

# Aclimação de mudas produzidas *in vitro* e *in vivo*

Alexandre Hoffmann<sup>1</sup>

Resumo - Na medida em que ocorrem avanços nos sistemas de propagação, cada vez mais são utilizadas estruturas que possibilitam o controle efetivo das condições de temperatura, luminosidade, umidade relativa do ar, assepsia e características do substrato, dentre outras. Se por um lado são inegáveis os resultados positivos do controle do ambiente de propagação, não se pode descartar a ocorrência de problemas decorrentes das diferenças, cada vez maiores, em relação ao ambiente que a planta encontrará ao ser colocada no local de produção. A aclimação é a etapa final da produção de mudas, podendo ocorrer grandes perdas se não for dada a atenção necessária quando da retirada da muda do ambiente primário de propagação. Tanto os métodos convencionais de propagação quanto os *in vitro* necessitam de uma aclimação eficiente e um manejo adequado.

Palavras-chave: Condição ambiental; Reprodução vegetal; Propagação; Sombreamento.

## INTRODUÇÃO

A aclimação, ou aclimatização, compreende o conjunto de técnicas e procedimentos que têm por objetivo adaptar as mudas às condições ambientais do viveiro ou do pomar, reduzindo o estresse, devido à transferência ou repicagem da muda. A aclimação é, portanto, a etapa final da produção de mudas e, para tanto, o viveirista deve dar a devida atenção, para que a perda de mudas e de investimentos no processo de produção seja a menor possível. Descuidos na aclimação da muda podem acarretar, desde o atraso e/ou diminuição do crescimento da planta, até a morte dela após o seu transplante para o viveiro ou pomar. Os prejuízos decorrentes desses descuidos são variáveis conforme a espécie, o manejo da muda durante a propagação, a sanidade do material propagativo e o método de propagação utilizado.

A maior quantidade de informações sobre aclimação encontrada na literatura diz respeito à propagação *in vitro*, já que é nesta situação que ocorrem as maiores

perdas de mudas, quando da retirada do ambiente primário de propagação. Entretanto, também deve ser dada atenção à aclimação quando da propagação através de métodos convencionais, como a propagação por sementes, estaquia, enxertia e mergulhia.

## ACLIMATAÇÃO NA PROPAGAÇÃO POR MÉTODOS CONVENCIONAIS

Embora haja relativamente poucas referências na literatura a respeito da aclimação, quando utilizados métodos convencionais de propagação, devem-se tomar alguns cuidados para que o estresse devido à transferência da muda para o viveiro ou mesmo para o pomar seja o menor possível. Em geral, o maior efeito da aclimação ineficiente, neste caso, não provoca a morte da muda, mas o seu lento desenvolvimento inicial.

Os principais fatores que implicam o uso de técnicas de aclimação, quando as mudas são produzidas por métodos convencionais, são:

- a) o substrato de produção da muda pode diferir grandemente em características físicas e químicas do solo do viveiro ou do pomar;
- b) o ambiente da estufa com nebulização intermitente apresenta alta umidade relativa do ar, ausência de ventos e temperatura controlada, condições bastante diferentes do ambiente externo. Esta diferença entre condições ambientais pode provocar um estresse devido ao transplante, em intensidade variável, conforme a espécie e o método de propagação;
- c) mudas obtidas por estacas em geral podem apresentar certa dificuldade de crescimento no viveiro ou no pomar devido ao fato de que, muitas vezes, as raízes adventícias são pouco funcionais para absorção de água e nutrientes. Isso pode levar a uma parada de crescimento logo após o transplante, o que é, na verdade, uma manifestação do estresse sofrido pela muda nesta etapa. O volume de raízes adventícias formadas em uma estaca é um aspecto fundamental para o

<sup>1</sup>Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup>, D.Sc., Pesq. Embrapa Uva e Vinho, Caixa Postal 130, CEP 95700-000 Bento Gonçalves-RS. Correio eletrônico: hoffmann@cnpuv.embrapa.br

crescimento posterior. Por isso, devem-se dar as melhores condições possíveis para o desenvolvimento destas raízes, ainda no substrato de enraizamento, para que a adaptação ao viveiro ou ao pomar seja a melhor possível. Mudanças provenientes de sementes, por via de regra, apresentam menores problemas de aclimatização do que mudanças oriundas de propagação vegetativa.

Entre as técnicas que visam diminuir o estresse durante a aclimatização, podem ser citadas: o uso da irrigação, a redução da área foliar, o sombreamento (telado ou ripado) e a repicagem intermediária. O efeito e a necessidade de adoção de uma ou mais técnicas estão diretamente relacionados com a sensibilidade da espécie, tipo de muda (torrão ou raiz nua), estado fisiológico da muda (dormente ou em atividade vegetativa) e condições ambientais da época de plantio.

### Irrigação

A irrigação é uma prática fundamental e obrigatória, quando do transplante, pois a água é indispensável para o crescimento da muda. Durante o transplante, há baixa absorção de água pelas raízes, devido ao pequeno volume radicular da muda, à perda de raízes no transplante e à perda de água por transpiração sem uma contrapartida em absorção pelas raízes. Logo após o transplante, é fundamental molhar o solo com abundância, visando fornecer água para a muda, e assentar o solo em torno das raízes, diminuindo os espaços com ar que podem ocasionar a desidratação, principalmente das raízes de menor diâmetro.

### Redução da área foliar

A redução da área foliar é utilizada principalmente em espécies perenifólias, no geral espécies de climas subtropical e tropical, se o transplante é realizado sob temperaturas elevadas e baixos valores de umidade relativa do ar. O objetivo desta redução é diminuir a superfície foliar onde ocorre a maior parcela de perda de água, logo após o transplante, favorecendo tanto o pegamento quanto o crescimento inicial.

Entretanto, pode-se fazer o corte das folhas ao meio, bem como retirar parte delas mantendo inteiras as remanescentes. Esta redução da área foliar deve ser feita com moderação, de modo que não limite o crescimento devido à diminuição da área fotosinteticamente ativa.

### Sombreamento

O sombreamento é uma das técnicas de aclimatização mais utilizadas na propagação através de métodos convencionais. Com a manutenção da muda sob insolação parcial, são reduzidas a temperatura da folha e a perda de água desta, facilitando a aclimatização.

O período de permanência em telado é variável conforme a espécie, mas deve ser o mínimo suficiente para conferir à planta uma boa adaptação, sem comprometer o crescimento da muda. O sombreamento pode ser feito sob telado ou sob ripado e é adotado para muitas espécies, principalmente quando a muda é produzida em casa de vegetação. Em espécies mais sensíveis, não apenas é necessária a manutenção em telado, logo após a retirada da muda da casa de vegetação, como também é favorável a manutenção da muda, sob meia-sombra, após o transplante no pomar.

### Repicagem intermediária

A repicagem intermediária refere-se especialmente ao caso em que a propagação é feita por estacas em casa de vegetação e em substrato especial para o enraizamento. Se a muda é levada diretamente do substrato para o viveiro ou pomar, cria-se um estresse que pode comprometer a sobrevivência dela. Desse modo, recomenda-se fazer uma repicagem em recipientes (em geral sacos plásticos), mantendo as mudas em telado por um determinado tempo, suficiente para sua adaptação. Em seguida, a muda pode ser transplantada com torrão ou mesmo com raiz nua.

### ACLIMATAÇÃO NA PROPAGAÇÃO POR CULTURA DE TECIDOS

A aclimatização é indispensável para a obtenção de uma planta propagada por

meio de cultura de tecidos. Neste caso, normalmente utiliza-se o termo aclimatização, que é a fase ou estágio da micropropagação em que ocorre a transferência das mudas produzidas *in vitro* para o ambiente natural ou um ambiente de transição, como uma casa de vegetação ou telado.

Para muitas espécies, a aclimatização é considerada uma fase crítica da micropropagação. Frequentemente, um dos maiores obstáculos à aplicação prática dos métodos de cultura de tecidos, na propagação de plantas, é a dificuldade de transferir com sucesso as mudas da condição *in vitro* para o solo, devido à grande diferença entre as condições ambientais do laboratório, onde as mudas são produzidas, e o campo. O controle de um fator que favorece a sobrevivência e o crescimento da muda após sua retirada da sala de crescimento causa outros problemas, caracterizando um ciclo vicioso que acarreta (Fig. 1), em última análise, a necessidade de intervenções constantes e um manejo equilibrado dos fatores que interferem na aclimatização. O sucesso da transferência de plantas micropropagadas para a casa de vegetação é essencial para um sistema de micropropagação bem-sucedido.

Há diversos fatores envolvidos na aclimatização de mudas micropropagadas e é a interação e o manejo adequado deles que irão condicionar o sucesso deste estágio. Dentre outros, os fatores de maior importância são:

- genótipo (espécie e/ou cultivar);
- estresse hídrico sofrido pela muda em função da diminuição da umidade relativa do ar e da sensibilidade da planta devido à sua formação em ambiente saturado de água;
- alteração do metabolismo heterotrófico (dependente de fonte de carbono e energia colocados no meio de cultura) para autotrófico (dependente da fixação de carbono e obtenção de energia através da fotossíntese);
- infecção por patógenos, devido ao ambiente asséptico em que as mudas são formadas;

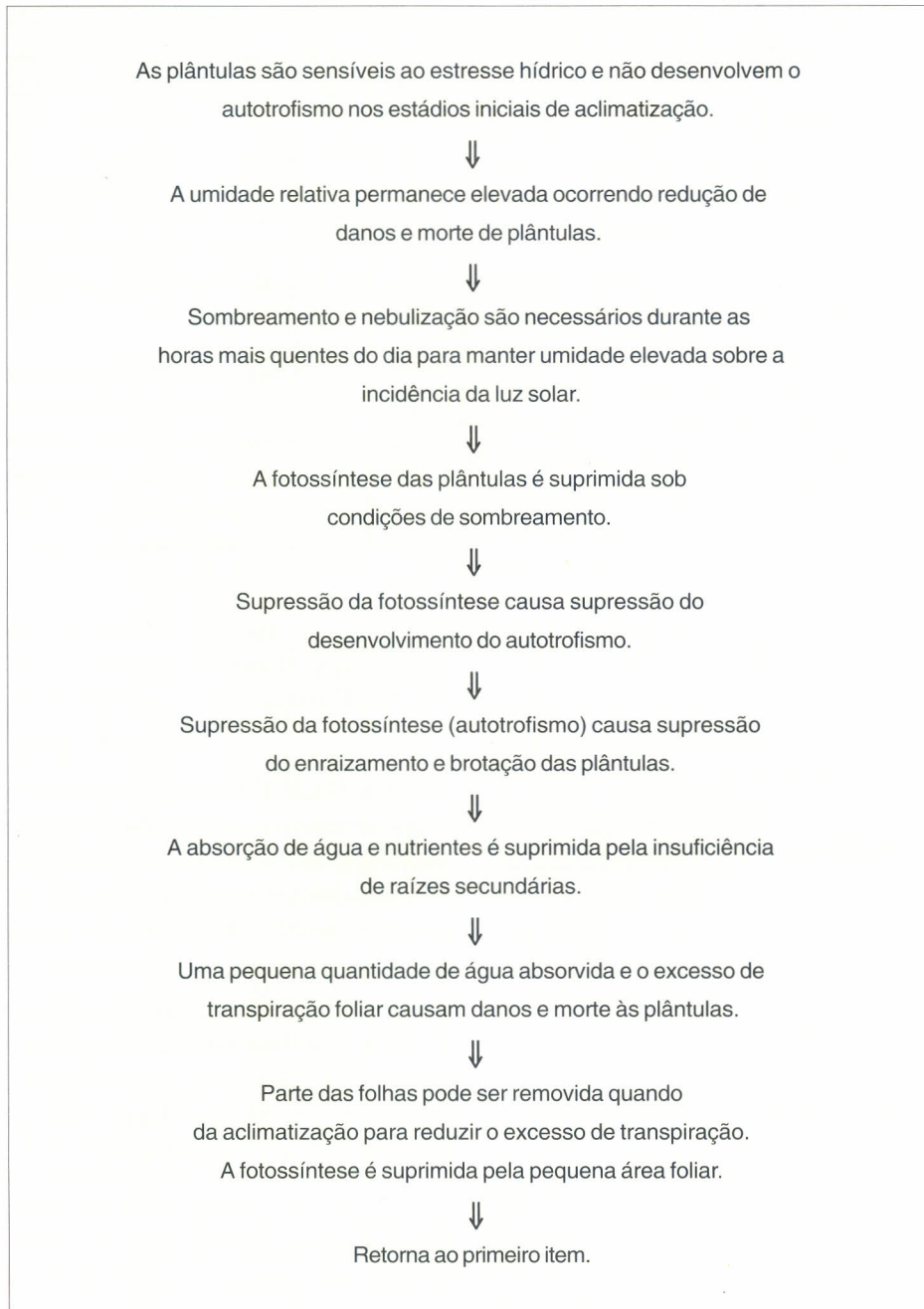


Figura 1 - Ciclo vicioso do controle do ambiente na aclimação convencional

FONTE: Kozai (1991).

o murchamento das mudas após a transferência para o solo.

O segundo fator, em ordem de importância, é a mudança do metabolismo heterotrófico para autotrófico. As plantas *in vitro* possuem metabolismo do carbono predominantemente heterotrófico, sendo a sacarose do meio de cultura a principal fonte de carbono e energia para o crescimento e desenvolvimento *in vitro*. Somam-se a este fator, a baixa luminosidade na sala de crescimento e o baixo teor de CO<sub>2</sub> disponível na atmosfera do frasco de cultivo, o que limita a taxa fotossintética. O cultivo autotrófico (sem açúcar no meio de cultura) apresenta muitas vantagens sobre o heterotrófico, tais como menor contaminação, menor vitrificação, menor uso de mão-de-obra e maior adaptabilidade à automatização. A utilização de selamentos permeáveis a trocas gasosas em frascos de cultura também pode estimular o desenvolvimento da fotoautotrofia *in vitro*.

Há vários métodos que podem ser empregados para a aclimação de mudas micropropagadas. Em uma mesma situação, podem ser empregados diversos métodos, especialmente quando a espécie é mais sensível a esta fase da micropropagação. Na técnica convencional de aclimação, após o enraizamento *in vitro* em substrato com ágar, procede-se a repicagem para o solo ou outro substrato sob túnel ou nebulização, para inicialmente manter o ambiente com alta umidade relativa do ar, reduzindo-a posteriormente de forma gradativa. O período de aclimação em geral dura de uma a quatro semanas, conforme a espécie e a técnica adotada, que pode ser agrupada em três classes:

#### a) métodos que aproximam as condições *in vitro* das naturais

Esta classe inclui diversas técnicas, que, de modo geral, proporcionam a pré-aclimação. Dentre elas, podem ser citados:

- uso de redutores da umidade relativa do ar no interior do recipiente de cultura, tais como parafina e sílica-gel e de indutores de estresse hídrico controlado, como o polietileno

e) estresse pela luz, devido à baixa luminosidade encontrada no interior de salas de crescimento em relação ao ambiente externo.

Desses fatores, a perda excessiva de água pelas mudas produzidas *in vitro* é apontada como um dos principais. O estresse hídrico é, normalmente, a principal causa do estresse sofrido por plantas produzidas assepticamente. A perda de água é maior

em plantas produzidas *in vitro* do que em plantas já aclimatizadas ou mantidas em casa de vegetação. Este estresse hídrico é devido principalmente à pequena quantidade de cera epicuticular e ao lento mecanismo de fechamento e abertura dos estômatos. Portanto, a redução da umidade relativa do ar, ainda no laboratório, aumenta a capacidade de resposta dos estômatos, a deposição de ceras epicuticulares e reduz

leno-glicol (PEG), os quais induzem uma resposta estomática mais intensa, bem como favorecem a elaboração de ceras epicuticulares;

- uso de substratos alternativos ao ágar, como a vermiculita, areia ou substratos comerciais, de modo que proporcionem raízes mais ramificadas e de melhor qualidade para tolerar a aclimatização;
- favorecimento de trocas gasosas através do selamento permeável dos recipientes de cultura;
- enriquecimento da atmosfera do recipiente com CO<sub>2</sub>, normalmente associado ao aumento da intensidade luminosa na sala de crescimento e à redução da concentração de sacarose no meio de cultura.

#### b) métodos que aproximam as condições naturais daquelas *in vitro*

Nesta classe, podem ser mencionados:

- uso de ambientes com elevada umidade relativa do ar (acima de 90%), através do uso de nebulização intermitente ou de coberturas plásticas ou de vidro sobre o recipiente de aclimatização (estufim), com posterior redução gradativa da umidade do ar, após passado o período crítico inicial;
- sombreamento no local onde estão as plantas em aclimatização;
- manutenção da sanidade do ambiente e das mudas, através do uso de fungicidas, inseticidas e acaricidas, bem como pelo uso de higienizações periódicas do ambiente;
- uso de sistemas automatizados em unidades de aclimatização.

#### c) métodos que favorecem o crescimento das mudas após a aclimatização

Estão incluídos nesta classe:

- enraizamento *ex vitro* ou *in vivo*, no qual, ao invés do enraizamento ocorrer dentro do frasco de cultu-

ra, retira-se a brotação e induz-se o enraizamento em ambiente com sistema de nebulização e sombreamento associados;

- escolha do substrato adequado, que apresente boas condições de drenagem, aeração e esterilidade;
- uso de adubações foliares após a fase inicial de aclimatização;
- uso de micorrizas, visando incrementar a superfície de raízes com atividade de absorção;
- uso de antitranspirantes, substâncias que, aplicadas à superfície da folha, reduzem a perda de água. Estes produtos, entretanto, têm sua aplicação limitada devido à redução nas trocas gasosas necessárias para realização da fotossíntese;
- uso de inoculantes de bactérias fixadoras de nitrogênio, no caso de leguminosas.

### REFERÊNCIA

KOZAI, T. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Ed.). **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. 484p.

### BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. H. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 106, n.4, p.515-518, July 1981.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture – part 1: the technology**. 2.ed. Edington: Exegetics, 1993. 786p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. v.1, p.183-260.

GRIBAUDO, I.; FRONDA, A. L'ambientamento delle piante frutticole micropropagate. **Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura**, Bologna, v.51, n.1, p.75-80, 1993.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JUNIOR, F.T. **Plant propagation: principles and practices**. 5.ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1990. 647p.

KOZAI, T.; KOYAMA, Y.; WATANABE, I. Multiplication of potato plantlets *in vitro* with sugar free medium under high photosynthetic photon flux. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.230, p.121-127, 1988.

LEITE, G.B. **Efeito de reguladores de crescimento, substratos, sacarose e intensidade luminosa na micropropagação de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Bartlett e do clone OH x 97**. 1995. 50f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

PIERIK, R.L.M. Handicaps for the large scale commercial application of micropropagation. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.230, p. 63-71, 1988.

PREECE, J.E.; SUTTER, E.G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Ed.). **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p.71-93.

SERRET, M. D. et al. Development of photoautotrophy and photoinhibition of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.45, n.1, p.1-16, Apr. 1996.

\_\_\_\_\_. The effect of different closure types, light and sucrose concentrations on Carbon isotope composition and growth of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation and subsequent acclimation *ex vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.47, n.3, p.217-230, Jan. 1997.

SUTTER, E.G.; HUTZELL, M. Use of humidity tents and antitranspirants in the acclimatization of tissue-cultured plants to the greenhouse. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.23, n.4, p.303-312, 1984.

WARDLE, K.; DOBBS, E.B.; SHORT, K.C. *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.108, n.3, p.386-389, May 1983.