

## ACLIMATIZAÇÃO E ACLIMATAÇÃO DE MUDAS MICROPROPAGADAS DE HÍBRIDO F<sub>1</sub> DE *Coffea arabica* L.<sup>1</sup>

Wallace Gonçalves<sup>2</sup>, Julieta Andrea Silva de Almeida<sup>3</sup>, Marcus Vinicius Salomom<sup>4</sup>, Oliveiro Guerreiro Filho<sup>5</sup>

1 Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio de Pesquisa Café

2 Pesquisador, Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas-SP, wallacegoncalves@hotmail.com

3 Pesquisador, Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas-SP, julietasa@iac.sp.gov.br

4 Engenheiro Agrônomo, Coordenadoria de Desenvolvimento Rural Sustentável, Campinas-SP, mvinicius@cati.sp.gov.br

5 Pesquisador, Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas-SP, oliveiro@iac.sp.gov.br

**RESUMO:** Mudanças propagadas *in vitro* com metabolismo heterotrófico devem ser submetidas a condições controladas de umidade e de luminosidade visando à gradativa adaptação à capacidade autotrófica. O objetivo deste estudo foi avaliar o crescimento e o desenvolvimento de mudas micropropagadas de híbrido de *Coffea arabica* nas fases de aclimatização e aclimatação. Para tanto, foram instalados cinco experimentos com mudas obtidas por embriogênese somática indireta. Cada tratamento constou de cinquenta plantas avaliadas quanto à altura da parte aérea, número de pares de folhas, morfologia da raiz e massa seca da parte aérea e do sistema radicular. Os resultados obtidos indicam que o tamanho inicial da muda afetou significativamente o crescimento e o desenvolvimento ao longo de 250 dias após o transplante para os tubetes. O tamanho do recipiente e o tipo de sombreamento também influenciaram o desenvolvimento de plantas, que não tiveram influência do tipo de substrato e da forma de plantio.

**PALAVRAS-CHAVE:** Substrato, tamanho da muda, tamanho de recipiente

**ABSTRACT:** *In vitro* propagated seedlings with heterotrophic metabolism should be submitted to controlled humidity and light conditions aiming at the gradual adaptation to the autotrophic capacity. The objective of this study was to evaluate the growth and development of micropropagated seedlings of *C. arabica* hybrid in the acclimatization and acclimation phases. For this, five experiments were set up with seedlings obtained by indirect somatic embryogenesis. Each treatment consisted of 50 plants evaluated for shoot height, number of leaf pairs, root morphology and dry mass of shoot and root system. The results showed that the initial size of the seedling significantly affected growth and development over 250 days after transplanting to the tubes. The size of the container and the type of shading also influenced the development of plants, which had no influence on the type of substrate and the way of planting.

**KEY WORDS:** Substrate, seedling size, container size

### INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de uma nova cultivar de *Coffea arabica* pode se estender por cerca de trinta anos. Esse longo período pode ser reduzido pela clonagem de genótipos heterozigotos selecionados em gerações menores de programas de melhoramento (Andreazi et al. 2015). Entretanto, cultivares clonais devem ser propagadas, exclusivamente, por via vegetativa, como pela embriogênese somática (Almeida et al. 2016). Plantas cultivadas *in vitro* apresentam metabolismo heterotrófico devido a exposição à baixa intensidade luminosa, alta umidade relativa e elevada disponibilidade de glicose e sais minerais no ambiente de cultivo (Park et al. 2011). Na condição *in vitro*, as mudas são fisiologicamente inaptas à exposição a fatores ambientais como, baixa umidade relativa do ar, alta luminosidade, variações de temperatura, assim como, à presença de microorganismos saprofitos e fitopatogênicos (Barry-Etienne et al. 2002). Para superar essas limitações, as plantas são submetidas primeiro, a aclimatização em condições controladas que permitem sua gradativa adaptação ao ambiente *ex vitro* com o objetivo de atingir o metabolismo autotrófico e em seguida, a uma fase de aclimatação, com maior exposição aos fatores ambientais (Chandra et al. 2010). Cada uma destas fases pode ser limitante para o estabelecimento das mudas micropropagadas e comprometer a eficiência da cultura. Assim, mudas micropropagadas nas fases de aclimatização e de aclimatação podem ser afetadas por fatores de ambiente e também pelas características do padrão morfológico das mesmas. O tipo de substrato utilizado pode influenciar o futuro crescimento e desenvolvimento das mudas micropropagadas, este deve possuir características diferenciadas como ausência de patógenos, adequado teor de sais e nutrientes, boa capacidade de retenção de umidade e de drenagem e permitir a aeração do sistema radicular (Freitas et al. 2011). Estudos mostram que mudas provenientes de sementes e ou micropropagadas têm sido estabelecidas em diversos tipos de substratos (Rezende et al. 2008, Rodrigues et al. 2015). O tamanho do recipiente também pode afetar o crescimento e o desenvolvimento de mudas micropropagadas. Segundo Vallone et al. (2009) mudas de cafeeiros apresentaram maior altura, diâmetro de caule e número de ramos plagiotrópicos quando cultivadas em tubetes cônicos de 120 mL, do que naqueles de 50 mL. A forma como as mudas são posicionadas em relação à borda do vaso pode afetar o desenvolvimento destas. O desenvolvimento de mudas nas fases de aclimatização e aclimatação também é influenciado pela luminosidade. Mudanças *in vitro* quando transferidas para a condição de alta irradiância podem apresentar prejuízo de sua atividade fotossintética (Chandra et al.

2010). Além disto, estudos indicam que, em geral, o nível de sombreamento pode variar de 30 % até 70 % na fase de aclimatização de mudas de diferentes espécies provenientes de sementes, de estacas ou micropropagadas (Santos et al. 2013; Santos et al. 2014). O objetivo deste estudo foi avaliar o crescimento e o desenvolvimento de mudas micropropagadas de *C. arabica* nas fases de aclimatização e aclimação.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido com mudas micropropagadas via embriogênese somática indireta do híbrido F<sub>1</sub> entre as cultivares Obatã 1669-20 e Icatu Vermelho IAC 4045 de *C. arabica*, submetidas a cinco experimentos. Mudas enraizadas, com dois e ou quatro pares de folhas foram transplantadas para tubetes plásticos cônicos com volumes de 40, 120 e 180 mL. O substrato utilizado nos tubetes consistiu de diferentes misturas, sendo: a) 25 % pinus + 75 % de fibra de coco; b) 25 % fibra de coco + 75 % de pinus; c) 50 % fibra de coco + 50 % de pinus; d) 100 % de pinus e e) 100 % fibra de coco. As mudas foram transplantadas no substrato em duas formas: a) muda inserida no centro do tubete e b) muda inserida em contato com a borda do tubete. Na fase de aclimatização, as mudas nos tubetes foram mantidas em estufa climatizada pelo período de trinta dias, com 70 % de sombreamento, 80 % de umidade relativa, irrigação por sistema de nebulização ‘intermitente’ com controle automático e frequência de rega a cada 1 hora com duração de 15 segundos. Logo após, os tubetes com as mudas foram transferidos para a fase de aclimação, sendo em viveiro, em condição natural, cobertos com sombrite 70 % pelo período de 30 dias, seguido de sombrite 50 %. Mudas também foram mantidas em estufa com sombrite 70 % e em bosque de árvores de seringueira (80 %). Nesta fase, as mudas foram irrigadas manualmente, conforme a necessidade das mesmas. O delineamento inteiramente casualizado foi adotado nos cinco experimentos. Cada tratamento constou de cinquenta repetições representadas por parcelas de uma muda, que foram avaliadas quanto à altura da parte aérea e o número de pares de folhas, ao longo de 250 dias após o transplante das mudas (DAT). No final de cada experimento, também foram avaliadas as massas secas da parte aérea e da raiz. Para a determinação da massa seca, os tecidos frescos foram colocados para secar em estufa com ventilação forçada, a 60 °C, sendo pesadas até atingir valores constantes. Além disto, também foi avaliada a morfologia externa do sistema radicular, sendo as mudas classificadas como normais ou anormais, aquelas com má formação do sistema radicular. Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância, sendo as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5 %, utilizando-se o programa SAS.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro experimento, foram utilizadas mudas com 2 e com 4 pares de folhas. Verificou-se que as plantas desenvolvidas a partir de mudas com 4 pares de folhas tiveram maior crescimento em altura, maior número de pares de folhas e maior acúmulo de matéria seca da parte aérea e do sistema radicular em relação àquelas do tratamento com 2 pares de folhas (Tabela 1). A avaliação destas mudas ao longo do cultivo mostrou que a diferença inicial de tamanho na condição *in vitro* foi mantida até o final da condução das fases de aclimatização e aclimação. Santos et al. (2014) verificaram também que mudas micropropagadas de *C. canephora* plantadas em estádio de ‘plântula’ atingiram maior taxa de sobrevivência e de desenvolvimento na fase de aclimatização quando comparadas com aquelas estabelecidas em fase mais inicial de desenvolvimento, como de torpedo ou de embrião germinado. O volume do tubete utilizado na produção de mudas influenciou o crescimento e o desenvolvimento das mudas micropropagadas (Tabela 2). A altura do caule foi semelhante entre todos os tratamentos durante a maior parte do tempo de condução do experimento; porém aos 250 dias, as plantas que estavam em tubetes de 120 e 180 mL passaram a apresentar maior altura que aquelas em 40 mL (Tabela 2). Esse padrão de resposta também é verificado para o número de pares de folhas, só que a diferença entre os tratamentos iniciou mais cedo, aos 210 dias. Segundo Santos et al (2013) a maior disponibilidade de água e nutrientes em recipientes maiores pode favorecer a transição do metabolismo das mudas, de heterotrófico para autotrófico. A diferença verificada anteriormente fica mais evidente com os resultados de massa seca do sistema radicular, que foi significativamente maior em mudas cultivadas em tubetes de 120 e 180 mL e menor naquelas em 40 mL. Mas, o tamanho de tubete não afetou a massa seca da parte aérea que foi semelhante entre todos os tratamentos.

Tabela 1. Altura da parte aérea, número de pares de folhas e massa seca da parte aérea e da raiz de plantas desenvolvidas de mudas micropropagadas de *C. arabica* com dois ou quatro pares de folhas, cultivadas em tubetes de 120 mL, em viveiro.

Dias após o transplante	2 pares de folhas	4 pares de folhas
Altura de Planta (cm)		
30	0,8b	1,7a
90	2,6b	4,8a
210	7,2b	11,9a
250	8,0a	12,9b
Número de pares de folhas		
30	3,6b	5,1a
90	5,5b	7,2a
210	8,0b	9,9a
250	7,8b	9,9a
Massa seca (g)		
Parte aérea	0,8a	1,5a
Parte radicular	0,3b	0,6b

Médias seguidas de mesma letra no dia da avaliação, em cada fator avaliado, não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5 % pelo teste de Tukey.

Tabela 2. Efeito do tamanho de tubete no crescimento e desenvolvimento de plantas provenientes de mudas micropropagadas de *C. arabica* cultivadas em viveiro.

Dias após o transplante	Tamanho de tubete (mL)		
	40	120	180
Altura de Planta (cm)			
30	1,2ab	1,3ab	1,4a
90	3,1ab	3,3ab	3,5a
210	8,4ab	8,8a	9,2a
250	8,9b	9,8ab	10,0a
Número de pares de folhas			
30	4,4a	4,1a	4,6a
90	6,5a	6,2a	6,6a
210	8,8b	8,8b	9,5a
250	8,3b	8,7ab	9,3a
Massa seca (g)			
Parte aérea	0,8a	1,1a	1,0a
Parte radicular	0,2b	0,3a	0,4a

Médias seguidas de mesma letra no dia da avaliação em cada grupo morfológico, não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5 % pelo teste de Tukey.

Levando-se em conta o efeito dos diferentes tipos de substrato nota-se que a altura e o número de pares de folhas das plantas foram menores apenas no tratamento com 100 % de fibras, até os primeiros 30 dias após o transplante, como apresentado, respectivamente, nas Figuras 1A e 1B, e a partir dos 90 dias todas as diferenças desapareceram entre os mesmos. Por outro lado, não se observou qualquer diferença em relação à massa seca da parte aérea e do sistema radicular das plantas desenvolvidas nos diferentes tipos de substratos, conforme apresentado respectivamente nas Figuras 1C e 1D. Os substratos empregados neste estudo, a fibra de coco e a casca de pinus, combinados ou não, têm sido utilizados com frequência no estabelecimento de mudas de caféiro provenientes de sementes (Lana et al. 2002), de estacas (Amaral et al. 2007) e micropropagadas (Santana-Buzzy et al. 2007). O padrão de crescimento e de desenvolvimento das mudas deste estudo foi semelhante nos tratamentos com combinação ou não de fibra de coco e de casca de pinus (Figura 1), indicando que as características de porosidade e de capacidade de retenção hídrica dos dois substratos utilizados foram capazes de manter a contínua disponibilidade de umidade para as mesmas durante a fase que ainda estavam vulneráveis em relação à absorção e perda de água.

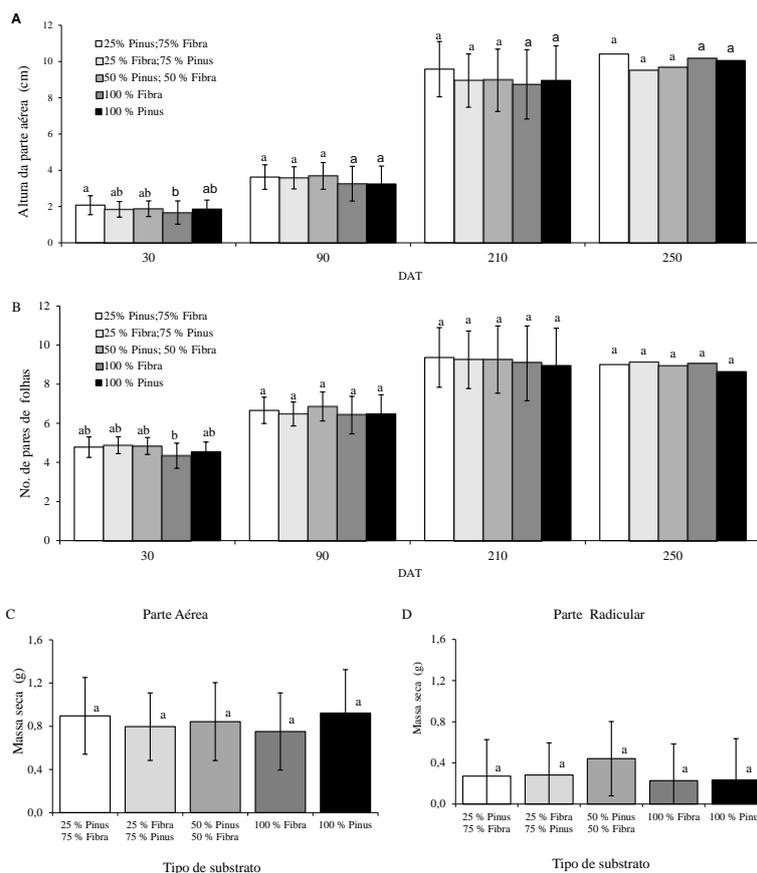


Figura 1. Efeito do tipo de substrato no crescimento e desenvolvimento de plantas desenvolvidas de mudas micropropagadas de *C. arabica* cultivadas em tubetes de 120 mL, em viveiro. Médias seguidas de mesma letra, em A e B no dia da avaliação, não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5 % pelo teste de Tukey. DAT: Dias após o transplante.

Em relação à forma de plantio, as mudas apresentaram até os 90 dias maior altura quando dispostas no centro do tubete do que aquelas inseridas junto à sua parede. Após este período, não foram observadas diferenças entre os tratamentos (Tabela 3). Este padrão de resposta também é verificado em relação ao número de pares de folhas, sendo as diferenças mantidas apenas até os primeiros trinta dias. A matéria seca da parte aérea e do sistema radicular das plantas foi semelhante nos dois tratamentos. Embora tenha se verificado diferença entre estes dois tipos de plantio apenas no início do experimento, na prática o sistema radicular de mudas provenientes de sementes transplantadas no meio do tubete é melhor distribuído, ocupando todo volume do mesmo. Quando as mudas são encostadas na parede do tubete o sistema radicular concentra-se em uma de suas metades e apresenta menor frequência de raízes mal formadas, do tipo pião torto. A agregação do substrato às raízes é mais intensa em mudas transplantadas no centro do que nas mudas transplantadas junto à parede dos tubetes, aproximadamente cinco meses, após o transplante das mudas isso deixa de ser um problema. As mudas apresentaram maior altura quando aclimatadas em estufa com cobertura de sombrite 70 % e ou em telado com sombrite de 70 % em relação àquelas em condição de sub-bosque de árvores de seringueira (Figura 2A). Não houve variação em relação ao número de pares de folhas emitidos por plantas aclimatadas nos três tipos de ambientes (Figura 2B). Por outro lado, a matéria seca da parte aérea foi maior em plantas mantidas sob telado com sombrite de 70 % em relação àquelas mantidas em estufa e em sub-bosque. A massa seca do sistema radicular foi semelhante em plantas dos três tratamentos (Figura 2C).

Tabela 3. Efeito da forma de plantio no crescimento e desenvolvimento de plantas provenientes de mudas micropropagadas de *C. arabica* cultivadas em tubetes de 120 mL, em viveiro.

Dias após o transplante	Centro do tubete	Borda do tubete
Altura de Planta (cm)		
30	1,4b	2,0a
90	2,7b	3,3ba
210	8,2a	9,0a
250	9,2a	10,0a
Número de pares de folhas		
30	4,6b	5,2a
90	6,2a	6,5a
210	8,4a	8,8a
250	8,6a	9,0a
Massa seca (g)		
Parte aérea	0,4a	0,7a
Parte radicular	0,2a	0,1a

Médias seguidas de mesma letra, no dia da avaliação, em cada fator, não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5 % pelo teste de Tukey.

O sistema radicular das mudas micropropagadas de cafeeiros transplantadas para tubetes e cultivadas em condição de viveiro pode apresentar deformações que deixam a raiz principal torta. Neste estudo, esse tipo de deformação também foi encontrado em todos os tratamentos dos cinco experimentos, porém em ocorrência reduzida, tendo sido verificado o predomínio de raízes do tipo normal. Observamos ainda que, as mudas micropropagadas apresentaram bom desenvolvimento nos cinco experimentos com, aproximadamente 95 % de sobrevivência. Possivelmente, este resultado pode ser atribuído a dois aspectos padronizados antes da instalação dos experimentos, ou seja, a utilização de mudas previamente enraizadas *in vitro* e o uso de sombrite 70 % durante toda a fase de aclimatização. O enraizamento prévio das plantas ainda é tema controverso. Segundo alguns autores, mudas enraizadas *in vitro* tem maior índice de sobrevivência *ex vitro* do que aquelas sem raízes (Bosa et al. 2003). Entretanto, de acordo com Oliveira et al. (2011) a ausência de raiz não influencia o crescimento e desenvolvimento de clones no ambiente natural. Quando as mudas *in vitro* são transferidas para a aclimatização, elas são fisiologicamente vulneráveis. Neste estudo é possível que a presença de raiz e a utilização de baixa luminosidade podem ter contribuído para minimizar o efeito dos fatores de estresse e para alcançar o metabolismo autotrófico.

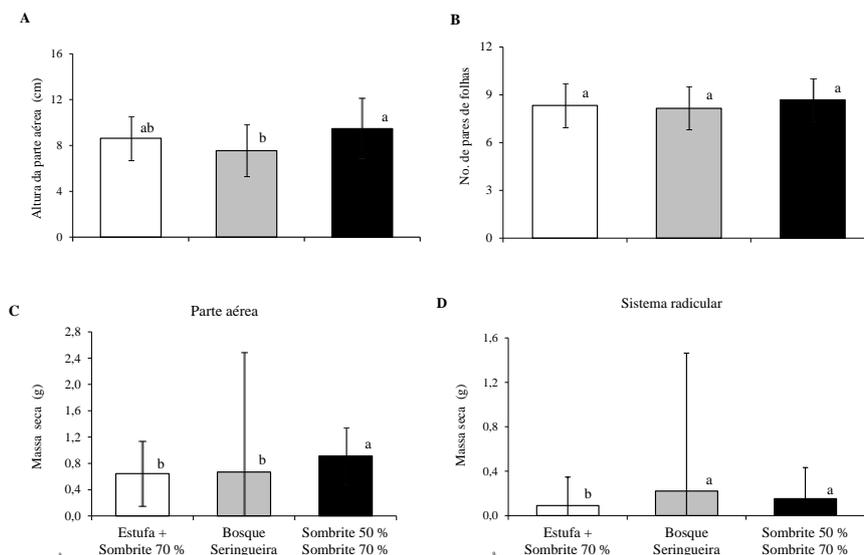


Figura 2. Efeito do tipo de sombreamento no crescimento e desenvolvimento de plantas desenvolvidas de mudas micropropagadas de *C. arabica* cultivadas em tubetes de 120 mL, em viveiro, aos 250 dias após o transplante. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, ao nível de 5 % pelo teste de Tukey.

## CONCLUSÕES

1. Mudanças micropropagadas com raízes apresentam maior capacidade de crescimento e de desenvolvimento na condição *ex vitro* que aquelas sem raízes.
2. O tamanho das mudas, o volume do recipiente de plantio e o nível de sombreamento afetam o crescimento e o desenvolvimento de mudas micropropagadas.

## AGRADECIMENTOS

Ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa do Café (CBP & D-Café) pelo apoio financeiro (Projeto 02.06.10.023.00.06). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de pesquisa para Dr. Oliveira Guerreiro Filho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J.A.S., LEAL, R.R., CARMAZINI, V.C.B., SALOMON, M.V. & GUERREIRO FILHO, O. Characterization of the morphological events in the direct somatic embryogenesis of *Coffea arabica* L. Genotype leaf explants. *Plant cell Biotechnology and Molecular Biology* 17: 393–403. (2016).
- AMARAL, J.A.T., LOPES, J.C., AMARAL, J.F.T., SARAIVA, S.H. & JESUS JR., W.C. Crescimento vegetativo e produtividade de cafeeiros conilon propagados por estacas em tubetes. *Ciência & Agrotecnologia* 31: 1624-1629. (2007).
- ANDREAZI, E., SERA, G.H.; FARIA, R.T., SERA, T., SHIGUEOKA, L.H., CARVALHO, F.G., CARDUCCI, F.C. & CHAMLET, D. Desempenho de híbridos F1 de café arábica com resistência simultânea a ferrugem, mancha aureolada e bicho mineiro. *Coffee Science* 10: 375–382. (2015).
- BARRY-ETIENNE, D., BERTRAND, B., VASQUEZ, N. & ETIENNE, H. Comparison of somatic embryogenesis-derived coffee (*Coffea arabica* L.) plantlets regenerated *in vitro* or *ex vitro*: morphological, mineral and water characteristics. *Annals of Botany* 90: 77-85. (2002).
- BOSA, N., CALVETE, E.O., NIENOW, A.A. & SUZIN, M. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de gipsófila. *Horticultura Brasileira* 21: 207-210. (2003).
- CHANDRA, S., BANDOPADHYAY, R., KUMAR, V. & CHANDRA, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology Letters* 32: 1199–1205. (2010).
- FREITAS, S.J., CARVALHO, A.J.C., BERILLI, S.S., SANTOS, P.C. & MARINHO, C.S. Substratos e osmocote na nutrição e desenvolvimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv Vitória. *Revista Brasileira Fruticultura*, volume especial: 672-679. (2011).
- LANA, R.M.Q., SANTOS, C.M., SANTOS, V.L.M., BARBIZAN, E.L., MENDES, A.F. Utilização de diferentes substratos e de fertilizantes de liberação lenta na produção de mudas do cafeeiro em saquinhos. *Revista Ceres* 49: 577-586. (2002).
- OLIVEIRA, T.G., PINA, P.S.S., BERTONI, B.W., FRANÇA, S.C. & PEREIRA, A.M.S. Micropropagation of *Croton antisiphiliticus* Mart. *Ciência Rural* 41: 1712-1718. (2011).
- PARK, S.Y., MOON, H.K., MURTHY, H.N., KIM, Y.W. Improved growth and acclimatization of somatic embryo-derived *Oplopanax elatus* plantlets by ventilated photoautotrophic culture. *Biologia Plantarum* 55: 559-562. (2011).
- REZENDE, J.C., FERREIRA, E.A., PASQUAL, M., VILLA, F., BOTELHO, C.E. & CARVALHO, S.P. Development of *Coffea arabica* L. seedlings obtained from direct somatic embryogenesis. *Coffee Science* 3: 30-37. (2008).
- RODRIGUES, M., PAIVA, P.D.O., FREITAS, R.T., MANSUR, T.O.F., PAIVA, R. & BARBOSA, J.P.R.A.D.B. Growth and photosynthetic responses during *ex vitro* acclimatization of *Etilingera elatior* (Jack) rm smith (torch ginger). *Acta Scientiarum* 37: 495-504. (2015).
- SANTANA-BUZZY, N., ROJAS-HERRERA, R., GALAZ-ÁVALO, R.M., KU-CAUICH, J.R., MIJANGOS-CORTÉS, J., GUTIÉRREZ-PACHECO, L.C., CANTO, A., QUIROZ-FIGUEROA, F. & LOYOLA-VARGAS, V.M. Advances in coffee tissue culture and its practical applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 43: 507-520. (2007).
- SANTOS, M.R.A., LIMA, R.A., FERREIRA, M.G.R., ROCHA, J.F., ESPÍNDULA, M.C. & ALVES, E.A. Acclimatization of micropropagated plantlets of *Coffea canephora*. *Journal Biotechnology and Biodiversity* 5: 12-19. (2014).
- SANTOS, E.M., AZEVEDO, B.M., MARINHO, A.B., CARVALHO, A.C.P.P. & SARAIVA, K.R. Aclimatização de mudas micropropagadas de Bastão do Imperador em diferentes volumes de recipientes. *Revista Ceres* 60: 134-137. (2013).
- VALLONE, H.S., GUIMARÃES, R.J., MENDES, A.N.G., SOUZAS, C.A.S., DIAS, F.P. & CARVALHO, A.M. Recipientes e substratos na produção de mudas e no desenvolvimento inicial de cafeeiros após o plantio. *Ciência & Agrotecnologia* 33: 1327-1335. (2009).