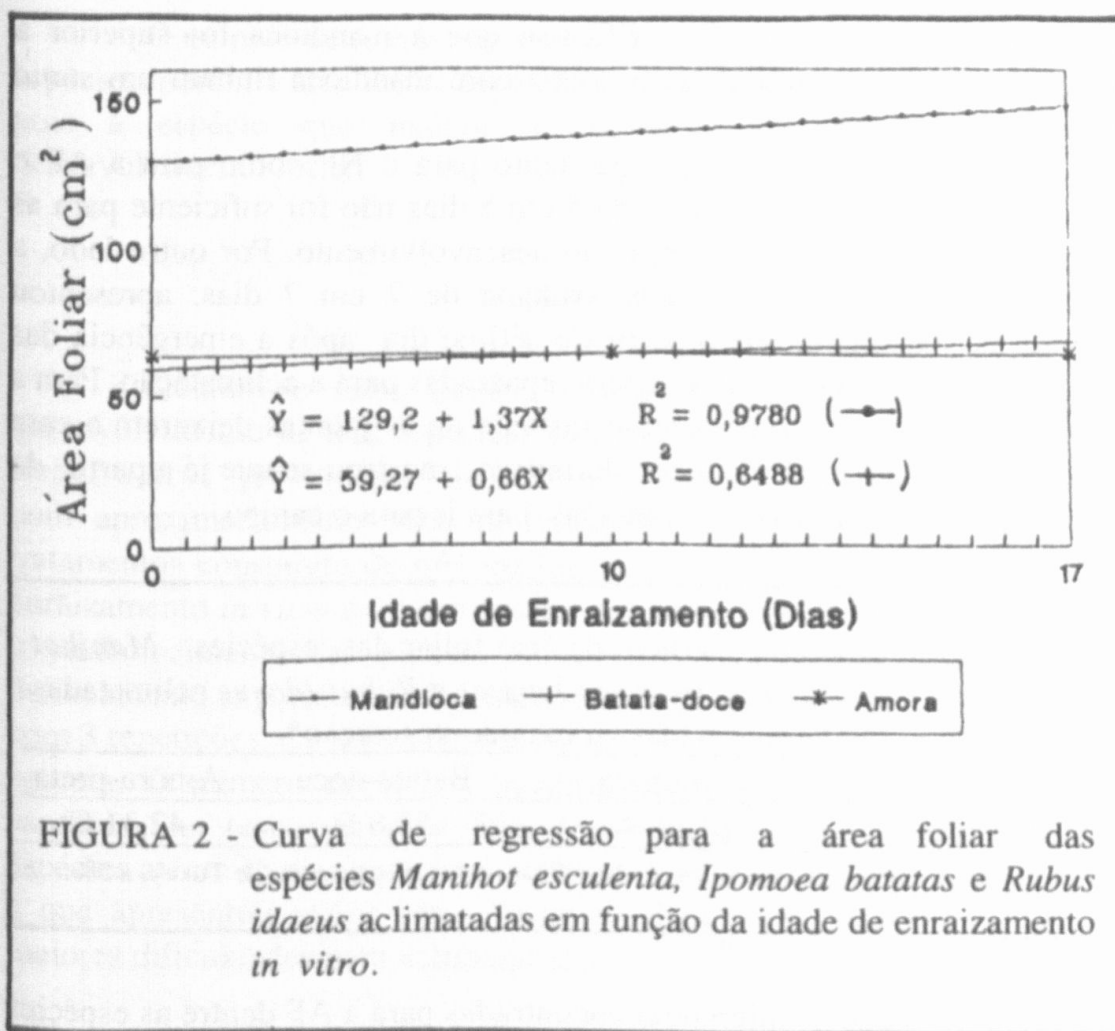
O fato de a mandioca apresentar menor número de folhas não significa que o desenvolvimento foi inferior; isso ocorreu certamente por ser uma espécie que tem arquitetura completamente diferente, um vez que o *stand* das plantas apresentou boas características de desenvolvimento, embora com índice de sobrevivência bem menor que os da batata-doce e amora-preta.

SANTINATO *et alii* (9) conseguiram aumentos de 18 a 24% no número de pares de folhas nos brotos das mudas podadas do cafeeiro, com a aplicação do superfosfato simples. CARVALHO e DUARTE (3) também conseguiram aumentar o NF de plantas jovens de cafeeiro ao serem formadas em casa de vegetação, com aplicação de fertilizantes. Entretanto, como não se fez aplicação de adubos nas plantas, não ocorreram variações nas épocas de coleta, que variaram do 20º dia após o transplântio (primeira época de coleta) à 4ª época de coleta que se deu 35 dias após o transplântio.

O resumo das análises de variância expresso no Quadro 1 mostra que ocorreu interação dos fatores espécies x idade, para área foliar. Realizado o desdobramento das idades de enraizamento dentro das espécies, foi verificada significância para a área foliar das espécies mandioca e batata-doce, enquanto para a amora-preta não houve efeito significativo.

Pela Figura 2 observa-se que a resposta do crescimento foliar para a batata-doce e mandioca foi linear (nível de 1 e 5% de significância, respectivamente, pelo teste F) com a idade de enraizamento, ou seja, as plantas de idade maior obtiveram crescimento maior quando passadas para casa de vegetação. Porém, a amora-preta não se portou da mesma forma, embora, até então, fosse tida como semelhante à batata-doce pelas características já avaliadas por SILVA *et alii* (10).

Esse comportamento encontrado para amora-preta mostra que essa espécie é muito mais rústica que a batata-doce, certamente por ser espécie lenhosa, enquanto a batata-doce é herbácea. A rusticidade da amora-



preta foi notada por não apresentar diferenças de crescimento e desenvolvimento nas épocas de coletas e idades de enraizamento. Embora o Quadro 3 mostre o pior desenvolvimento de área foliar para amora-preta, não há dúvidas quanto à sua maior rusticidade e capacidade de aclimatar-se.

Não ocorreram interrupções de desenvolvimento com as plantas avaliadas, mostrando uniformidade em todas as parcelas. Esses resultados estão de acordo com afirmações de SLATYER (11), que para ocorrer crescimento as plantas dependem de progressiva formação dos tecidos dos órgãos e que a diferenciação celular somente ocorrerá se a planta não sofrer injúrias, ou mesmo interrupções nos mecanismos fisiológicos. O desenvolvimento e o crescimento vegetativo são importantes para as plantas aumentarem a sua taxa assimilatória líquida e assim procedendo terão mais reservas de fotoassimilados para promover maior produção vegetal. Isso foi verificado com a batata-doce e também com as plantas remanescentes de mandioca. Embora a mandioca tenha apresentado NF menor, ela conseguiu superar, evidenciando maior crescimento da lâmina

foliar, pois, pelo Quadro 3, verifica-se que a mandioca foi superior à batata-doce na AF, embora as parcelas com mandioca tenham um *stand* bem menor.

Os resultados mostraram que tanto para o NF como para a AF o período estimado para avaliação de 5 em 5 dias não foi suficiente para as plântulas apresentarem diferenças no desenvolvimento. Por outro lado, a idade de enraizamento *in vitro*, avaliada de 7 em 7 dias, apresentou diferenças, mostrando que a partir do sétimo dia após a emergência das raízes as plantas estão aptas a serem repassadas para a aclimação. Para a época de coletas, que representa o instante de as plantas deixarem a casa de vegetação para ir para o local definitivo, mostrou-se que já a partir do 30º dia essas plantas estão aclimatadas para ir para o campo.

QUADRO 3 - Valores médios de área foliar das espécies *Manihot esculenta*, *Ipomoea batatas* e *Rubus idaeus* aclimatadas e desenvolvidas na casa-de-vegetação\*

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

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

Com relação às diferenças encontradas para a AF dentre as espécies avaliadas, nota-se que cada espécie tem desenvolvimento e crescimento específicos, pois *Manihot esculenta*, que obteve menor número de folhas e maior área foliar, foi a espécie que menos sobreviveu e apresentou grau de aclimação médio, sendo bem inferior às espécies *Rubus idaeus* e *Ipomoea batatas*. Isso deixa claro que o sistema utilizado para aclimatar plântulas pode ter sido insuficiente para as espécies com menor capacidade de aclimação.

#### 4. CONCLUSÕES

1. As espécies aclimatadas mostraram crescimento e desenvolvimento crescentes e lineares durante o período que foram avaliadas, porém cada uma das espécies apresentou comportamento próprio.

2. A resposta da idade de enraizamento *in vitro* até os 18 dias após a emergência das raízes é linear crescente.

3. O intervalo de 5 em 5 dias não é suficiente para observar o crescimento de plantas durante a aclimação.



4. 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.

## 5. RESUMO

Estudaram-se no presente trabalho o crescimento e o desenvolvimento de três espécies: *Manihot esculenta*, *Ipomoea batatas* e *Rubus idaeus* provenientes da cultura de tecidos, em casa de vegetação, com aproximadamente 90% de umidade e temperatura de 30°C. Os tratamentos constaram de três idades: 3 dias, 7 dias e de 17 dias após o enraizamento *in vitro* e quatro épocas de coleta: 20, 25, 30 e 35 dias após o estabelecimento das plantas no substrato compostagem orgânica. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em fatorial  $3^2 \times 4$ , com 3 repetições, e 3 vasos de 100 ml de volume com uma planta cada por parcela. O número de folhas mostrou diferenças apenas para o fator espécies. As respostas para área foliar foram lineares para 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.

## 6. SUMMARY

### (GROWTH AND DEVELOPMENT OF PLANTS PRODUCED BY *IN VITRO* CULTURE)

The purpose of the present work was to study the growth and development of three species: *Manihot esculenta*, *Ipomoea batatas* and *Rubus idaeus* from *in vitro* culture, in a greenhouse with 90% humidity and 30°C temperature. These conditions were applied to three age groups: 3 days, 7 days and 17 days after rooting; and four dates of evaluation: 20, 25, 30 and 35 days after the remotion of plants from test tubes to substrate organic compost. Leaf number showed differences only for species. Leaf area showed linear response in all species until 35 days after the start of the experiment. *Manihot esculenta* showed the best growth in the leaf area, even though exhibiting difficulties for acclimatization. The experimental design was completely randomized in a factorial scheme  $4^2 \times 3$ , with three replications, and three 100 ml recipients (each with one plant) for each experimental unit.

## 7. LITERATURA CITADA

1. ASTON, M. J. & GROUT, B. W. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. *Hort. Res.* 17:1-7, 1977.
2. BARROS, R. S.; MAESTRI, M.; VIEIRA, M. & BRAGA FILHO, L. J. Determinação da área foliar de folhas de café *Coffea arabica* L. cv. Bourbon. *Revista Ceres*, 20:44-52, 1973.
3. CARVALHO, M. & DUARTE, C. S. Influência de processos de semeadura e métodos de repicagem em mudas de cafeeiro *Coffea arabica* L. II. Desenvolvimento foliar. *Ciência e Prática*, 2:167-179, 1978.
4. CARVALHO, M. M. & CALDINI, L. A. Influência da altura e época de poda para aproveitamento de mudas de cafeeiro *Coffea arabica* L. em condições de viveiro. *Ciência e Prática*, 8:25-31, 1984.
5. GOMES, W. R. & PACHECO, E. *Composto orgânico*. Lavras, ESAL, 1988, 11p.(Bol. Técnico, n.11)
6. GROUT, B. W. & MILLAN, S. Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. *Annual Botany*, 55:129-154, 1985.
7. MURASHIGE, F. & SKOOG, F. A revised medium for growth and bioassays in tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, 15(3):173-197, 1962.
8. PIERIK, R. L. M. & MARANDI, D. *In vitro culture of higher plants*. Dorchecht, Martinus New Publishers, 1987. 344p.
9. SANTINATO, R.; FIGUEREDO, J. P. & BARROS, U. W. Doses crescentes de potássio, em substrato na formação de mudas de café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA CAFEEIRAS, 8, Campos de Jordão, 1980. *Resumos...* Rio de Janeiro, IBC/GERCA, 1980, p.326-327.
10. SILVA, A. T. da.; PASQUAL, M.; PINTO, J. E. B. P. & AQUINO, W. H. de. Influência da desfolha, pré-aclimatação e do ambiente na aclimatação de plantas produzidas in vitro. In: CONGRESSO DA PÓS-GRADUAÇÃO DA ESAL, 2., Lavras, 1989. *Resumos...* ESAL, 1989, p.60.
11. SLATYER, R. O. Comparative photosynthesis growth and transpiration of two species of *Atiplex*. *Planta*, 99:175-189, 1973.
12. SUTTER, E. G. & HUTZELL, M. Use of humidity tests and antitranspirant on the acclimatization of tissue cultured plant to the greenhouse. *Scientia Horticulturae*, 23:303-312, 1984.
13. WARDLE, K.; DOBBS, E.B. & SHORT, K. C. In vitro acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 108:386-389, 1983.