

## Efeito da aplicação de baixa temperatura em plantas de macieira sobre o crescimento durante a aclimatização<sup>(1)</sup>

Jonny Everson Scherwinski Pereira<sup>(2)</sup>, Gerson Renan de Luces Fortes<sup>(3)</sup> e João Baptista da Silva<sup>(4)</sup>

Resumo – Este trabalho objetivou avaliar o efeito da aplicação de baixa temperatura ( $4\pm 1^\circ\text{C}$ ) sobre o crescimento das brotações micropropagadas de um porta-enxerto de macieira (*Malus prunifolia* Borkh.), cv. Marubakaido, durante o processo de aclimatização. Durante as duas primeiras semanas de aclimatização, as plântulas foram transferidas para uma câmara de crescimento, e submetidas à temperatura de  $4\pm 1^\circ\text{C}$  por 0, 240, 480, 720, 960, 1.200 e 1.440 horas, sob fotoperíodo de 16 horas e radiação de  $5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Em seguida, foram conduzidas para casa de vegetação e avaliadas por um período de 90 dias. Ao final do experimento, avaliou-se, ainda, o comprimento dos entrenós, o número de gemas e o peso da matéria seca da parte aérea e das raízes das plantas. A porcentagem de sobrevivência também foi avaliada após um mês de permanência das plantas em casa de vegetação. Houve aumento na altura das plantas e no comprimento dos entrenós, proporcional ao tempo de sua permanência sob baixa temperatura. O frio provocou decréscimo no peso seco das raízes, porém não afetou a sobrevivência das plantas, o número de gemas e o peso da matéria seca da parte aérea.

Termos para indexação: *Malus prunifolia*, propagação vegetativa, micropropagação, dormência, cultura de tecidos, frio.

### Effects of low temperature application on apple plants over plant growth during acclimatization

Abstract – The present work aimed to evaluate the growth of shoots of a rootstock of the plant growth of the apple (*Malus prunifolia* Borkh, cv. Marubakaido) tree during the acclimatization process. After two weeks of acclimatization, the plantlets were transferred to a growth room and kept under temperature of  $4\pm 1^\circ\text{C}$ , 16-hour photoperiod at  $5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of radiation for 0, 240, 480, 720, 960, 1,200 and 1,440 hours. So, the plantlets were transferred to the greenhouse where their growth was evaluated every two weeks during 90 days. Internode length, bud number and dry matter weight of aerial part and roots were also evaluated at the end of the experiment. The percentage of plant survival was evaluated after a month in greenhouse. An increase was verified in the plant height and internode length proportional to the time kept under low temperature. Chill did not affect the plant survival, the bud number and the dry weight of aerial part, but it did affect the root dry weight.

Index terms: *Malus prunifolia*, vegetative propagation, micropropagation, dormancy, tissue culture, cold.

### Introdução

A propagação da macieira por meio do cultivo *in vitro* tem sido descrita por diversos autores

(Werner & Boe, 1980; Malavasi & Predieri, 1990). Além de proporcionar uma elevada taxa de multiplicação, o método permite uma rápida propagação de material vegetativo, com a possibilidade de produção durante todos os meses do ano. Contudo, como técnica de propagação, é necessário que seja adaptada conforme as necessidades de cada espécie e cultivar, pois estas diferem geneticamente entre si. Portanto, é de fundamental importância o conhecimento de todas as etapas envolvidas no processo (Debergh, 1988).

Entre as diferentes etapas da micropropagação, a aclimatização é uma das mais importantes. Durante

<sup>(1)</sup> Aceito para publicação em 6 de abril de 2000.

<sup>(2)</sup> Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Caixa Postal 354, CEP 96010-900 Pelotas, RS. E-mail: jscherwi@ufpel.tche.br

<sup>(3)</sup> Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, Caixa Postal 403, CEP 96001-970 Pelotas, RS. E-mail: gerson@cpact.embrapa.br

<sup>(4)</sup> UFPEL, Instituto de Física e Matemática. E-mail: jbsilva@ufpel.tche.br

as etapas *in vitro*, as plantas desenvolvem-se sob condições controladas de crescimento, tornando-se heterotróficas, com baixa ou nenhuma atividade fotossintética, e, quando sofrem o processo da aclimatização, estão sujeitas a um forte estresse ambiental, podendo ocorrer sua morte. Desta forma, para muitos autores, este processo, compreendido entre o transplante das plântulas produzidas *in vitro* e o total restabelecimento em casa de vegetação, é complexo, e, para algumas espécies, fator limitante na micropropagação (Wardle et al., 1983; Huylenbroeck & Debergh, 1996). Poucos pesquisadores têm investigado a transferência das plântulas de condições *in vitro* para a casa de vegetação. Além disso, em algumas variedades de macieira – entre elas a cultivar Marubakaido –, as plantas, quando transplantadas para casa de vegetação apresentam uma parada de crescimento, que pode perdurar por vários meses, chegando a formar gemas terminais escamosas, típicas de dormência, mesmo sob condições controladas de crescimento em casa de vegetação (Ribas & Zanette, 1992; Fortes et al., 1998).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da aplicação de baixa temperatura ( $4\pm 1^\circ\text{C}$ ), sobre o crescimento das brotações micropropagadas de um porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido, durante o processo de aclimatização.

### Material e Métodos

O trabalho foi realizado na Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, em Pelotas, RS, nos meses de novembro de 1997 a abril de 1998. Brotações do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia* Borkh.), oriundos do cultivo *in vitro*, com dois a três pares de folhas, e com 1,0 a 1,5 cm de comprimento, foram enraizadas, de acordo com o método proposto por Zanol et al. (1998), e transplantadas para casa de vegetação, em bandejas de semeadura, com substrato composto de terra de mato, vermiculita e esterco bovino, na proporção de 1:1:1, previamente esterilizado com brometo de metila.

Durante as duas primeiras semanas de aclimatização, as plantas foram mantidas sob duplo sombrite e irrigadas diariamente, procurando-se manter as folhas sempre úmidas. Após este período, as plantas foram então transferidas para uma câmara de crescimento, modelo Percival I-60, com temperatura de  $4\pm 1^\circ\text{C}$  e radiação de  $5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , du-

rante sete períodos distintos: 0, 240, 480, 720, 960, 1.200 e 1.440 horas. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados. Cada tratamento foi repetido seis vezes, e cada unidade experimental, constituída por dez plantas.

Após cada tratamento, as plantas retornaram para casa de vegetação, onde se avaliou, a cada duas semanas, o seu tamanho, compreendido entre a região do colo e a inserção da última folha, por um período de 90 dias. Ao final do período estudado, avaliou-se também o número de gemas, o comprimento dos entrenós e o peso da matéria seca das raízes e da parte aérea das plantas. A sobrevivência das plantas também foi avaliada após 30 dias de permanência em casa de vegetação.

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente com o auxílio do Sistema de Análise Estatística para microcomputadores (SANEST) (Zonta & Machado, 1984).

### Resultados e Discussão

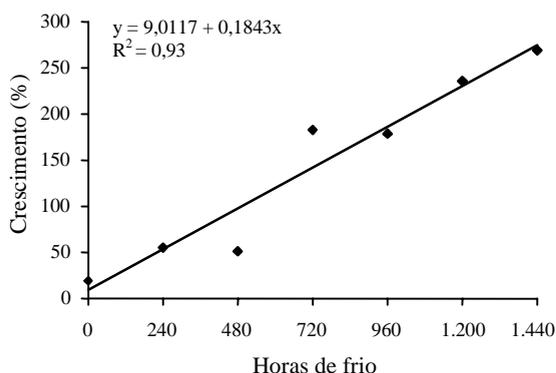
O transplante das plântulas das condições *in vitro* para a casa de vegetação, seguido dos respectivos tratamentos à baixa temperatura, não afetou significativamente ( $\alpha \leq 0,05$ ) sua sobrevivência, após 30 dias de aclimatização. A taxa média de sobrevivência observada foi de 72,64% nos diferentes tratamentos. Embora taxas acima de 90% já tenham sido observadas com a cultivar Marubakaido (Schuch, 1989), aspectos como tipo de substrato, alta umidade relativa e temperaturas amenas podem determinar a otimização desta fase (Grattapaglia & Machado, 1990). Além disso, a época do ano parece influenciar o sucesso desta prática. Segundo Werner & Boe (1980), os melhores resultados são alcançados no outono e no inverno.

A relação entre o crescimento das plantas e os tratamentos à baixa temperatura foi linear (Figura 1), com tendência de aumentar as diferenças de ganho em tamanho das plantas com o aumento do tempo de exposição à baixa temperatura. Assim, nas plantas-testemunhas, o aumento de tamanho, verificado entre o início e o final do experimento, foi de cerca de 18%. Já nas plantas submetidas a 240 até 1.440 horas de frio, o aumento médio em altura foi de, aproximadamente, 55% a 269%, respectivamente (Figura 1).

O efeito das baixas temperaturas por um período mais prolongado (2.500 horas) já havia sido revelado por Nichols et al. (1974), ocasionando maior

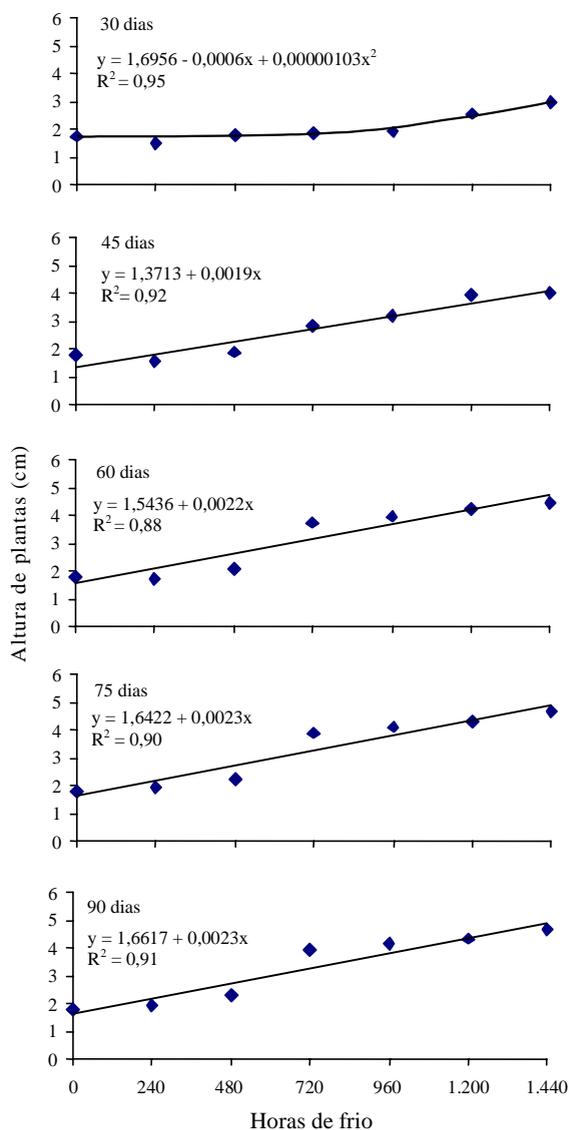
brotação e crescimento das mudas de macieira da cultivar Granny Smith. Ribas & Zanette (1992) também observaram os efeitos positivos das baixas temperaturas sobre o crescimento de mudas de macieira durante a aclimatização. Temperaturas de 2 a 4°C por 720 e 1.440 horas foram os tratamentos que proporcionaram os melhores resultados na eliminação das inibições do crescimento das plantas micropropagadas e cultivadas em casa de vegetação. Petri et al. (1996) mostraram que a exposição de mudas de macieira a temperaturas de 2 a 6°C durante períodos de 30 dias (720 horas) a 45 dias (1.080 horas), além de permitir uma brotação mais uniforme, proporciona maior crescimento das plantas. Estes mesmos autores afirmam que tratamentos acima de 30 dias são normalmente os mais recomendados, por proporcionarem maior crescimento das mudas de macieira e, conseqüentemente, melhorarem o vigor das plantas.

Diferenças significativas para a altura das plantas em relação às horas de frio só começaram a ser evidenciadas a partir dos 30 dias da avaliação, quando a curva referente ao tamanho das plantas apresentou um comportamento quadrático, nitidamente ascendente, para as plantas expostas a períodos prolongados de baixas temperaturas (Figura 2). Nas demais épocas as regressões ajustadas foram lineares e o acréscimo na altura das plantas foi de, aproximadamente, 0,2% em relação a cada aumento unitário das horas de frio (Figura 2).



**Figura 1.** Porcentagem final de crescimento das plantas do porta-enxerto de macieira Marubakaido, em razão de diferentes períodos de exposição à temperatura de 4±1°C. Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, Pelotas, RS.

Parece bastante evidente que o crescimento inicial deficiente das mudas de macieira provenientes do cultivo *in vitro* seja resultante das condições adversas que estas encontram no momento do transplante. Além do mais, questiona-se o estado funcional das raízes no que diz respeito à nutrição

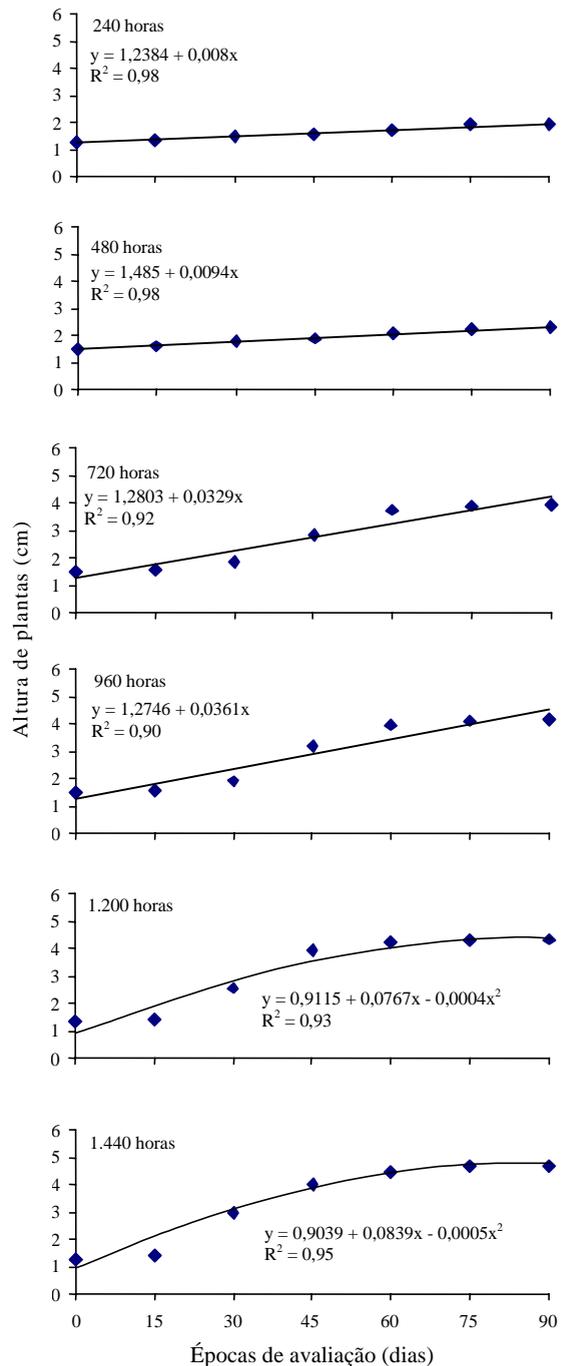


**Figura 2.** Efeito da temperatura de 4±1°C sobre a altura das plantas em razão do período de frio, em cada período de avaliação. Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, Pelotas, RS.

das plantas logo após o transplante. Conforme Debergh & Maene (1981), raízes formadas *in vitro* são pouco funcionais, por não apresentarem pêlos radiculares, além de propiciarem conexão vascular pobre com a parte aérea das plantas, resultando numa restrita transferência de água e nutrientes para a parte aérea. Istambouli & Neville (1977) observaram que mudas de oliveira são facilmente induzidas a pararem o crescimento em casa de vegetação, se houver carência em sais minerais. No momento em que estas plantas voltam a ser supridas com solução nutritiva, retornam ao crescimento. Embora não se tenha testado outro tipo de tratamento, é possível que um suplemento mineral possa melhorar o crescimento delas em casa de vegetação.

Nas plantas-testemunhas, não se observou ajuste significativo quando se estudou a altura das plantas em razão das épocas de avaliação, nos diferentes tratamentos com frio. No que diz respeito às plantas submetidas a 240 e 480 horas de frio, o ajuste indicou regressões lineares crescentes, em que o acréscimo no tamanho das plantas foi de 0,8% e 0,94%, respectivamente; nas plantas submetidas a 720 e 960 horas de frio, o acréscimo no tamanho das plantas, em função da época de avaliação, foi de 3,3% e 3,6%, respectivamente. Finalmente, nas plantas tratadas com 1.200 e 1.440 horas de frio, houve ajuste para as regressões quadráticas em que se observa, em ambos tratamentos, uma desaceleração no crescimento a partir dos 60 dias de avaliação (Figura 3).

Além de proporcionar um maior crescimento das plantas, o frio afetou significativamente o alongamento dos entrenós. Entretanto, tais diferenças não foram observadas ( $\alpha \leq 0,05$ ) quanto ao número de gemas formadas, em relação ao período de avaliação final (Tabela 1). O aumento no comprimento dos entrenós com o aumento da permanência das plantas sob baixa temperatura foi linear (Figura 4). Nas plantas-testemunhas e nas que receberam 240 horas de frio, observou-se a formação de uma estrutura de roseta de folhas, sintoma característico de deficiente alongamento de entrenós. Nos demais tratamentos, houve maior alongamento, proporcionando melhor distribuição das folhas ao longo das plantas. Crabbé & Barnola (1996) citam que um rápido acúmulo de folhas jovens apresenta um efeito inibitório, sobre o alongamento dos entrenós, que



**Figura 3.** Efeito da temperatura de  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  sobre a altura das plantas em razão dos períodos de avaliação, em cada tratamento de frio. Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, Pelotas, RS.

pode anular a organogênese e, conseqüentemente, provocar uma parada por completo no crescimento da planta. Neste trabalho, observou-se, nas plantas-testemunhas, este comportamento. Tal fato pode ser uma indicação de que as folhas formadas durante a aclimatização apresentam algum efeito inibitório sobre o crescimento. Pelo fato de não se terem realizado testes bioquímicos para detectar possíveis substâncias inibidoras envolvidas, é impossível afirmar que estas folhas, em forma de rosetas, poderiam ser a causa da inibição do crescimento das plantas em casa de vegetação.

De acordo com Champagnat (1992), baixas temperaturas, além de provocarem a mobilização de reservas, são responsáveis pelo aumento dos níveis endógenos de giberelinas nas plantas. Um aporte na concentração de giberelinas poderia ser a causa do retorno ao crescimento das plantas, após determinado período de dormência (Pereira et al., 1999). Embora existam controvérsias sobre o aumento dos níveis de giberelinas ser um efeito ou uma causa da quebra de dormência, é bastante evidente a ação deste regulador sobre o crescimento das plantas. Conforme Metivier (1985) os efeitos mais pronunciados das giberelinas aparecem no crescimento, especialmente no alongamento do caule. Segundo este mesmo autor, plantas submetidas a baixas temperaturas apresentam aumento nos níveis endógenos de giberelinas, causando maior alongamento dos entrenós. Esses resultados poderiam explicar o fato de plantas tratadas com baixas temperaturas terem apresentado maior alongamento nos entrenós, sugerindo, assim, que o

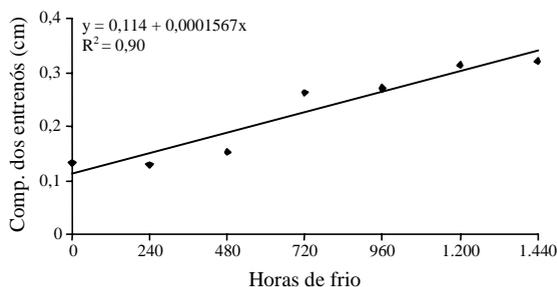
frio atua sobre a síntese deste regulador na planta.

Se para alguns autores (Young & Werner, 1985; Arnould & Young, 1990) o tratamento das plantas com baixas temperaturas afeta positivamente o crescimento do sistema radicular, no presente trabalho observou-se uma diminuição no peso seco das raízes com o aumento do tempo de permanência das plantas sob baixa temperatura. Entretanto, os tratamentos não afetaram significativamente ( $\alpha \leq 0,05$ ) o peso da matéria seca da parte aérea das plantas ao final dos 90 dias de avaliação (Figura 5).

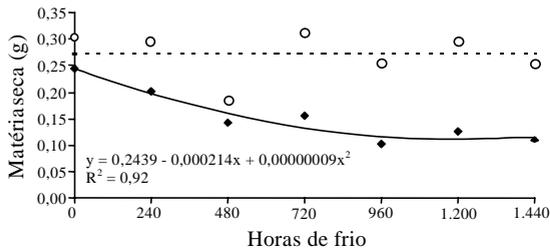
Na literatura não há dados significativos provando a existência de dormência em raízes. Entretanto, as extremidades radiculares podem cessar o crescimento quando são expostas a condições desfavoráveis, como baixas temperaturas ou deficiência hídrica (Cottignies, 1987). Contudo, o crescimento é reativado logo que as condições tornam-se novamente favoráveis. Arnould & Young (1990) afirmam que o tratamento de plantas com temperatura de 5°C, seguido da sua transferência para condições de temperatura mais elevada (20°C), promove maior crescimento do sistema radicular. Para estes autores, um dos efeitos do frio é a mobilização de reservas das plantas, que pode estar relacionada ao crescimento das plantas no final do período dormente. Para Aspúria & Fujime (1995), um aumento no peso seco das raízes, seguido de diminuição da taxa de crescimento da parte aérea, é normalmente observada quando as plantas estão entrando em dormência. Por outro lado, uma indicação da saída do estado dormente de uma planta é quando ocorre aumento na taxa de cres-

**Tabela 1.** Número médio de gemas formadas em plantas da cultivar de macieira Marubakaido, em razão de diferentes tratamentos com temperatura de  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ , após 90 dias em casa de vegetação. Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, Pelotas, RS.

Exposição (horas)	Gemas ( $n^\circ$ )
0	12,08 $\pm$ 1,08
240	11,35 $\pm$ 1,18
480	13,25 $\pm$ 1,39
720	12,82 $\pm$ 1,21
960	13,09 $\pm$ 1,52
1.200	11,99 $\pm$ 1,18
1.440	12,75 $\pm$ 0,56



**Figura 4.** Comprimento dos entrenós de plantas do porta-enxerto de macieira Marubakaido, em razão de diferentes períodos de exposição à temperatura de  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ . Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, Pelotas, RS.



**Figura 5.** Peso da matéria seca das raízes (◆) e parte aérea (○) de plantas do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' em razão de diferentes períodos de exposição à temperatura de  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, Pelotas, RS.

cimento da parte aérea, seguido por uma diminuição no peso seco das raízes. Como as plantas deste experimento apresentaram diminuição no peso seco das raízes com relação ao aumento do período sob baixa temperatura, após 90 dias de permanência em casa de vegetação, sugere-se que tenham se utilizado das reservas mobilizadas durante os tratamentos com frio, nos seus diferentes órgãos, inclusive das raízes, para promover o crescimento da parte aérea, em detrimento do sistema radicular. Entretanto, outras pesquisas são necessárias para melhor compreender este comportamento.

### Conclusões

1. A sobrevivência do porta-enxerto de macieira Marubakaido, durante a aclimatização, não é afetada pelo tratamento com baixa temperatura.
2. O aumento médio da altura e do comprimento dos entrenós das plantas do porta-enxerto de macieira Marubakaido recém-aclimatizadas e mantidas a  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$  é proporcional ao tempo do tratamento.
3. Baixa temperatura em plantas do porta-enxerto de macieira Marubakaido proporciona diminuição no peso da matéria seca das raízes, sem afetar o peso da matéria seca da parte-aérea e o número de gemas destas plantas, após 90 dias em casa de vegetação.

### Referências

ARNOULD, M. A.; YOUNG, E. Growth and protein content of apple in response to root and shoot temperature following chilling. *HortScience*, Alexandria, v. 25, n. 12, p. 1583-1588, 1990.

ASPURIA, J. R.; FUJIME, Y. Eco-physiological studies in the analysis of dormancy in strawberry. *Acta Horticulturae*, Leuven, v. 395, p. 97-104, 1995.

CHAMPAGNAT, P. Dormance des bourgeons chez les végétaux ligneux. In: CÔME, D. (Ed.). *Les végétaux et le froid*. Paris : Hermann, 1992. p. 203-260.

COTTIGNIES, A. Dormance. *Annales des Sciences Naturelles Botanique*, Paris, v. 8, n. 3/4, p. 93-142, 1987.

CRABBÉ, J.; BARNOLA, B. A new conceptual approach to bud dormancy in woody plants. In: LANG, G. A. (Ed.). *Plant dormancy: physiology, biochemistry and molecular biology*. London : CAB International, 1996. p. 83-113.

DEBERGH, P. C. Micropropagation of woody species state of the art on *in vitro* aspects. *Acta Horticulturae*, Leuven, v. 227, p. 287-295, 1988.

DEBERGH, P. C.; MAENE, L. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 14, p. 335-345, 1981.

FORTES, G. R. L.; PEREIRA, J. E. S.; SILVA, J. B. da. **Efeito do frio em brotações *in vitro* de macieira sobre o alongamento dos entrenós no período de aclimatização**. Pelotas : Embrapa-CPACT, 1998. p. 1-4. (Embrapa-CPACT. Pesquisa em Andamento, 36).

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília : Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas/Embrapa-CNPq, 1990. p. 99-169.

HUYLENBROECK, J. M. van; DEBERGH, P. C. Physiological aspects in acclimatization of micropropagated plantlets. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, Rehovot, v. 2, n. 3, p. 136-141, 1996.

ISTAMBOULI, A.; NEVILLE, P. Nature des périodes de repos des bourgeons de jeunes plants issus de semis ou de boutures, chez *Olea europaea* L. *Ecologia Mediterranea*, Paris, v. 3, p. 151-158, 1977.

MALAVASI, F. F. F.; PREDIERI, S. Cultivar dependent responses to regeneration from leaves in apple. *Acta Horticulturae*, Leuven, v. 280, p. 61-68, 1990.

METIVIER, J. R. Dormência e germinação. In: FERRI, M. G. (Ed.). *Fisiologia vegetal*. São Paulo : Ed. Pedagógica e Universitária, 1985. v. 2, p. 343-392.

NICHOLS, D. C.; JONES, D. L.; THOMPSON, W. K. Effects of Autumn on the induction of dormancy in apple

- and peach seedlings and their subsequent regrowth in spring. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 25, p. 899-907, 1974.
- PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L.; SILVA, J. B. da. Effect of gibberellic acid on one-year apple rootstock plant growth in the greenhouse. **HortScience**, Alexandria, v. 34, n. 3, p. 493, 1999.
- PETRI, J. L.; PALLADINI, L. A.; SCHUCK, E.; DUCROQUET, J. P. H. J.; MATOS, C. S.; POLA, A. C. **Dormência e indução da brotação de fruteiras de clima temperado**. Florianópolis : EPAGRI, 1996. 110 p. (EPAGRI. Boletim Técnico, 75).
- 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**, Cruz das Almas, v. 14, n. 2, p. 145-152, 1992.
- SCHUCH, M. W. **Micropropagação da macieira, cultivares Marubakaido (*Malus prunifolia*) e Megumi (*Malus domestica*, Borkh)**. Pelotas : UFPel, 1989. 98 p. Dissertação de Mestrado.
- WARDLE, K.; DOBBS, E. B.; SHORT, K. C. *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. **American Society for Horticultural Science Journal**, Alexandria, v. 108, n. 3, p. 386-389, 1983.
- WERNER, E. M.; BOE, A. A. *In vitro* propagation of Malling 7 apple rootstock. **HortScience**, Alexandria, v. 15, n. 4, p. 509-510, 1980.
- YOUNG, E.; WERNER, D. J. Effects of shoot, root and shank chilling during rest in apple and peach on growth resumption and carbohydrates. **American Society for Horticultural Science Journal**, Alexandria, v. 110, p. 769-774, 1985.
- ZANOL, G. C.; FORTES, G. R. L.; CAMPOS, A. D.; SILVA, J. B. da; CENTELLAS, A. Q. Enraizamento *in vitro* e atividade da peroxidase do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' tratado com ácido indolbutírico e floriglucinol. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 10, n. 1, p. 65-68, 1998.
- ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **SANEST: Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores**. Pelotas : UFPel, 1984. 138 p.