

Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e *ex vitro*

Eunice O. Calvete; Marlene Azevedo; Marta H. Bordignon; Marilei Suzin

UPF, C. Postal 611, 99.001-970 Passo Fundo-RS, E-mail: calveteu@upf.tche.br

RESUMO

O presente trabalho foi realizado no laboratório e estufas plásticas da Universidade de Passo Fundo, com o objetivo de caracterizar a morfologia em folhas de morangueiro cultivar Vila Nova, durante o enraizamento *in vitro*, cultivado em quatro diferentes concentrações de sacarose (15; 30; 45 e 60 g.L⁻¹) e, durante a aclimatização *ex vitro* e *in vivo*. Os resultados mostraram que concentrações de 30 a 45 g.L⁻¹ otimizaram o desenvolvimento *in vitro*, no entanto as folhas apresentaram a mesma morfologia nas quatro concentrações de sacarose. As folhas das plantas *in vitro* apresentaram diferenciação no mesofilo, quando comparadas com as folhas de plantas *in vivo*, apresentando redução do tecido paliádico e lacunoso assim como redução da camada de cera da cutícula. Após oito semanas de aclimatização *ex vitro*, as folhas das plantas apresentaram similar morfologia das folhas das plantas *in vitro*, porém com algumas características de plantas *in vivo*.

Palavras-chave: *Fragaria X ananassa* Duch., micropropagação, sacarose, morfologia de folhas, aclimatização.

ABSTRACT

Anatomic analyses and biomass of strawberry plants cultivated *in vitro* and *ex vitro*

This work was carried out at the laboratory and greenhouse of the Universidade de Passo Fundo (Brazil), to evaluate the strawberry leaves morphology of cv. Vila Nova during rooting *in vitro* (growing on 15; 30, 45, and 60 g L⁻¹ of sucrose), and to evaluate the strawberry leaves morphology during the acclimatization *ex vitro* and *in vivo*. A better *in vitro* plants development was found by using 30 and 45 g L⁻¹ of sucrose, while no differences were found for the leaf morphology in different sucrose concentrations. Leaves from plants grown *in vitro* showed mesophyl tissues differentiation when compared to the *in vivo* plants. The latter showed a decrease of the palisade and spongy tissues, as well as, a decrease of the epicuticular wax layer. After eight weeks of acclimatization *ex vitro*, the leaves showed a similar morphology to the *in vitro* plant leaves, however, some characteristics of *in vivo* plants were still present.

Keywords: *Fragaria X ananassa* Duch., micropropagation, sucrose, morphology of leaves, acclimatization.

(Recebido para publicação em 30 de outubro de 2001 e aceito em 13 de maio de 2002)

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) é uma planta herbácea, rasteira, com características de cultura perene, porém é cultivada como cultura anual. A propagação é vegetativa, através de estolhos que se originam na planta-mãe e enraízam em condições de fotoperíodo longo, temperatura elevada, formando novas plantas.

A produção de mudas desta cultura é uma atividade distinta da produção de frutos, sendo realizada por viveiristas especializados, registrados e fiscalizados pela Secretaria da Agricultura e Abastecimento, envolvendo muita tecnologia. No entanto, muitos produtores de frutos produzem suas próprias mudas. Porém, o ideal é adquirir mudas matrizes, isentas de vírus, produzidas por empresas que utilizam a técnica da micropropagação. As mudas deverão ser mantidas em telado, propagadas em bandejas ou outros recipientes com substrato desinfestado. Posteriormente, essas matrizes devem ser multiplicadas à campo para a obtenção das mudas co-

merciais (Assis, 1999).

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), a micropropagação compreende vários estágios: O estágio zero envolve a seleção de plantas matrizes saudáveis, desenvolvidas em casa de vegetação. O estágio I refere-se à fase de seleção dos explantes, desinfestação e cultivo em meio sob condições assépticas, com a posterior multiplicação do propágulo por meio de sucessivos subcultivos (Estágio II). A transferência das partes aéreas para o meio de enraizamento e subsequente transplante para o substrato compreendem os Estágios III e IV, respectivamente (Debergh, 1991).

A fase de enraizamento tem como objetivo a formação de raízes adventícias nas partes aéreas provenientes da multiplicação, permitindo assim, o posterior transplantio para condições *ex vitro*. Alguns autores têm observado aumento na porcentagem de enraizamento para alguns protocolos de aclimatização *ex vitro* com o incremen-

to da concentração de sacarose. Riquelme *et al.* (1991), estudaram o efeito de várias concentrações de sacarose (0 a 60 g.L⁻¹) na etapa de pré-acondicionamento *in vitro* de plantas de morangueiro, batata, menta e videira. Resultados demonstraram que doses de 30 a 45 g.L⁻¹ foram as mais adequadas durante o pré-acondicionamento *in vitro* e posterior sobrevivência durante a fase de aclimatização. Da mesma forma, plantas de gerânio (*Pelargonium zonale* var. Rubin) multiplicadas *in vitro* foram transferidas para meios de enraizamento com e sem sacarose. Segundo Aldrufeu (1987), a adição de 20 g.L⁻¹ de sacarose no meio aumentou a quantidade de plantas de gerânio enraizadas, bem como o número de raízes por planta. Para Calvete (1998), plantas de morangueiro cultivar Campinas produzidas na concentração de 45 g.L⁻¹ de sacarose, apresentaram maior enraizamento e na ausência dessa, não houve desenvolvimento das raízes.

Espaço limitado, baixa irradiação, alta umidade relativa do ar no interior

dos frascos e trocas gasosas ineficientes são alguns fatores que caracterizam o ambiente de cultivo *in vitro*. Este meio propicia alta taxa de multiplicação, mas as plantas produzidas diferem anatômica, morfológica e fisiologicamente daquelas plantas desenvolvidas em casa de vegetação e em campo.

Donnelly & Vidaver (1984) estudaram a anatomia de folhas de framboesa propagadas *in vitro* e verificaram que estas eram pequenas, com finas camadas de células paliçádicas e contendo menor número de pêlos epidérmicos do que aquelas formadas *in vivo*. No entanto, com o desenvolvimento da planta, após o transplante, surgiram folhas anatomicamente semelhantes à testemunha.

Foi realizado, por Waldenmaier (1994), uma análise histológica de folhas de azálea (*Rhododendron indica*) durante aclimatização de plantas *in vitro*, onde foram verificadas estruturas mal formadas no mesófilo e pequena cavidade estrutural dos estômatos. O autor relata que a aclimatização com baixa umidade relativa do ar resultou em aumento tanto na densidade estomática, como na diferenciação da parede celular de células do parênquima paliçádico e lacunoso. Segundo Pierik (1990), plantas provenientes do cultivo *in vitro* apresentam células paliçádicas menores e em menor quantidade.

Wardle *et al.* (1983) demonstraram, com couve-flor (*Brassica oleracea var botrytis*), que uma diminuição na umidade relativa *in vitro* produziu uma formação de cutícula mais espessa, o que permitiu uma menor transpiração celular. A maioria das espécies de plantas cultivadas *in vitro* têm, geralmente, a cutícula pouco desenvolvida, devido à alta umidade relativa (90 a 100%) que ocorre *in vitro*. As folhas das plantas *in vitro* são geralmente finas, tenras e fotossinteticamente pouco ativas; por isto, mal adaptadas às condições que irão encontrar na aclimatização (Pierik, 1990). Conhecendo as alterações morfológicas de plantas desenvolvidas *in vitro*, pode-se manipular o ambiente durante a aclimatização *ex vitro*. O presente trabalho objetivou caracterizar a morfologia em folhas de morangueiro cultivar Vila Nova, durante o enraizamento *in vitro*, cultivadas em

quatro diferentes concentrações de sacarose (15; 30; 45 e 60 g.L⁻¹) e, durante a aclimatização *ex vitro* e *in vivo*.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no laboratório e em estufas da Universidade de Passo Fundo, durante o período de novembro de 1999 à novembro de 2000.

Isolou-se gemas apicais de morangueiro, cv. Vila Nova e, posteriormente as mudas obtidas foram transferidas para frascos (300 ml), com cerca de 60 ml do meio básico de MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 2 mg.L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) e 0,5 mg.L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃), 30g de sacarose e 6 g de ágar. Os frascos com as plantas foram colocados em sala de crescimento com temperatura ambiente de 25 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de ± 2000 lux. Vários ciclos de multiplicação foram efetuados, até atingir o número desejado de mudas.

As mudas selecionadas na etapa anterior foram colocadas para enraizar em meio básico MS suplementado com 0,05 mg.L⁻¹ de BAP e 6g de ágar, em diferentes concentrações de sacarose (15; 30; 45 e 60 g.L⁻¹). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 com NaOH, antes da autoclavagem, em todas as etapas da micropropagação. O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados (4). Cada parcela (frasco) constou de 5 plantas, perfazendo o total de 320 explantes. Após quatro semanas na câmara de crescimento foram avaliadas as características: massa fresca e seca de folhas e raízes e alterações morfológicas das folhas. A massa seca foi obtida através da secagem em estufa a 65°C até peso constante. A matéria seca da parte aérea e da raiz das plantas de morangueiro foram determinadas em uma balança digital analítica (Sartorius). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e de regressão.

Para o experimento *ex vitro* foram produzidas 120 mudas em meio MS suplementados de 0,05 mg.L⁻¹ de BAP, 6 g de ágar e 45 g.L⁻¹ de sacarose. Após 30 dias foram transferidas para bandejas de isopor com 72 células, com o

substrato constituído por casca de arroz carbonizada (30%), vermicomposto (25%), solo mineral (latossolo vermelho escuro (35%)) e vermiculita (10%), sendo utilizado o sistema de irrigação por nebulização.

Para analisar comparativamente as características anatômicas, foram realizadas avaliações morfológicas em mudas desenvolvidas durante a fase do enraizamento *in vitro* (folhas retiradas do tubo de ensaio), durante a aclimatização *ex vitro* (folhas coletadas em porções inferiores das mudas, após oito semanas de crescimento em estufa agrícola) e *in vivo* (plantas desenvolvidas em condição de ambiente natural).

As análises morfológicas das folhas de morangueiro iniciaram com a coleta e clarificação do material, a qual foi feita em hipoclorito de sódio (20%), até as mesmas apresentarem-se transparentes (sem clorofila), segundo metodologia de Kraus & Arduin (1997). Os cortes foram efetuados à mão livre e o procedimento de coloração utilizado foi a combinação de azul de astra e fucsina básica, nas concentrações de 0,5% conforme metodologia descrita por Roeser (1962) apud Kraus & Arduin (1997). A montagem foi em glicerina 50% e a lutagem com esmalte incolor. Foi realizada a observação da anatomia foliar na fase do enraizamento *in vitro* e durante aclimatização *ex vitro*. Os estudos predominaram nos tecidos componentes do mesófilo foliar e de revestimento. Os cortes foram fotografados em fotomicroscópio Olympus Bx50.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos por meio da análise de variância, para as quatro diferentes concentrações de sacarose (15; 30; 45 e 60 g.L⁻¹) no meio de enraizamento *in vitro*, demonstraram que para as características massa fresca e seca aérea houve um comportamento linear, onde doses crescentes de sacarose promoveram acréscimos de 1,4 e 0,5 mg para a biomassa fresca e seca, respectivamente (Figura 1). Para a característica massa fresca da raiz houve um incremento até a dose de 30 g.L⁻¹, diminuindo na de 45 e 60 g.L⁻¹, evidenciando um comportamento quadrático, onde o pon-

to de máximo crescimento corresponde a dose 43, 4 g.L⁻¹ de sacarose (Figura 2). No entanto, na massa seca da raiz, o comportamento foi linear, verificando-se aumento de 0,15 mg para cada grama de sacarose adicionada ao meio (Figura 2). Esses resultados demonstraram que as plantas em condições *in vitro* necessitam de fontes exógenas de açúcar e que, para a cultivar Vila Nova, as doses entre 30 e 45 g.L⁻¹ foram as mais indicadas. Resultados similares foram obtidos em trabalhos realizados, anteriormente, por Azevedo *et al.*, (1999) com esta mesma cultivar e por Calvete (1998), com a cultivar de morango Campinas.

Riquelme *et al.* (1991) ao estudarem o efeito de várias concentrações de sacarose (0 a 60 g.L⁻¹) na etapa de pré-acondicionamento *in vitro* de plantas de morangueiro, menta e videira, obtiveram resultados similares. Os autores verificaram que para essas espécies, as doses de 30 a 45 g.L⁻¹ foram as mais adequadas durante o pré-acondicionamento *in vitro* e posterior sobrevivência durante a fase de aclimatização.

Para promover fotoautotrofismo nas plantas *in vitro*, Debergh (1991) sugere a omissão de sacarose no meio. Langford & Wainwright (1987) afirmam que o cultivo fotoautotrófico de células e órgãos tem sido buscado por muitos pesquisadores, mas poucos resultados foram encontrados neste sentido. Provavelmente, seria necessário modificar a intensidade de luz e a concentração de CO₂ (Arai *et al.*, 1991). Isso sugere que a intensidade luminosa nas câmaras de cultura, estava muito abaixo da faixa necessária para ativar as moléculas de clorofila para a síntese de glicose e, segundo Debergh (1991) nessas condições de cultivo *in vitro* plantas micropropagadas não são fotoautotróficas, mas mixotróficas ou heterotróficas.

Folhas de plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e *ex vitro* apresentaram-se menores e delgadas, comparadas às cultivadas *in vivo*. Donnely & Vidader (1984), também encontraram esses aspectos em estudos realizados com framboesa vermelha. As seções transversais de folhas de plantas *in vitro*, obtidas em diferentes concentrações de sacarose (15; 30; 45 e 60 g.L⁻¹) no meio

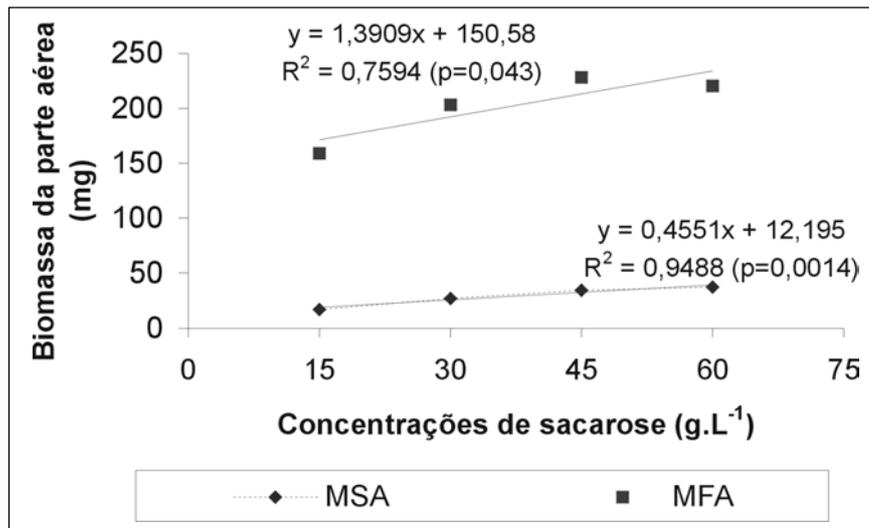


Figura 1. Massa fresca (MFA) e seca (MSA) da parte aérea de plantas de morangueiro *cv.* Vila Nova propagadas *in vitro*, após o período de 30 dias. Passo Fundo, UPF, 2000.

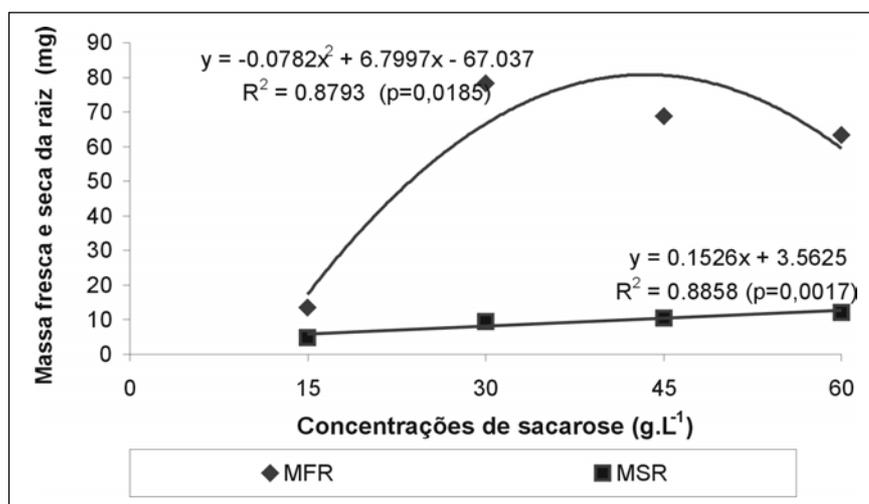


Figura 2. Massa fresca (MFR) e seca (MSR) da raiz em plantas de morangueiro *cv.* Vila Nova propagadas *in vitro*, após o período de 30 dias. Passo Fundo, UPF, 2000.

de cultura, não apresentaram diferenças marcantes na organização dos tecidos.

Folhas desenvolvidas *in vitro* na concentração de 45 g.L⁻¹ de sacarose (Figura 3) mostraram uma fina camada de cutícula depositada sobre a epiderme, apresentando uma única camada de células em ambas as faces. Uma das funções da cutícula é proteger a planta contra a perda de umidade. A disposição da mesma pode ser afetada pela intensidade da luz e pela disponibilidade da água (Mauseth, 1988). A fina camada de cutícula das plantas *in vitro*, demonstrou que o ambiente no qual a planta se desenvolveu não estimulou o aparecimento de uma camada mais espessa, já que

as condições de umidade existentes no frasco não exigiram da planta tal formação. Igualmente Wetzstein & Sommer (1983) relataram que, em estudos realizados com *Liquidambar styraciflua*, embora a morfologia da cera seja um controle genético, a configuração e distribuição das ceras podem ser modificadas pelas condições ambientais e que a dimensão e densidades são afetadas pela luz, temperatura e umidade.

O mesofilo das folhas *in vitro* mostrou-se diferenciado no parênquima paliçádico e lacunoso. O primeiro localizado na superfície adaxial e o lacunoso na face abaxial, caracterizando a anatomia dorsiventral da folha (Fahn, 1990).

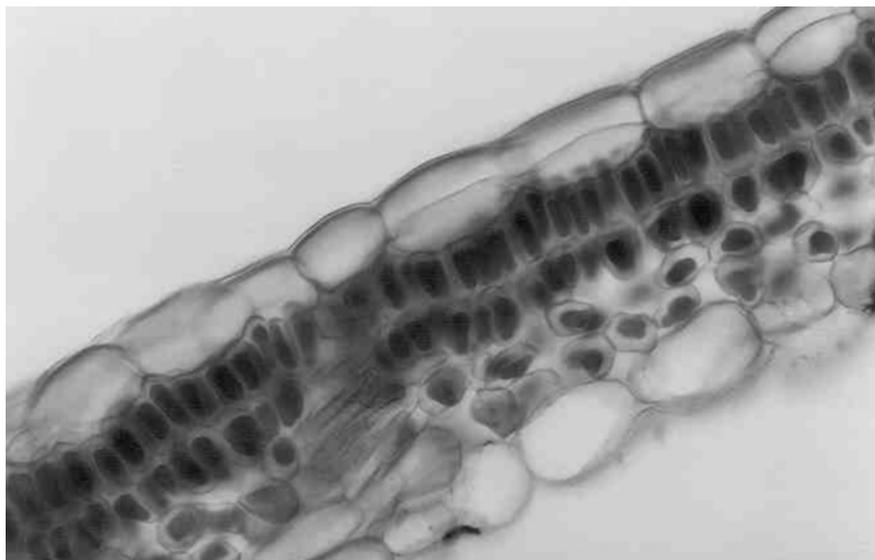


Figura 3. Seção transversal da lâmina foliar do morangueiro *cv* Vila Nova, durante a fase de enraizamento *in vitro* em meio de cultura contendo 45 g.L⁻¹ de sacarose, após período de 30 dias (Aumento: 100X). Passo Fundo, UPF, 2000.

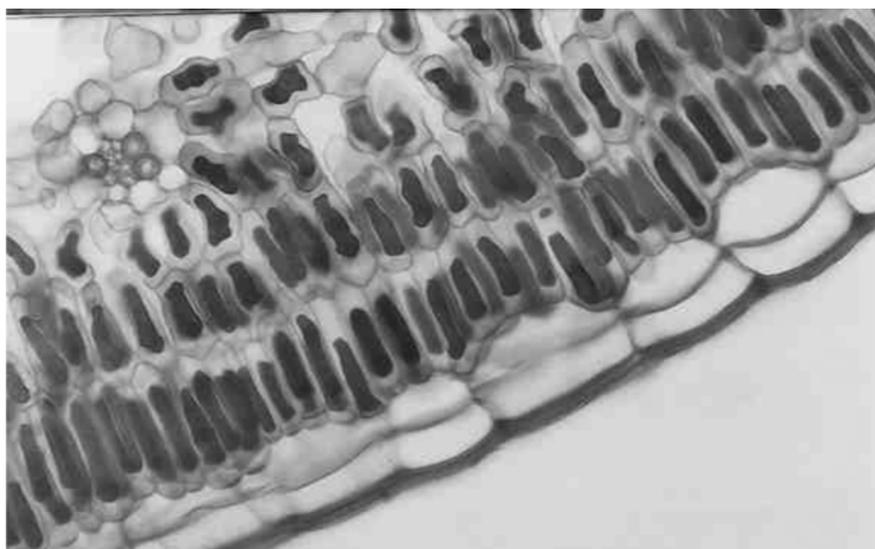


Figura 4. Seção transversal de lâmina foliar de morangueiro *cv* Vila Nova, cultivada em condições ambientais (*in vivo*) (Aumento: 200 X). Passo Fundo, UPF, 2000.

O parênquima paliçádico das plantas *in vitro* apresentaram, nas quatro concentrações de sacarose, a mesma distribuição nos tecidos, sendo uma camada com células justapostas e uma segunda ainda em disposição vertical porém, com espaços maiores entre elas (Figura 3). Similarmente Donnelly & Vidaver (1984) relataram que as folhas *in vitro* de framboesa vermelha apresentavam uma camada de células paliçádicas, enquanto as folhas *in vivo* duas ou mais camadas. O parênquima lacunoso apresentou células de forma arredondadas, comparadas às células do parênquima

lacunoso da folha *in vivo* (braciformes). No entanto, esse tecido apresentou grande semelhança com o lacunoso da folha *ex vitro*.

As folhas *ex vitro*, em seções transversais mostraram a disposição dos tecidos com muita semelhança à morfologia *in vitro*, porém com algumas características de plantas *in vivo*. Essa pode ser considerada uma fase de transição. De acordo com Donnelly & Vidaver (1984), as primeiras novas folhas das plantas transplantadas são transitórias em suas características e anatô-

mia. O nível pode depender do número ou estágio das folhas formadas no meio de cultura.

A epiderme apresentou-se na face adaxial com duas camadas e na abaxial com apenas uma. Tricomas glandulares foram detectados por toda a extensão do tecido de revestimento, principalmente na superfície adaxial. Porém, segundo Donnelly & Vidaver (1984) o mesofilo foliar de framboesa vermelha mostrou os parênquimas paliçádicos e lacunoso numa disposição correspondente à folha *in vitro*. A epiderme das folhas *in vivo* com duas camadas de células na superfície adaxial mostrou a cutícula semelhante às plantas *in vitro* e *ex vitro*. Na face abaxial o tecido apresentou apenas uma camada de células (Figura 4). O mesofilo apresentou-se diferenciado em parênquima clorofiliano paliçádico e lacunoso, sendo o paliçádico com duas camadas caracteristicamente justapostas e uma terceira camada também de células alongadas, mas com maiores espaços entre elas. Na mesma figura observa-se o parênquima lacunoso com células do tipo braciforme com espaços intercelulares esquizógenos entre as mesmas. A espessura da folha mostrou-se com um número maior de camadas celulares comparadas com a morfologia da folha *in vitro* e *ex vitro*. Waldenmaier (1994) em estudos com folhas de *Rhododendron*, declara que folhas com dois anos possuíam o tecido paliçádico com duas ou três camadas, em contraste com as folhas *in vitro* que tinham somente uma camada desse tecido. O autor relata ainda que as folhas no estágio de aclimatização apresentaram características similares com as *in vitro*.

Pelo exposto, observou-se que durante o enraizamento *in vitro* existe a necessidade de suplementar o meio com uma fonte exógena de açúcar, sendo estabelecidas concentrações de 30 a 45 g.L⁻¹ para o cultivo de morangueiro *cv* Vila Nova. As folhas *in vitro* mostraram-se pequenas, com finas camadas de cera e de células paliçádicas, apresentando mesma morfologia na folha, quando desenvolvidas em diferentes concentrações de sacarose. Em vista disso, um ambiente semelhante ao *in vitro*, com posterior ajuste gradual na diminuição

de umidade e aumento da luminosidade nas diferentes etapas de crescimento *ex vitro*, pode aumentar a taxa de sobrevivência em mudas de morangueiro cultivar Vila Nova, durante a aclimatização.

LITERATURA CITADA

- ALDRUFEU, A. Rooting and acclimatization of *Pelargonium zonale* plantlets. *Acta Horticulturae*, v. 212, p. 361-366, 1987.
- ARAI, S.; ASAO, H.; KOBATAKE, H. The effect of CO₂ enrichment on the growth and quality of strawberry plantlets regenerated from a shoot-tip culture. *Bulletim of the Nara Agricultural Experiment Station*, n. 22, p. 9-16, 1991.
- ASSIS, M. Sanidade do material vegetativo na produção de mudas de morangueiro: IN: DUARTE FILHO, J.; CANÇADO, G.M.A.; REGINA, M.A.; ANTUNES, L.E.C.; FADINI, M.A. (eds.) *Morango: Tecnologia de produção e processamento*. Caldas:Suprema, 1999. p. 65-71.
- AZEVEDO, M.M.; CALVETE, E.O.; SUZIN, M.; AUGUSTIN, L. Efeito da concentração de sacarose na etapa de pré-acondicionamento de morangueiro. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 50., 1999, Blumenau. *Anais*. Blumenau: FURB, 1999. p. 135.
- CALVETE, E.O. *Concentração de sacarose in vitro e seleção de substratos para aclimatização ex vitro de morangueiro cv. Campinas (Fragaria X ananassa Duch.)*. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 108 p. (Tese doutorado).
- DEBERGH, P.C. Acclimatization techniques of plants from in vitro. *Acta Horticulturae*, v. 289, p. 291-300, 1991.
- DONNELLY, D.J.; VIDAVER, W.E. Leaf anatomy of red raspberry transferred from cultured to soil. *Journal of the the American Society for Horticultural Science*, v. 109, n. 2, p. 172-176, 1984.
- FAHN, A. *Plant Anatomy*. Menlo Park: The Benjamin/Cummings, 1990. 560 p.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A.; MICROPROPAGAÇÃO. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.) *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: EMBRAPA-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p. 183-260.
- KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Rio de Janeiro: EDUR, 1997. 198 p.
- LANGFORD, P.J.; WAINWRIGHT, S. Effects of sucrose concentration on the photosynthesis ability of rose shoots *in vitro*. *Annals of Botany*, v. 60, p. 633-640, 1987.
- MAUSETH, J. *Plant Anatomy*. Inglaterra: Pergaman-Press, 1988. 588 p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG F.A. Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, n. 15, p. 473-497, 1962.
- PIERIK, R.L.M. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 326 p.
- RIQUELME, C.; GUIÑAZU, M.E.; TIZIO, R. Pre-acondicionamiento y aclimatacion en condiciones de invernáculo de plántulas micropagadas de frutilla, menta, papa y vid. *Phyton*, v. 52, n. 1, p. 73-82, 1991.
- WALDEMAIER, S. Histological analyses of *Rhododendron* leaves during acclimatization of *in vitro* plants. *Acta Horticulturae*, v. 364, p. 53-60, 1994.
- WARDLE, K.; DOBBS, E.B.; SCHORT, K.C. *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. *Journal of the American Society for Horticulturae Science*, v. 108, n 3, p. 386-389, 1983.
- WETSTEIN, H; SOMMER, H. Scanning electron microscopy of *in vitro* cultures *Liquidambar styraciflua* plantlets during acclimatization. *Journal of the American Society for Horticulturae*. v. 118, n. 3, p. 419-424, 1983.