

SEMEADURA *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE PLÂNTULAS DE CARAMBOLEIRA¹

Núbia Pereira da COSTA²
Carlos Ferreira DAMIÃO FILHO³
Nivânia Pereira da COSTA²
Jacinto de Luna BATISTA⁴

RESUMO: O comportamento germinativo *in vitro* é variável em função de cada espécie. Para tanto, este trabalho tem a finalidade de verificar como ocorre esse processo, além de definir uma metodologia de aclimatização de plântulas de caramboleira obtidas *in vitro*. O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) UNESP, Jaboticabal (SP). As sementes obtidas de frutos maduros da cultivar B-10 pertencentes ao pomar da FCAV/UNESP foram descontaminadas com álcool 70% e hipoclorito 30% (p/v) e postas para germinar em meio MS_{1/2}, com e sem adição de 2 mL.L⁻¹ de anticontaminante PPM. As plântulas obtidas *in vitro* foram testadas para aclimatização em duas épocas, com 1-2 dias (3,0 cm) e com 5-6 dias (4,5 cm) após a germinação das sementes. Verificou-se que a semeadura *in vitro* é um processo viável para obtenção de plântulas de caramboleira e que plântulas com 1-2 dias após germinação *in vitro* não sobrevivem, enquanto plântulas com 5-6 dias após a germinação apresentaram 98% de sobrevivência durante a aclimatização.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: *Averrhoa Carambola*, Germinação, Micropropagação, Sobrevivência.

IN VITRO CULTURE AND ACLIMATIZATION OF STAR FRUIT SEEDLING

ABSTRACT: The *in vitro* germinative behavior is variable among species. The objective of this work was to check how this process takes place and define an acclimatization methodology for *in vitro* *Averrhoa carambola* germination. The experiment was developed in the Tissue Culture Laboratory of the Agrarian and Veterinary Faculty (FCAV), UNESP, Jaboticabal, SP, Brazil. The seeds were obtained from mature fruits of B-10 cultivar from the FCAV/UNESP orchard, cleaned with 70% alcohol and

¹ Aprovado para publicação em 28.06.07

Trabalho extraído da Tese de Doutorado do primeiro autor. Apresentado a Universidade Estadual Paulista-UNESP, Jaboticabal (SP). Desenvolvido com apoio da FAPESP.

² Engenheira Agrônoma, Dra., Universidade Federal da Paraíba. Centro de Ciências Agrárias - CCA/UFPB, Campus II. Areia (PB). 58397-000. E-mail: nubiacostan@yahoo.com.br, npcosta@cca.ufpb.br

³ Engenheiro Agrônomo, Professor do Depto. Biologia Aplicada à Agropecuária, FCAV/UNESP. 14884-900. Jaboticabal (SP). E-mail: damiao@fcav.unesp.br

⁴ Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor do Depto. Fitotecnica, CCA-UFPB. Areia (PB). E-mail: jacinto@cca.ufpb.br

30% hypochlorite. The seeds were incubated on MS_{1/2} medium supplemented and not supplemented with 2mLL⁻¹ of preservative PPM. The seedlings obtained *in vitro* were tested for acclimatization in two different times 1-2 days (3, 0 cm) and 5-6 days (4-5 cm) after seed germination. It was concluded that *in vitro* culture is a viable process to obtain *A. carambola* seedlings. Seedlings 1-2 days old after germination showed 98% of survival during acclimatization.

INDEX TERMS: *Averrhoa carambola*, Germination, Micropropagation, Survival.

1 INTRODUÇÃO

A caramboleira (*Averrhoa carambola* L.) pertence à família Oxalidaceae, é originária da Ásia, adaptada às condições dos trópicos. No Brasil, foi introduzida em 1817 na região Nordeste, mais precisamente em Pernambuco, dali a espécie teria se espalhado por todo o litoral brasileiro. Sua multiplicação, de forma geral, é realizada por sementes com mudas de pé-franco, o que apresenta o inconveniente de originar pomares desuniformes devido à grande variabilidade genética apresentada pelas plantas propagadas por esse método. De acordo com Sekiya e Cunha (1999), o cultivo da caramboleira ainda está sendo realizado com baixa tecnologia, principalmente com relação à propagação, que geralmente é feita por semente e comercialmente por enxertia, apresentando, no entanto, alguns inconvenientes, tornando-se necessário testar outros métodos como a micropropagação.

A semeadura *in vitro* tem como principal objetivo a obtenção de explantes juvenis e assépticos para o estabelecimento de explantes *in vitro*, principalmente quando se trabalha com espécies lenhosas

que, de forma geral, apresentam dificuldades de estabelecimento quando a fonte de explante é a planta adulta. Pode representar, também, uma importante ferramenta para obtenção de plântulas de algumas espécies que apresentam dificuldade de germinar, como, também, nas técnicas de microenxertia *in vitro*.

Para algumas espécies essa técnica não é viável, uma vez que as sementes sequer chegam a germinar. É o caso de sementes intactas de freixo (*Fraxinus ornus*) que apresentaram apenas 7% de germinação, enquanto as de sorva (*Sorbus domestica*) não germinaram (ARRILLAGA; MARZO; SEGURA, 1992) e da fruteira-do-conde (*Annona squamosa*), em que a semeadura *in vitro* em meio MS_{1/2}, sem tratamento de quebra de dormência, não resultou em germinação (COSTA, 2003).

A aclimatização é o processo pelo qual plântulas produzidas em condições controladas são transferidas para um ambiente com as condições climáticas naturais. Essas novas condições devem ser assimiladas progressivamente, de forma que as plântulas sofram menos estresses, que

podem culminar em injúrias profundas ou mesmo em morte (SILVA et al., 1995). A definição de um processo de aclimatização de plântulas produzidas *in vitro* é um aspecto dos mais importantes para o sucesso da micropropagação.

Foi demonstrado que os estresses sofridos pelas plântulas afetam todos os parâmetros de crescimento. Aston e Grout (1977) citam que o número de folhas e área foliar são bons indicativos para se verificar a capacidade das plântulas de se autos-sustentarem durante a aclimatização. A não obtenção desta capacidade implica em prejuízos fisiológicos com estagnação aparente. Sutter e Langhans (1980) verificaram que, além da ineficiência fotossintética, as folhas das plântulas desenvolvidas *in vitro* também possuem menor quantidade de cera epicuticular do que as plantas crescidas em casa de vegetação, fato que acarreta em transpiração excessiva aliada à redução do número de estômatos, ocasionando o dessecamento e murchamento das folhas, sendo as causas mais comuns da baixa sobrevivência pós-transplântio.

A manutenção de umidade elevada e temperatura amena é condição necessária, de acordo com Sutter e Hutzler (1984), para reduzir o estresse crítico provocado pela remoção das plântulas das condições *in vitro*. A utilização de uma lâmina de água em bandejas, no processo de aclimatização, proporciona maior disponibilidade de água e, dessa forma, as raízes desenvolvem-se em busca da lâmina de

água, favorecendo o crescimento da planta (SOUZA CRUZ, 1998).

O presente trabalho tem como objetivo obter a germinação e a definição de uma metodologia de aclimatização para plântulas de caramboleira obtidas *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e em casa de vegetação do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), Campus de Jaboticabal (SP).

Foram colhidas carambolas maduras de plantas pertencentes à coleção de fruteiras da FCAV/UNESP-Jaboticabal, das quais foram retiradas as sementes e postas para secar à sombra por dois dias. Destas, selecionaram-se 300 para realização de dois processos de semeadura: *ex vitro* e *in vitro*, onde 100 sementes foram testadas para fins de comparação em substrato Plantmax® (semeadura *ex vitro*), e as demais foram subdivididas em dois lotes de 100 sementes cada, destinadas à semeadura em meio de cultura, suplementado ou não com 2 mL.L⁻¹ do anticontaminante PPM™.

Antes da semeadura *in vitro*, as sementes foram descontaminadas em álcool 70% por um minuto, seguido de imersão

em solução de alvejante comercial (Q-boa), na concentração de 30% (p/v), durante 30 minutos, sob agitação contínua. Em seguida, foram lavadas três vezes em água destilada autoclavada, em câmara asséptica.

O meio de cultura utilizado para a semeadura *in vitro* foi o de Murashige e Skoog (1962) com metade ($MS_{1/2}$) da concentração salina e sem adição de açúcar e vitaminas. O meio teve o pH ajustado para 5,8, solidificado com agar 7 g/litro e autoclavado a 121°C por 20 minutos. As sementes foram semeadas em potes plásticos autoclaváveis com capacidade de 125 mL, contendo 20 mL de meio e transferidos para sala de cultivo com temperatura média de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, na ausência de luz.

A semeadura *ex vitro*, foi realizada em casa de vegetação, utilizando-se o substrato Plantmax, acondicionado em bandejas de isopor com 128 células, com capacidade volumétrica de 73,5 cm³ cada uma, com regas periódicas nas bandejas.

Foram utilizadas dez repetições de dez sementes em delineamento experimental inteiramente casualizado para a semeadura *ex vitro* e para as duas semeaduras *in vitro* (com e sem anticontaminante).

Após a germinação, as plântulas obtidas *in vitro* foram conduzidas em casa de vegetação, sob iluminação natural. Foram avaliadas para as semeaduras *in vitro*

e *ex vitro*, a percentagem de germinação, o índice de velocidade de germinação, altura de plantas, e o número de folhas emitidas aos 60 dias após a germinação. Para as avaliações de altura e número de folhas, foram tomadas ao acaso 20 plantas em cada condição de semeadura. Para fins de análise estatística, os dados de altura de plantas e número de folhas originaram 10 repetições de duas plantas cada. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados de germinação foram transformados em $\text{arc. sen. } \sqrt{x}$ e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para o processo de aclimatização estabeleceram-se dois estádios de desenvolvimento de plântulas (tratamentos): estágio 1- 75 plântulas com 1-2 dias após a germinação com o cotilédone totalmente expandido, medindo, em média, 3cm de comprimento; estágio 2- 75 plântulas com 5-6 dias após a germinação, com o primeiro par de folhas formado, medindo em média, 4,5cm de comprimento. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado com três repetições de 25 plântulas em cada estágio.

As plântulas com a mesma idade de germinação foram retiradas da sala de crescimento para iniciarem a etapa de pré-aclimatização, onde os frascos com as plântulas foram colocados em uma bandeja com água (Figura 1), e ficaram em sala com iluminação natural e temperatura média de $29^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. As tampas

dos frascos foram substituídas por sacos plásticos transparentes contendo quatro perfurações de 1mm de diâmetro, permanecendo nessa condição por cinco dias. Posteriormente, passaram à etapa de aclimatação, onde as plântulas foram retiradas do meio de cultura e repicadas para sacos plásticos com capacidade para um litro, contendo como substrato a mistura de terra, areia e esterco bovino, na proporção de 1:1:1. Em seguida, foram postas sob telado com sombreamento de 50% e cobertas com filme PVC 100 mi-

cras, a 50cm do solo, objetivando manter a umidade com irrigação superficial duas vezes ao dia. As plantas permaneceram nessa etapa por quatro dias e, posteriormente, foram transferidas para casa de vegetação sob iluminação natural com temperatura mínima de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e máxima de $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Avaliou-se a média das seguintes variáveis: porcentagem de sobrevivência das plântulas aos 15 dias, altura de planta e número de folhas após a pré-aclimatação e aos 60 dias após a germinação.



Figura 1 - Plântulas de caramboleira na fase de pré-aclimatação. UNESP, Jaboticabal (SP), 2000.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que a semeadura *in vitro* apresenta valores de germinação semelhantes à semeadura *ex vitro* para as sementes de carambola quando se usa o anticontaminante PPMTM no meio de cultura (Tabela 1). A germinação *in vitro*

sem PPMTM foi a que apresentou menor porcentagem. O índice de velocidade de germinação também não diferiu entre os dois métodos de semeadura, quando se usa o PPMTM na condição *in vitro*. O menor índice foi apresentado pela semeadura *in vitro* sem PPMTM, demonstrando que a adição do anticontaminante ao

meio tem efeito benéfico no número de plântulas germinadas e na velocidade com que elas germinam, provavelmente, por

sua ação sobre microrganismos nocivos que interferem no processo de germinação.

Tabela 1 – Porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação, altura de plantas e número de folhas em função dos métodos de semeadura *in vitro* e *ex vitro* de caramboleira. UNESP, Jaboticabal (SP), 2000.

PARÂMETRO	EX VITRO	IN VITRO		CV (%)
		COM PPM	SEM PPM	
Germinação (%)	78 A	76 AB	58 B	37,21
IVG	3,60 A	3,37 A	2,15 B	25,67
Altura de planta (aos 60 dias) cm	15,23 A	15,18 A	14,92 A	9,81
Número de folhas (aos 60 dias)	16,41 A	15,20 A	15,55 A	8,98

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

IVG – Índice de Velocidade de germinação.

Não houve diferença estatística quanto à altura de plantas e ao número de folhas aos 60 dias para os dois métodos de semeadura *ex vitro* ou *in vitro* com ou sem PPMTM. Isso demonstra que para esta espécie a semeadura *in vitro* é perfeitamente viável, produzindo plântulas com desenvolvimento compatível com aquelas obtidas no processo de semeadura tradicional.

As plântulas que passaram para a fase de pré-aclimatização no estágio 1 (com 1-2 dias após a germinação) não se desenvolveram (Tabela 2), permanecendo com o mesmo número de folhas (cotiledonar) e mesmo tamanho, não apresentando, dessa forma, condições de desenvolvimento para passar à etapa seguinte de acclimatização (Figura 2).

Tabela 2 – Número de folhas, altura de plântulas antes e depois da pré-aclimatização e percentagem de plantas de caramboleira aclimatizadas, 15 dias após germinação, em dois diferentes estádios de desenvolvimento. UNESP, Jaboticabal (SP), 2000.

Estádio de desenvolvimento	Antes aclimatização ¹		Depois aclimatização ¹		Plantas aclimatizadas ² (%)
	Nº. folhas (par)	Altura planta (cm)	Nº. folhas (par)	Altura planta (cm)	
Estádio 1³	1,0	3,0	1,0	3,2	0,0
Estádio 2⁴	2,0	4,5	5,0	6,1	98,6

¹ – Média de 20 plantas

² – Média de 75 plantas

³ – Plântulas com 1-2 dias após a germinação

⁴ – Plântulas com 5-6 dias após a germinação

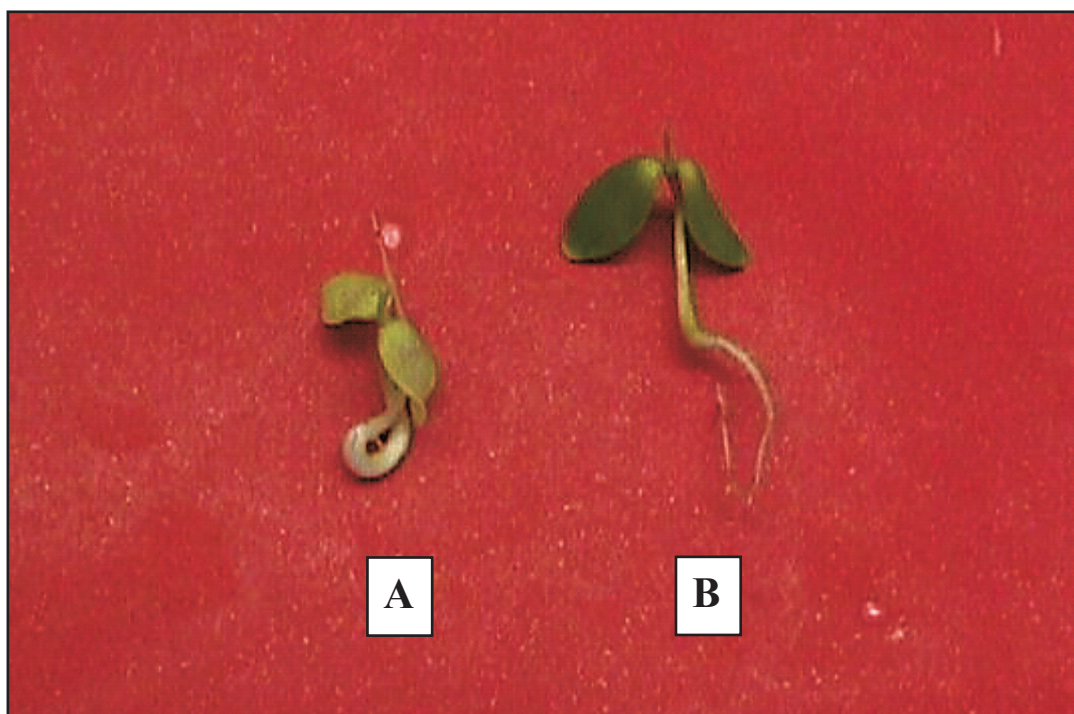


Figura 2 – (A) - Plântula de caramboleira no Estádio 1, com 1-2 dias após a germinação; (B) - Plântula de caramboleira após 5 dias em pré-aclimatização. UNESP, Jaboticabal (SP), 2000.

As plântulas que entraram na pré-aclimatização no estágio 2 (com 5-6 dias após germinadas), após esta fase, aumentaram o número de folhas e altura da planta (Tabela 2). Evidenciou-se, ainda que, provavelmente, a partir de então, iniciaram o processo de autotrofismo, pois passaram de uma coloração verde claro para verde escuro (Figura 3). O estímulo para a condição autotrófica durante a fase *in vitro* melhora o estabelecimento *ex vitro* em decorrência dos benefícios proporcionados pela maior resistência ao estresse hídrico (LEES; EVANS; NICHOLAS, 1991) obtido, provavelmente, pelo melhor desenvolvimento da cutícula

e, conseqüentemente, melhor ajustamento osmótico das plantas no estágio 2, o que, provavelmente, as plantas no estágio 1 não conseguem. Ao final de quatro dias, as plântulas no estágio 2 já estavam preparadas para a etapa de aclimatização. 15 dias após a germinação, em torno de 98% das plantas estavam totalmente aclimatizadas (Figura 4).

Quando comparado o desenvolvimento aos 60 dias após germinação das plantas germinadas *in vitro* e *ex vitro* (Tabela 1), verificou-se que as plantas obtidas *in vitro* não sofreram atraso no desenvolvimento na etapa de aclimatiza-

ção, pois a altura e o número de folhas foram não diferiram estatisticamente entre si.

Grattapaglia e Machado (1998) relataram que existem poucos trabalhos descrevendo os detalhes do procedimento de transplântio e aclimatização de plântulas *in vitro* e que a carência de informações é maior ainda num sistema comercial de micropropagação. A maioria dos trabalhos de aclimatização descreve processos de-

morados como redução de umidade do ambiente dos frascos de cultivo, cobertura do meio com lanolina, retirada e recolocação de saquinhos com aumento do período de exposição das plântulas, etc, que são técnicas que reduzem o estresse e a perda de umidade, mas não parecem viáveis para a micropropagação em larga escala. Uma das vantagens obtidas no processo de aclimatização da caramboleira é o de ter plantas aclimatizadas em um período relativamente curto.



Figura 3 – (A) - Plântula de caramboleira no Estádio 2, com 5-6 dias após a germinação; (B) - Plântula de caramboleira após 5 dias em pré-aclimatização. UNESP, Jaboticabal (SP), 2000.



Figura 4 – Plantas aclimatizadas de caramboleira, em casa de vegetação. UNESP, Jaboticabal (SP), 2000.

4 CONCLUSÃO

A semeadura *in vitro* é viável para obtenção de plântulas de caramboleira.

Plântulas que entram na fase de pré-aclimatização com 1-2 dias após a germinação, não conseguem aclimatizar-se, enquanto plântulas com 5-6 dias após a germinação são 98% aclimatizadas.

REFERÊNCIAS

- ARRILLAGA, I.; MARZO, T.; SEGURA, J. Embryo culture of *Fraxinus ornus* and *Sorbus domestica* removes seed dormancy, *HortScience*, v.27, n.4, p.371, 1992.
- ASTON, M.; 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. *Horticultural Research*, n. 17, p.1-7, 1977.
- COSTA, N.P. *Micropropagação e propagação gâmica de frutíferas tropicais*. 2003. 95f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.
- GONÇALVES, A.C.R. Aclimação de plântulas. *ABCTP notícias*, v.20, p.8, 1993.

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

LEES, R.P.; EVANS, E.H.; NICHOLAS, J. R. Photosynthesis in clematis, "The President", during growth in vitro and subsequent in vivo acclimatization. *J. Exp. Bot.*, n.42, p.605-610, 1991.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid grow and biosays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-97, 1962.

SEKIYA, R.F.M.; CUNHA, R.I.P. Influência do método de extração e do armazenamento na germinação de sementes de caramboleira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.21, n.1, p.57-59, 1999.

SILVA, A.T. da; PASQUAL, M.; ANTUNES, L. E. C.; CARVALHO, G. R.; RAMOS, J. D. Crescimento e desenvolvimento de plantas provenientes da cultura de tecidos. *Revista Ceres*, v.42, n.241, p.243-252, 1995.

SOUZA CRUZ. *Float*; melhor solução para produzir mudas de qualidade. Santa Cruz, 1998. 6 p.

SUTTER, E.G.; HUTZEL, M. Use of humidity test and antitranspirant on the acclimatization of tissue cultured plant to the greenhouse. *Scientia Horticulturae*, n.23, p.303-312, 1984.

SUTTER, E.; LANGHANS, R.W. Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, v. 104, p.493-496, 1980.