

MILA LIPARIZE DE OLIVEIRA

MICROPROPAGAÇÃO DE CLONES DE *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* EM
BIORREATORES DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ciência Florestal, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

MILA LIPARIZE DE OLIVEIRA

MICROPROPAGAÇÃO DE CLONES DE *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* EM
BIORREATORES DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ciência Florestal, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 15 de setembro de 2009.

Pesq. Ricardo Miguel Penchel Filho
(Coorientador)

Prof. Wagner Campos Otoni
(Coorientador)

Prof. José Maria Moreira Dias

Prof. Ismael Eleotério Pires

Prof. Aloisio Xavier
(Orientador)

Aos meus pais, Marcos Eli e Maria Elena, como reconhecimento por toda a dedicação para a educação e formação de seus filhos.

Aos meus irmãos e minha irmã, por todos os momentos compartilhados, amor incondicional e amizade.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais Marcos Eli e Maria Elena, meus irmãos Marquinho e Matheus, minha irmã Marcela e à Belinha, pelo amor, incentivo e carinho de sempre.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Engenharia Florestal por todo aprendizado durante a minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

À empresa Fibria (antiga Aracruz Celulose S/A) pela oportunidade de realização deste trabalho de forma conjunta.

Ao professor Aloisio Xavier, pela orientação e confiança no desenvolvimento deste trabalho.

Ao pesquisador Ricardo Penchel, pela amizade e orientação na fase de experimentação.

Ao professor Wagner Campos Otoni e ao pesquisador João Batista Teixeira pela orientação e contribuições para este trabalho.

Aos pesquisadores do Centro de Pesquisa e Tecnologia da empresa Fibria (antiga Aracruz Celulose S/A), pelo auxílio na realização dos experimentos.

Ao André, doutorando do Departamento de Solos, pela disposição e auxílio sempre que solicitado.

A todos os professores e funcionário que contribuíram para minha formação.

Às amigas Catarina, Louize, Fernadinha e Larissa, pelo companheirismo sempre.

Às amigas capixabas Flávia Pandolfi, Tati e Flávia Portela pela companhia e amizade durante a realização dos experimentos.

Às amigas da graduação, Dri e Marina, que já se foram de Viçosa, mas deixaram além da saudade muitos ensinamentos e amizade.

Aos amigos do Grupo de Silvicultura Clonal Rogério, Silvano, Lucas e Leandro pelo auxílio e amizade.

À família conquistada em Coqueiral (Creuza, Suelen, Rayani, tia Lurdinha, tia Luzia, C.C., Betinha e todos os agregados), pela acolhida e por tornar minha estadia no Espírito Santo tão divertida.

Aos analistas e amigos do laboratório de Biotecnologia da empresa Fibria (antiga Aracruz Celulose S/A), Nilson, Jocemar, Helen, Walker e Carlos, pela imensa ajuda na realização dos trabalhos, amizade e carinho.

Ao Mauro, pelo incentivo, paciência, amizade, companheirismo e amor.

A todos os membros da banca, por se disponibilizarem a contribuir para este trabalho.

Aos demais que não foram citados, mas que contribuíram para a conclusão de mais uma etapa da minha vida e torceram pelo meu sucesso.

Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

Mila Liparize de Oliveira, filha de Marcos Eli de Oliveira e Maria Elena Liparize de Oliveira, nasceu em 09 de julho de 1985, no Município de Nova Iguaçu, Rio de Janeiro.

Em 2002, concluiu o 2º grau no Colégio Nossa Senhora Rainha dos Corações, em Jacarepaguá, Rio de Janeiro.

Em 2003, iniciou o curso de Engenharia Florestal, na Universidade Federal de Viçosa, sendo o mesmo concluído em julho de 2007.

Em agosto de 2007, ingressou no Mestrado do Programa de Pós- Graduação em Ciência Florestal da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa da dissertação em setembro de 2009.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Biorreatores	3
2.2. Biorreatores de imersão temporária.....	4
2.3. Uso de biorreatores na propagação de <i>Eucalyptus</i>	6
2.4. Cultivo em biorreatores	7
2.5. Hiper-hidricidade e biorreatores.....	10
3. REFERÊNCIAS	12
EFEITOS DO MEIO DE CULTURA E DA RELAÇÃO BAP/ANA NA MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE CLONES DE <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> EM BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA	17
RESUMO.	17
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
2.1. Fonte, meio de cultura e condições de cultivo dos explantes.....	18
2.2. Multiplicação em biorreator: Meio de cultura MS e WPM.....	19
2.3. Multiplicação em biorreator: Meio de cultura MS, QL e JADS	21
2.4. Multiplicação em biorreator: Relação BAP/ANA.....	23
3. RESULTADOS	24
3.1. Multiplicação em biorreator: Meios de cultura MS e WPM	24
3.2. Multiplicação em biorreator: Meios de cultura MS, QL e JADS.....	25
3.3. Multiplicação em biorreator: Relação BAP/ANA.....	26
4. DISCUSSÃO.....	27
4.1. Multiplicação em biorreator: Meios de cultura MS e WPM	28
4.2. Multiplicação em biorreator: Meios de cultura MS, QL e JADS.....	29
4.3. Multiplicação em biorreator: Relação BAP/ANA.....	30
5. CONCLUSÕES	31
6. REFERÊNCIAS	32
INFLUÊNCIA DA RELAÇÃO N(NO₃⁻):N(NH₄⁺) NA MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> EM BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA	35
RESUMO.	35

1. INTRODUÇÃO.....	35
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1. Fonte, meio de cultura e condições de cultivo dos explantes.....	37
2.2. Relações $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$	38
2.3. Consumo de nutrientes pela cultura.....	39
2.4. Cultivo em ágar x meio líquido.....	40
3. RESULTADOS.....	40
3.1. Relações $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$	40
3.3. Cultivo em ágar x meio líquido.....	45
4. DISCUSSÃO.....	46
4.1. Relações $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$	46
4.2. Cultivo em ágar x meio líquido.....	48
5. CONCLUSÕES.....	50
6. REFERÊNCIAS.....	50

EFEITO DA FREQUÊNCIA DE IMERSÃO E DE INJEÇÃO ADICIONAL DE AR NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* EM BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA.....

RESUMO.....	54
1. INTRODUÇÃO.....	54
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
2.1. Fonte, meio de cultura e condições de cultivo dos explantes.....	56
2.2. Frequências de imersão e suportes de apoio dos explantes.....	57
2.3. Injeção adicional de ar aos recipientes.....	58
3. RESULTADOS.....	60
3.1. Frequências de imersão e suportes de apoio dos explantes.....	60
3.2. Injeção adicional de ar aos recipientes.....	62
4. DISCUSSÃO.....	63
4.1. Frequências de imersão e suportes de apoio dos explantes.....	63
4.2. Injeção adicional de ar aos recipientes.....	64
5. CONCLUSÕES.....	66
6. REFERÊNCIAS.....	66

ALONGAMENTO *IN VITRO* DE MULTIBROTAÇÕES DE *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* EM MEIO SEMISSÓLIDO E EM BIORREADORES DE IMERSÃO TEMPORÁRIA.....

RESUMO.....	69
1. INTRODUÇÃO.....	69
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	71
2.1. Fonte, meio de cultura e condições de cultivo dos explantes.....	71
2.2. Meio semissólido (pote plástico) x meio líquido (RITA [®] e BIT [®]).....	71
3. RESULTADOS.....	74
4. DISCUSSÃO.....	75
5. CONCLUSÕES.....	76
6. REFERÊNCIAS.....	77
4. CONCLUSÕES GERAIS.....	79

LISTA DE ABREVIACOES

AIA	Ácido indol-acético
ANA	Ácido naftalenoacético
BAP	6-benzilaminopurina
BIT [®]	Biorreator de imersão temporária (patente N° P10004185-8 requerida pela Embrapa)
GA ₃	Ácido giberélico
JADS	Meio de cultura (CORREIA, 1993)
MS	Meio de cultura (MURASHIGE e SKOOG, 1962)
NH ₄ ⁺	Amônio
NO ₃ ⁻	Nitrato
QL	Meio de cultura (QUOIRIN e LEPOIVRE, 1977)
RITA [®]	Recipiente de imersão temporária automatizada (Vitropic S/A)
WPM	Meio de cultura (LLOYD e McCOWN, 1980)

RESUMO

OLIVEIRA, Mila Liparize de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2009. **Micropropagação de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em biorreatores de imersão temporária.** Orientador: Aloisio Xavier. Coorientadores: Ricardo Miguel Penchel Filho, João Batista Teixeira e Wagner Campos Otoni.

O uso de biorreatores tem sido uma alternativa na micropropagação de algumas espécies, por contribuir para automação em determinadas fases do cultivo de plantas e possibilitar a produção em larga escala. Neste sentido, este estudo avaliou a micropropagação via proliferação de gemas axilares nas fases de multiplicação e alongamento *in vitro* de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* com o uso de biorreatores de imersão temporária. Na fase de multiplicação, foram realizados experimentos individuais com o objetivo de testar diferentes meios de cultura (MS, WPM, QL e JADS), combinações entre os fitorreguladores BAP e ANA, diferentes relações entre fontes de nitrogênio (nitrato e amônio), comparar o cultivo em ágar e em meio líquido, diferentes manejos de frequência de imersão (2, 4, 8 e 16 horas) e suportes de apoio dos explantes (papel filtro e espuma), assim como um sistema de ventilação com entrada de ar adicional acoplado ao recipiente dos biorreatores, quanto às características massa fresca, número de brotos e hiper-hidricidade dos explantes, cultivados em biorreatores RITA[®]. Na fase de alongamento, avaliou-se a influência de diferentes períodos de cultivo (14, 21, 28 e 35 dias) no alongamento *in vitro* de multibrotações cultivadas em biorreatores de imersão temporária RITA[®] e BIT[®] (meio líquido) e em potes plásticos (meio semissólido). Na etapa de multiplicação, o meio de cultura MS, a combinação 1,0 µM de BAP com 0,5 µM de ANA, a relação 3:1 de N(NO₃⁻):N(NH₄⁺), os menores intervalos entre as imersões (2 e 4 horas) e o suporte papel filtro promoveram maior massa fresca e número de brotos por explante, sendo o cultivo em biorreator RITA[®] superior ao ágar para estas características. Houve diferença quanto ao desenvolvimento das culturas entre os dois clones avaliados. O aumento da concentração de amônio no meio (relações 1:1, 1:2 e 1:3

de $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$) levou ao menor vigor dos explantes, e a injeção adicional de ar ($0,8 L min^{-1}$) ao recipiente do biorreator RITA[®] não influenciou o desenvolvimento das culturas. No geral, as culturas apresentaram alto percentual de hiper-hidricidade, sendo esta desordem um fator limitante nas condições deste estudo para o cultivo de *Eucalyptus* em biorreatores, não sendo percebida nas plantas cultivadas em meio semissólido. No alongamento, o biorreator BIT[®] e o cultivo em ágar nos potes plásticos promoveram maiores médias de ganho em massa fresca e número final de brotos em todas as idades de avaliação, porém o alongamento dos brotos não foi satisfatório, sendo a maior parte dos brotos (>60%) classificados na classe de tamanho de 0,0-2,0 cm. Há necessidade de ajuste do manejo da cultura nas fases de multiplicação e alongamento para a obtenção de brotos com maior vigor aptos a enraizar em condições *ex vitro*, a fim de que esta técnica possa se tornar viável em larga escala.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Mila Liparize de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2009. **Micropropagation of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* clones in temporary immersion bioreactors.** Advisor: Aloisio Xavier. Co-advisors: Ricardo Miguel Penchel Filho, João Batista Teixeira and Wagner Campos Otoni.

The use of bioreactors has been an alternative tool for the micropropagation of several species, contributing to the automation in certain phases of the *in vitro* cultivation, though enabling large-scale production. Accordingly, this study evaluated the micropropagation by means of axillary buds proliferation in the multiplication and elongation stages *in vitro* of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* clones using temporary immersion bioreactors. During multiplication stage in RITA[®] bioreactors, experiments were performed with the aim of testing the influence of several factors on fresh weight, number of shoots per explant and hyperhydricity of the culture, among them: culture media (MS, WPM, QL and JADS); BAP and NAA combinations; ratios between nitrogen sources (nitrate and ammonium); cultivation in agar solidified and liquid media; different managements of immersion frequencies (2, 4, 8 and 16 h) and type of support of the explants (filter paper and foam); and a ventilation system with additional air input coupled to the bioreactor containers. In the elongation step, it was evaluated the influence of different periods of cultivation (14, 21, 28 and 35 d) in elongation *in vitro* of explants cultured in temporary immersion bioreactors RITA[®] and BIT[®] (liquid medium) and in plastic pots (semi-solid medium). In multiplication stage, the culture medium MS, the combination of 1.0 µM BAP and 0.5 µM NAA, the ratio 3:1 of N(NO₃⁻):N(NH₄⁺), the smallest intervals between immersions (2 and 4 h) and support filter paper promoted greater fresh weight accumulation and number of shoots per explant; for these characteristics, the RITA[®] system was more efficient as compared to agar-jellified medium. There was a remarkable difference in the development of cultures between the two clones evaluated. The increase in ammonium concentration in the culture medium (1:1, 1:2 and 1:3 of N(NO₃⁻))

:N(NH₄⁺) led to smaller effect of explants and the injection of additional air (0.8 L min⁻¹) to the RITA[®] bioreactor container did not influence the development of the cultures. In general, under the experimental conditions, cultures displayed high percentages of hyperhydricity, and this physiological disorder was a limiting factor for the *Eucalyptus* cultivation in bioreactors, but not for plants grown in semi-solid agar medium. In the elongation phase, the BIT[®] bioreactor and cultivation on agar in plastic pots promoted the highest fresh weight accumulation and the final number of shoots at all ages during assessment; however, shoot elongation was not satisfactory, with most shoots (> 60%) within the of class-size of 0.0-2.0 cm. In conclusion, there is a need to adjust of the culture management in multiplication and elongation steps, in order to obtain shoots with greater vigor and competence to root in *ex vitro* conditions, in order to make this technique potentially viable to be applied to a large scale shoot production.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A crescente demanda por produtos florestais e as exigências por matéria-prima de qualidade têm levado a altos investimentos no setor florestal, principalmente por parte das empresas privadas, propiciando grandes avanços no processo produtivo e nas técnicas utilizadas. A silvicultura clonal, por exemplo, especialmente em relação à clonagem do eucalipto, experimentou grandes modificações desde o início de sua utilização na década de 70 até os dias atuais, visando os plantios clonais a uma maior uniformidade, produtividade e tecnologia da madeira, adaptação a diversos sítios e custo competitivo (XAVIER et al., 2009).

A propagação vegetativa é amplamente utilizada para produção de mudas com a utilização de técnicas que evoluíram da estaquia convencional, tais como a miniestaquia e a microestaquia, que proporcionaram benefícios no processo de produção de mudas (XAVIER et al., 2009). A miniestaquia surgiu a partir das limitações da microestaquia com relação ao aspecto operacional, técnico e econômico, e consiste na utilização de brotações de plantas propagadas pelo método da estaquia convencional, bem como de mudas produzidas pela própria miniestaquia ou por microestaquia, como fonte de propágulos vegetativos (XAVIER e WENDLING, 1998; ALFENAS et al., 2004; ASSIS e MAFIA, 2007; XAVIER et al., 2009). Já na microestaquia, são utilizados propágulos (microestacas) rejuvenescidos a partir de micropropagação, constituindo-se em um processo de propagação vegetativa dependente da estrutura de laboratório de cultura de tecidos (XAVIER e COMÉRIO, 1996; ASSIS e MAFIA, 2007; XAVIER et al., 2009).

A micropropagação ou técnica de propagação vegetativa *in vitro* apresenta diversas aplicações na área florestal, dentre as quais: a conservação de germoplasma *in vitro*; a aceleração dos programas de melhoramento, visando à propagação massal de genótipos selecionados (WATT et al., 2003; XAVIER et al., 2007); o rejuvenescimento de clones e a obtenção de sementes sintéticas; e a limpeza clonal para obtenção de culturas livres de patógenos, além de constituir base para outras biotecnologias (XAVIER et al., 2007), como a genética molecular (WATT et al., 2003). No entanto, o desafio desta técnica tem sido torná-la acessível e economicamente viável, pois necessita de alto investimento em infraestrutura e mão-de-obra especializada (SOUZA et al., 2006).

A evolução das técnicas de propagação de plantas, a partir dos avanços alcançados no melhoramento genético e na biotecnologia, tem possibilitado desenvolver novos equipamentos para produção de mudas *in vitro*, principalmente com o objetivo de potencializar os benefícios da micropropagação e mitigar suas dificuldades, tornando esta

técnica mais simples e menos dispendiosa. Tais equipamentos têm sido empregados a partir do interesse de profissionais na automatização e na aplicação de tecnologias em escala comercial na cultura de tecidos (PENCHEL et al., 2007).

Dentre estes equipamentos, os biorreatores têm sido empregados no cultivo sob imersão temporária ou permanente de células, gemas, embriões ou qualquer tipo de propágulo que possa ser usado na micropropagação (TEIXEIRA, 2002), constituindo uma alternativa para micropropagação de mudas de espécies florestais em escala comercial, com redução de mão-de-obra e espaço físico, ganhos na produtividade e uso de meio nutritivo líquido. A automatização e o uso em larga escala do cultivo em meio líquido para a propagação *in vitro* de plantas têm sido considerados a chave para superar as barreiras impostas pelo alto custo de produção do cultivo em meios gelificados.

Este trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento de metodologias de micropropagação de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, utilizando dois sistemas de biorreatores de imersão temporária: o sistema RITA[®] (ALVARD et al., 1993; TEISSON et al., 1995) e o sistema BIT[®] (TEIXEIRA, 2002), contribuindo para a aplicação desta técnica na micropropagação intensiva de espécies lenhosas.

Como objetivos específicos, este trabalho visou: i) à avaliação de diferentes composições salinas de meios de cultura e relações entre os fitorreguladores BAP e ANA que proporcionassem maior produtividade e qualidade dos explantes, na fase de multiplicação em biorreator RITA[®]; ii) à avaliação de cinco relações de $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$ e à comparação entre o cultivo em ágar e em biorreator RITA[®], quanto ao crescimento dos explantes, na fase de multiplicação; iii) à avaliação de diferentes manejos de cultivo em biorreatores, com relação à frequência da imersão, tipo de suporte de apoio dos explantes dentro do biorreator e ao controle da atmosfera gasosa do recipiente, na fase de multiplicação em biorreator RITA[®]; e iv) à avaliação de diferentes períodos de cultivo no alongamento *in vitro* de multibrotações, utilizando como recipientes de cultivo potes plásticos (meio semissólido) e biorreatores de imersão temporária RITA[®] e BIT[®] (meio líquido).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biorreatores

Os sistemas de micropropagação vêm sendo desenvolvidos para obtenção de melhorias do processo de produção vegetal *in vitro*, focando a redução dos custos (LORENZO et al., 1998), destacando-se entre eles os sistemas de biorreatores.

Os biorreatores derivaram de equipamentos conhecidos como fermentadores, que há décadas eram utilizados no cultivo de células e microrganismos, visando à produção de metabólitos secundários, alcaloides, entre outros, para fins industriais (TEIXEIRA, 2002; CID et al., 2002; PENCHEL et al., 2007). Nos últimos anos, vários tipos de biorreatores passaram a ser utilizados para o cultivo vegetal, tendo como objetivo final a produção de mudas em larga escala (TEIXEIRA, 2002). Esses biorreatores despertaram atenção para a micropropagação de espécies arbóreas em biofábricas (PENCHEL et al., 2007), sendo fundamentalmente classificados de acordo com o modo de agitação e pela construção do frasco como: aerador agitador, tambor rotatório, filtro rotatório, borbulhamento, aeração simples e coluna de bolha, levantamento de ar, fase gasosa, aeração por membrana porosa ao oxigênio, sobre-aeração e imersão temporária (TAKAYAMA e AKITA, 1994; 2006; TEIXEIRA, 2002; PENCHEL et al., 2007).

Segundo Teixeira (2002), os biorreatores podem ser conceituados como equipamentos para cultivo sob imersão temporária ou permanente de células, gemas, embriões ou qualquer tipo de propágulo que possa ser utilizado na micropropagação. São eficazes, pois consistem de um sistema com certo grau de automação, possibilitando redução de mão-de-obra e alta produção na multiplicação de plantas (PENCHEL et al., 2007).

Dois tipos de biorreatores têm sido mais utilizados na micropropagação de plantas: os biorreatores de imersão permanente ou contínua que proporcionam contato permanente do material vegetal com o meio de cultura, são mais complexos em relação à sua montagem e funcionamento, menos versáteis quanto ao seu uso e de difícil manipulação durante as fases de produção (TEIXEIRA, 2002); e os de imersão temporária em que o contato é temporário e pode ser controlado de acordo com as necessidades da cultura. O sistema de imersão temporária é o que tem apresentado melhores condições de cultivo para espécies vegetais, pela menor ocorrência de hiper-hidricidade (ZIV, 1995) e por apresentar maior facilidade de uso em comparação com outros sistemas, além de possibilitar maior período de cultivo (ALVARD et al., 1993; ETIENNE e BERTHOULY, 2002).

As vantagens do uso de biorreatores no cultivo de plantas se devem, principalmente, ao uso do meio nutritivo líquido, proporcionando maior eficiência do processo de propagação (TAKAYAMA e AKITA, 1994; ZIV, 1995; CALDAS et al., 1998; LEMOS et al., 2001; ETIENNE et al., 2006; PENCHEL et al., 2007), manuseio mais simples da cultura, economia de mão-de-obra e tempo das operações; aeração forçada, que estimula o crescimento e a obtenção de maior biomassa; agitação da cultura no biorreator, que resulta na perda de dominância apical e estimula o crescimento de maior número de brotações nos explantes (TAKAYAMA e AKITA, 1994); a composição do meio pode ser mudada por simples transferência; e a esterilização do meio pode ser feita por ultrafiltração ou autoclavagem (ALVARD et al., 1993), além de ser de rápido preparo e de baixo custo em relação ao meio semissólido (CALDAS et al., 1998).

O primeiro relato sobre o uso de biorreatores para propagação vegetal data de Takayama e Misawa (1981), porém, o uso destes sistemas ainda é limitado a um pequeno número de espécies, existindo ainda a necessidade de controlar o ambiente interno e de definir protocolos necessários para a formação de plantas vigorosas.

Estudos utilizando biorreatores de imersão temporária vêm sendo desenvolvidos com diversas espécies vegetais frutíferas e ornamentais, como abacaxi (ESCALONA et al., 1999), banana (LEMOS et al., 2001), cana-de-açúcar (LORENZO et al., 1998), batata (TEISSON e ALVARD, 1999) e helicônia (RODRIGUES et al., 2006). Para espécies lenhosas, como o gênero *Eucalyptus*, por exemplo, alguns estudos foram realizados com uso destes sistemas (CASTRO e GONZÁLEZ, 2002; REIS et al., 2003; McALISTER et al., 2005), obtendo-se resultados positivos. No entanto, para introdução desta tecnologia em escala operacional para uma maior diversidade de materiais genéticos, ainda são necessários diversos ajustes no manejo do equipamento e da cultura.

2.2. Biorreatores de imersão temporária

Muitos protótipos de imersão temporária têm sido desenvolvidos para diferentes culturas na tentativa de reduzir os custos, aumentar a produtividade e manter a qualidade genética do material vegetal submetido à técnica (RODRIGUES et al., 2006).

Os sistemas de imersão temporária são diferenciados em relação ao tamanho do recipiente, tipo de suporte da cultura, existência de controle computadorizado da imersão ou simples *timer*, uso de bomba peristáltica, bomba de ar ou movimentação mecânica do

recipiente para deslocamento do meio líquido, reciclagem ou não do meio, e separação ou incorporação do reservatório de meio com o recipiente de cultivo. Características comuns destes sistemas são os recipientes maiores que os frascos de cultura convencional, transparentes e autoclaváveis (ETIENNE e BERTHOULY, 2002).

Tisserat e Vandercook (1985) foram um dos primeiros pesquisadores a desenvolver um sistema de imersão temporária que poderia ser utilizado para o cultivo de plantas. Este sistema consistia em uma grande câmara de cultivo elevada que, periodicamente, era drenada e inundada com meio de cultura fresco. Estas operações eram controladas por um computador.

Alguns anos depois, Aitken-Christie et al. (1988) desenvolveram um sistema semiautomatizado para a multiplicação de *Pinus radiata*, no qual as plantas eram cultivadas em um grande recipiente em meio semissólido (ágar) com adição e remoção automática e temporária do meio líquido. O líquido proveniente do recipiente de meio de cultura fresco ficava em contato com os explantes por 4-6 horas e depois era drenado para o recipiente de drenagem.

Simonton et al. (1991) desenvolveram um equipamento controlado por um computador, que consiste em um recipiente de sete litros onde o material vegetal ficava sustentado em uma tela dentro do recipiente. Este equipamento permite a ciclagem do meio de cultura, com aplicação intermitente do meio líquido nos explantes. O controle automatizado é capaz de controlar a introdução do meio de cultura, a regulação da profundidade dentro de quatro recipientes de cultivo individualizados, a ciclagem do meio em um horário determinado, o ajuste de horário durante um período de cultivo e a substituição do meio.

O sistema desenvolvido por Alvard et al. (1993) para o cultivo de banana deu origem ao sistema RITA[®] (TEISSON et al., 1995), só diferindo em relação à construção do frasco. Este sistema é composto por um frasco com dois compartimentos, um superior que contém as plantas e outro inferior onde fica armazenado o meio líquido de cultura. A frequência e a duração da imersão são controladas pela aplicação programada de ar comprimido no compartimento inferior. Este sistema vem sendo utilizado para diversas espécies e com diferentes tipos de explantes.

Os sistemas desenvolvidos por Lorenzo et al. (1998) e Escalona et al. (1999) consistem em uma modificação do modelo de Alvard et al. (1993), com a utilização de dois frascos, um para o cultivo do material vegetal e o outro para estocagem do meio de cultura. Os dois recipientes são conectados por tubos de silicone e de vidro e o período e a duração da imersão são controlados por *timer*.

Um sistema de biorreator constituído por dois frascos conectados por tubos de silicone, um contendo o meio de cultura e o outro o material vegetal, tendo como base os modelos de Alvard et al. (1993) e Lorenzo et al. (1998), foi desenvolvido por Teixeira (2002) na Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia. Este equipamento permite uma grande versatilidade de usos, pode ser construído com diferentes tipos de frascos, sua montagem e componentes são simples, pode comportar diferentes números de frascos de cultivo, pode ser montado em diferentes ambientes, além de poder ser utilizado para cultivo em regime de imersão temporária ou contínua, entre outras características (TEIXEIRA, 2002).

Penchel et al. (2007) citam como as principais características, que constituem as vantagens do sistema de imersão temporária: (i) a redução da hiper-hidricidade, comparada à imersão permanente; (ii) a possibilidade de manejo da frequência e duração da imersão; (iii) a melhor resposta de crescimento devido ao contato direto do material vegetal com o meio; (iv) a proteção contra contaminação exógena por causa dos dutos de ventilação acoplados aos frascos; e (v) a ausência de agitação ou aeração que evita estresses mecânicos nos tecidos vegetais.

Em comparação ao sistema convencional semissólido, a imersão temporária proporciona maior contato do explante com o meio de cultura, aumentando a absorção de nutrientes e conseqüente melhor aproveitamento do meio (LEMOS et al., 2001), assim como melhor controle do ambiente gasoso dentro do frasco de cultura (PENCHEL et al., 2007). A renovação do ar durante o período de transferência do meio elimina possíveis gases prejudiciais produzidos pelo metabolismo das plantas e favorece o crescimento dos explantes nos biorreatores (LEMOS et al., 2001).

2.3. Uso de biorreatores na propagação de *Eucalyptus*

Existem poucos estudos que enfocam o uso de biorreatores na propagação de espécies lenhosas. Para o gênero *Eucalyptus*, alguns estudos vêm sendo realizados com sucesso, utilizando-se o princípio do sistema de imersão temporária RITA[®], mas ainda com grandes dificuldades em algumas etapas do processo de produção.

Castro e González (2002) testaram um sistema de imersão temporária que se constituiu em uma adaptação do sistema RITA[®] na micropropagação de *Eucalyptus grandis*. Os autores observaram superioridade do sistema de imersão temporária em comparação ao sistema convencional semissólido para várias características, entre elas, a taxa de

multiplicação e a qualidade das brotações, concordando com outros autores (REIS et al., 2003; McALISTER et al., 2005).

Reis et al. (2003) encontraram um incremento de 8 vezes em biomassa fresca e de 2,5 vezes no comprimento de brotos de uma variedade elite de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, utilizando o sistema RITA[®], em comparação ao meio semissólido convencional (ágar). Porém, um dos problemas observados pelos autores foi a alta incidência de brotos hiperídricos no sistema de imersão temporária.

McAlister et al. (2005) utilizaram o sistema RITA[®] para produção de clones comerciais de eucalipto e constataram que este sistema é mais eficiente que o sistema semissólido na propagação de clones de difícil enraizamento. Neste estudo, o sistema RITA[®] produziu plantas de melhor qualidade, o que interferiu positivamente no seu enraizamento e aclimatização. As plantas produzidas no sistema RITA[®] apresentaram menor formação de calo e maior percentual de enraizamento direto da base da estaca.

O sistema RITA[®] tem grande potencial para produção, em larga escala, de mudas de eucalipto, a partir de culturas livres de contaminações, obtidas via sistema semissólido (McALISTER et al., 2005). No entanto, muitos ajustes no manejo do equipamento ainda precisam ser estabelecidos para a cultura. Outros importantes estudos foram conduzidos em sistemas de imersão temporária para espécies lenhosas, como, por exemplo, experimentos com multiplicação de tecidos meristemáticos em *Pinus radiata* (AITKEN-CHRISTIE et al., 1988), embriogênese somática e crescimento de calo em *Hevea brasiliensis* (ETIENNE et al., 1997; MARTRE et al., 2001) e embriogênese somática de cacau (NIEMENAK et al., 2008).

2.4. Cultivo em biorreatores

Diversos são os fatores que influenciam a micropropagação em biorreatores, entre eles destacam-se o uso do meio líquido, o tipo e a aeração do recipiente, a atmosfera gasosa do frasco de cultivo, e, principalmente, as condições de manejo da cultura, tais como: o manejo dos intervalos de imersão, a composição mineral e orgânica do meio de cultura, concentração dos reguladores de crescimento e recalcitrância do material vegetal à técnica utilizada.

O uso de culturas líquidas permite maior contato da cultura com o meio, proporcionando incremento em produtividade e eficiência do processo de propagação (PENCHEL et al., 2007). No entanto, a utilização de meio líquido de cultura está associado com alta mobilidade de água e também com alta umidade relativa no ambiente *in vitro*,

induzindo a presença de sintomas da hiper-hidricidade. O status da água no meio de cultura está entre os fatores mais importantes afetando a hiper-hidricidade, além da concentração de reguladores de crescimento e compostos nitrogenados (GASPAR et al., 1987).

O manejo da cultura, como a determinação da frequência e da duração da imersão, é fator fundamental para obtenção de maior coeficiente de multiplicação e melhor qualidade das plantas em sistemas de imersão temporária (CASTRO e GONZÁLEZ, 2002). Alguns estudos focaram o manejo dos intervalos e duração da imersão em espécies do gênero *Eucalyptus* (CASTRO e GONZÁLEZ, 2002; McALISTER et al., 2005) e em plantas como helicônia (RODRIGUES et al., 2006) e banana (LEMOS et al., 2001). Na maioria dos casos, os menores intervalos entre as imersões favorecem o desenvolvimento das culturas pelo maior aproveitamento do meio de cultura líquido pela planta.

O acúmulo de substâncias, produzidas pelas plantas, na atmosfera gasosa dos recipientes de cultivo, como, por exemplo, o etileno, influencia o desenvolvimento das culturas (GASPAR, 1991; PARK et al., 2004), assim como a alta umidade relativa, próxima a 100%, que afeta a taxa de transpiração das culturas (SAHER et al., 2005), sendo estes agentes indutores de mudanças morfológicas nas plantas.

As trocas gasosas entre o interior e o exterior dos frascos de cultivo são essenciais para o desenvolvimento vigoroso das culturas *in vitro*. Diversos estudos tratam do ambiente gasoso dos recipientes de cultivo influenciando o desenvolvimento das culturas (GASPAR, 1991; ZIV, 1991; 1995; CHAKRABARTY et al., 2005; AFREEN, 2006), e a ventilação ou trocas gasosas como uma medida de prevenção de estresses, como a hiper-hidricidade (MAJADA et al., 2000; PARK et al., 2004). LAI et al. (2005) relatam a importância da ventilação na diminuição da umidade relativa dentro do recipiente e para remoção do etileno, CO₂ e outros componentes voláteis acumulados na atmosfera dos frascos de cultivo para obtenção de brotações não-hiperídricas. Castro e González (2002) alcançaram êxito na micropropagação de *Eucalyptus grandis* em sistema de imersão temporária a partir da incorporação de ar adicional ao recipiente da cultura. Em maçã, a hiper-hidricidade foi completamente eliminada com o fornecimento de ar dentro da câmara do biorreator (CHAKRABARTY et al., 2003).

O meio de cultura tem a função de fornecer as substâncias essenciais para o crescimento de células tecidos e órgãos das plantas, além de controlar o padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS et al., 1998). A resposta ao tipo e composição do meio de cultura varia não somente de acordo com a espécie, mas entre genótipos de uma mesma espécie e até entre explantes de um mesmo genótipo, que apresentam demandas específicas (SOUZA et al., 2006), sendo diferenciada também pelas diferentes etapas do processo de

produção de mudas *in vitro*, estabelecimento, multiplicação e enraizamento (SANTOS-SEREJO et al., 2006).

Os meios nutritivos baseiam-se nas exigências nutricionais das plantas, quanto aos nutrientes minerais, sendo a fonte de nitrogênio um fator que influencia o comportamento das culturas, principalmente pela relação entre os íons nitrato e amônio, que aparecem relacionados com características de crescimento da cultura *in vitro*, como a taxa de multiplicação das plantas (SANTOS-SEREJO et al., 2006), a diferenciação de células e tecidos e desordens fisiológicas como a hiper-hidricidade (ZIV et al., 1987). No cultivo de *Eucalyptus grandis* em biorreatores de imersão temporária, Castro e Gonzáles (2002) obtiveram melhor taxa de multiplicação de brotos axilares reduzindo à metade as concentrações de nitrato de amônio e nitrato de potássio do meio básico MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962).

O meio MS original ou com modificações em seus constituintes orgânicos e inorgânicos é o mais utilizado no cultivo *in vitro* de plantas, em culturas líquidas ou solidificadas (ZIV, 1995). Este meio contém 40 mM de NO_3^- e 20 mM de NH_4^+ , e o crescimento das células e tecidos das plantas está relacionado à alta concentração destes íons. Outros meios utilizados são o WPM (Wood Plant Medium) de Loyd e McCown (1980), que foi desenvolvido, visando ao cultivo *in vitro* de brotações de plantas lenhosas e apresenta 1/4 das concentrações de NO_3^- e NH_4^+ do meio MS; o meio JADS (CORREIA, 1993), que possui a composição nutricional dos constituintes inorgânicos que favorecem o crescimento ótimo de *E. grandis in vitro*; e o meio QL (QUOIRIN e LEPOIVRE, 1977).

Os reguladores de crescimento adicionados ao meio têm por finalidade suprir as deficiências dos níveis endógenos de hormônios nos explantes, estimulando respostas no crescimento, alongamento e multiplicação (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; SANTOS-SEREJO et al., 2006). De acordo com os objetivos da cultura, da espécie de interesse e do padrão de explantes cultivados, determinam-se o tipo e o teor do regulador a ser utilizado, sendo as classes das auxinas e citocininas as mais importantes na regulação do crescimento e morfogênese na cultura de órgão e tecidos vegetais (XAVIER et al., 2009).

As auxinas são responsáveis por induzir a dominância apical e ativação do crescimento das células do câmbio. Os maiores usos desta classe de reguladores na propagação de plantas são na indução do enraizamento adventício em estacas e no controle da morfogênese na micropropagação. As citocininas são essenciais para a divisão celular. A interação entre auxina e citocinina é muito importante na propagação de plantas. Uma alta razão auxina/citocinina favorece o enraizamento, já o contrário, uma alta razão

citocinina/auxina promove a formação de brotos, e uma alta concentração destes dois reguladores de crescimento causa o desenvolvimento de calo (HARTMANN et al., 2002).

O AIA (ácido 3-indolacético) é a auxina menos estável em meio de cultura, pois sofre fotoxidação e ação da AIA-oxidase nos tecidos dos explantes. O uso da AIA pode ser interessante no início do cultivo, suprindo as necessidades dos explantes, sem o efeito prolongado que pode resultar na formação de calo e comprometimento da parte aérea (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). O ácido giberélico (GA3), giberelina, tem como função na planta promover o alongamento de brotos através do aumento da divisão e do alongamento celular (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; HARTMANN et al., 2002).

O uso de reguladores em culturas líquidas controla mais efetivamente o potencial morfogênico em razão do contato direto dos explantes com o meio de cultura (ZIV, 1995).

Muitos fatores interferem na micropropagação de plantas, principalmente em se tratando do uso de biorreatores e meio líquido de crescimento. Além disso, fatores ambientais como a aeração do meio de cultura e controle de seu fluxo, a qualidade e intensidade da luz e fotoperíodo podem influenciar o crescimento e desenvolvimento dos explantes. Dessa maneira, fica clara a necessidade de ajuste do protocolo de micropropagação, de acordo com o material genético de interesse.

2.5. Hiper-hidricidade e biorreatores

Apesar das inúmeras vantagens, o uso do meio líquido e de recipientes como os biorreatores podem ocasionar o surgimento de desordens nas plantas. As condições de cultivo *in vitro*, como alta umidade (GASPAR, 1991), acúmulo de gases nos recipientes, altos níveis de reguladores de crescimento, fatores nutricionais como minerais e carboidratos, baixa intensidade luminosa e elevada disponibilidade de água no substrato, são os maiores indutores de desordens fisiológicas nas plantas, como a hiper-hidricidade (ZIV, 1991; MAJADA et al., 2000).

Esta desordem é considerada o maior problema das plantas cultivadas em culturas líquidas e, conseqüentemente, constitui um obstáculo para o sucesso do uso dos biorreatores na propagação de plantas (ZIV, 1995; PENCHEL et al., 2007). Com o emprego de biorreatores, o fator disponibilidade de água é ainda ampliado pelo uso do meio líquido, o qual está associado com alta mobilidade de água e também com alta umidade relativa no

ambiente *in vitro*, induzindo assim a presença de sintomas da hiper-hidricidade (GASPAR et al., 1987).

Hiper-hidricidade é o termo geralmente usado para caracterizar más formações que afetam a propagação *in vitro* de plantas herbáceas e lenhosas. Está associada a severos danos a nível celular e subcelular, que levam a mudanças morfológicas e bioquímicas nas plantas, tendo como uma de suas principais consequências o estresse oxidativo (SREEDHAR et al., 2009). Caracteriza-se morfológicamente pelo aspecto translúcido das plantas, brotos alongados e espessos em diâmetro, entrenós mais curtos do que as plantas normais, e as folhas se apresentam espessadas, frequentemente alongadas, enrugadas ou enroladas e quebradiças (GASPAR, 1991; ZIV, 1991). Anatomicamente, em eucalipto, como na maioria dos outros vegetais, ocorrem redução na deposição de parede celular, menor número de organelas e mais espaços intercelulares, desenvolvimento anormal da epiderme e da cutícula, estômatos mal formados, menor quantidade de clorofila e cloroplastos por célula e pouca diferenciação entre tecido paliçádico e esponjoso (JONES et al., 1993; PICOLI et al., 2008). Fisiologicamente, envolve o excesso da absorção de água e a inibição da síntese de lignina e celulose (HARTMANN et al., 2002).

Este fenômeno se manifesta principalmente nas folhas, afetando as trocas gasosas e o potencial fotossintético, impedindo que as plantas afetadas se estabeleçam em condições *ex vitro* (ZIV, 1991). Constitui grande limitação para ao cultivo *in vitro*, uma vez que pode afetar a multiplicação de gemas, o vigor da cultura e também impossibilitar a aclimatização das plantas nas condições *ex vitro*, limitando o uso destas técnicas de cultivo para a propagação em larga escala de plantas.

Trabalhos relatam como principais alternativas para o controle desta desordem fisiológica o uso de agente antivitrificante EM2 (Sigma-Aldrich®) (WHITEHOUSE et al., 2002), o uso de ágar hidrolisado (MARGA et al., 1997), o aumento das concentrações de ágar (BRAND, 1993; ABDOLI et al., 2007), de ferro, de magnésio (YADAV et al., 2003) e de nitrato de prata (MAYOR et al., 2003) no meio de cultura, e o resfriamento da base dos frascos de cultivo (SAHER et al., 2005).

3. REFERÊNCIAS

- ABDOLI, M.; MOIENI, A.; DEHGHANI, H. Effects of cultivar and agar concentration on *in vitro* shoot organogenesis and hyperhydricity in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Pakistan Journal of Botany**, v. 39, n. 1, p. 31-35, 2007.
- AFREEN, F. Temporary immersion bioreactor – Engineering considerations and applications in plant micropropagation. In: GUPTA, S. D.; IBARAKI, Y. (Eds.). **Plant tissue culture engineering**. Dordrecht: Springer, 2006. p. 187-201.
- AITKEN-CHRISTIE, J.; SINGH, A. P.; DAVIES, H. Multiplication of meristematic tissue: a new tissue culture system for radiata pine. In: HANOVER, J. W.; KEATHLEY, D. E. (Eds.). **Genetic manipulation of wood plants**. New York: Plenum, 1988. p. 413-432.
- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: UFV, 2004. 442 p.
- ALVARD, M.; COTE, F.; TEISSON, C. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 32, p. 55-60, 1993.
- ASSIS, T. F. de; MAFIA, R. G. Hibridação e Clonagem. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia Florestal**. Viçosa: UFV, 2007. cap. 5, p. 93-121.
- BRAND, M. H. Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 35, p. 203-209, 1993.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E.. Meios nutritivos. 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. v. 1, p. 183-260.
- CASTRO, D. R.; GONZÁLEZ, O. J. Micropropagación de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) en el sistema de inmersión temporal. **Agricultura Técnica**, v. 62, p. 68-78, 2002.
- CHAKRABARTY, D.; HAHN, E. J.; YUN, Y. S.; PAEK, K. Y. Micropropagation of apple root stock ‘M9 EMLA’ using bioreactor. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.78, p. 605-609, 2003.
- CHAKRABARTY, D.; PARK, S.Y.; ALI, M.B.; SHIN, K. S.; PAEK, K. Y. Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. **Tree Physiology**, v. 26, p. 377-388, 2005.
- CID, L. P. B.; CRUZ, A. R. R.; TEIXEIRA, J. M. Biorreatores de imersão permanente. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 25, p. 50-53, 2002.
- CORREIA, D. **Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de *Eucalyptus* spp. *in vitro* em meio de cultura líquido e sólido**. 1993. 113 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

ESCALONA, M.; LORENZO, J. C.; GONZALEZ, B.; DAQUINTA, M.; GONZALEZ, J. L.; DESJARDINS, Y.; BARROTO, C. G. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) micropropagation in temporary immersion system. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 743-748, 1999.

ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion system in plant micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 215-231, 2002.

ETIENNE, H.; DECHAMP, E.; BARRY-ETIENNE, D.; BERTRAND, B. Bioreactors in coffee micropropagation. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 45-54, 2006.

ETIENNE, H.; LARTAUD, M.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; CARRON, M. P.; BERTHOULY, M.; TEISSON, C. Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* using the temporary immersion technique. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 33, p. 81-87, 1997.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; DEBERGH, P.; MAENE, L.; PAQUES, M.; BOXUS, P. Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Eds.). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. v. 1, p. 152-166.

GASPAR, T. Vitrification in micropropagation. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry – High-tech and micropropagation I**. Berlin: Springer, 1991. v. 17, p. 116-126.

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. v. 1, p. 183-260.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T. GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 7. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. 880 p.

JONES, N. B.; DRENNAN, P. M.; VAN STADEN, J. Leaf anatomy, chloroplast organization and photosynthetic rate of hyperhydric *Eucalyptus saligna* Sm. Material. **South African Journal of Botany**, v. 59, n.5, p. 551-555, 1993.

LAI, C.; LIN, H.; NALAWADE, S. M.; FANG, W.; TSAY, H. Hyperhydricity in shoot cultures of *Scrophularia yoshimurae* can be effectively reduced by ventilation of culture vessels. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 355-361, 2005.

LEMOS, E. E. P.; FERREIRA, M. S.; ALENCAR, L. M. C.; OLIVEIRA, J. G. L.; MAGALHÃES, V. S. Micropropagação de clones de banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, p. 482-487, 2001.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society**, v. 30, p. 421-426, 1980.

LORENZO, J. C.; GONZALEZ, B. L.; ESCALONA, M.; TEISSON, C.; ESPINOSA, P.; BARROTO, C. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 54, p. 197-200, 1998.

MAJADA, J. P.; TADEO, F.; FAL, M.A.; SÁNCHEZ-TAMÉS, R. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 63, p. 207-214, 2000.

MARGA, F.; VEBRET, L.; MORVAN, H. Agar fractions could protect apple shoots cultured in liquid media against hyperhydricity. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 49, p. 1-5, 1997.

MARTRE, P.; LACAN, D.; JUST, D.; TEISSON, C. Physiological effects of temporary immersion on *Hevea brasiliensis* callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 67, p. 25-35, 2001.

MAYOR, M. L.; NESTARES, G.; ZORZOLI, R.; PICARDILI, L. A. Reduction of hyperhydricity in sunflower tissue cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, p. 99-103, 2003.

McALISTER, B.; FINNIE, J.; WATT, M. P.; BLAKEWAY, F. Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forest (SA). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 347-358, 2005.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NIEMENAK, N.; SAARE-SURMINSKI, K.; ROHSIUS, C.; NDOUMOU, D. O.; LIEBEREI, R. Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 4, p. 667-676, 2008.

PARK, S. W.; JEON, J. H.; KIM, Y. M.; ASWATH, C.; JOUNG, H. Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots in vitro. **Scientia Horticulturae**, v. 99, p. 199-205, 2004.

PENCHEL, R. M.; OTONI, W. C.; XAVIER, A. Tecnologia de biorreatores e propagação fotoautotrófica *in vitro*. In: Borém, A. (Ed.). **Biotechnology Florestal**. Viçosa: UFV, 2007. cap. 4, p. 75-92.

PICOLI, E. A. T.; PAIVA, E. A. S.; XAVIER, A.; AGUIAR, R. M.; CAROLINO, S. M. B.; FÁRI, M. G.; OTONI, W. C. Ultrastructural and biochemical aspects of normal and hyperhydric eucalypt. **International Journal of Horticultural Science**, v. 14, n. 3, p. 61-69, 2008.

QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Improved medium for *in vitro* culture of *Prunus* sp. **Acta Horticulturae**, v. 78, p. 437-442, 1977.

REIS, J. P.; MORAIS, P. B.; PENCHEL, R.; HENRIQUE, A. Micropropagação de eucalipto no sistema de imersão temporária. In: Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 1., 2003, Lavras. **Anais...** p. 276.

RODRIGUES, P. H. V.; TEIXEIRA, F. M.; LIMA, A. M. L. P.; AMBROSANO, G. M. B. Propagação de mudas de helicônia em biorreator de imersão temporária. **Bragantia**, v. 65, n. 1, p. 29-35, 2006.

SAHER, S.; PIQUERAS, A.; HELLIN, E.; OLMOS, E. Prevention of hyperhydricity in micropropagated carnation shoots by bottom cooling: implications of oxidative stress. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 149-158, 2005.

SANTOS-SEREJO, J. A.; JUNGHANS, T. G.; SOARES, T. L.; SILVA, K. M. da. Meios nutritivos para micropropagação de plantas. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. (Org.). **Introdução à micropropagação de plantas**. 1 ed. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006, v. , p. 79-98.

SIMONTON, W.; ROBACKER, C.; KRUEGER, S. A programmable micropropagation apparatus using cycled medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 27, p. 211-218, 1991.

SOUZA, F. V. D.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; COSTA, M. A. P. de C. Micropropagação. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. (Eds.). **Introdução à micropropagação de plantas**. 1 ed. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006, v. , p. 38-52.

SREEDHAR, R. V.; VENKATACHALAM, L.; NEELWARNE, B. Hyperhydricity – related morphologic and biochemical changes in vanilla (*Vanilla planifolia*). **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 28, p. 46-57, 2009.

TAKAYAMA, S.; AKITA, M. Bioengineering aspects of bioreactor application in plant propagation. In: GUPTA, S. D.; IBARAKI, Y. (Eds.). **Plant tissue culture engineering**. Dordrecht: Springer. p. 83-100, 2006.

TAKAYAMA, S.; AKITA, M. The types of biorreator used for shoot and embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 39, p. 147-156, 1994.

TAKAYAMA, S.; MISAWA, M. Mass propagation of *Begonia hiemalis* plantlets by shaken cultures. **Plant Cell Physiology**, v. 22, p. 461-468, 1981.

TEISSON, C.; ALVARD, D.; BERTHOULY, M.; COTE, F.; ESCALANT, J. V.; ETIENNE, H. *In vitro* culture by temporary immersion: a new device. **Plantations**, n. 2, v. 5, p. 32-33, 1995.

TEISSON, C.; ALVARD, D. *In vitro* production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion. **Potato Research**, v. 42, p. 499-504, 1999.

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores. **Biociência, Ciência e Desenvolvimento**, v. 24, p. 36-41, 2002.

TISSERAT, B.; VANDERCOOK, C. E. Development of an automated plant tissue culture system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 5, p. 107-117, 1985.

WATT, M. P.; BLAKEWAY, F. C.; MOKOTEDI, M. E. O.; JAIN, S. M. Micropropagation of *Eucalyptus*. In: JAIN, S. M.; ISHII, K. (Eds.). **Micropropagation of woody trees and fruits**. p. 217-244, 2003.

WHITEHOUSE, A. B.; MARKS, T. R.; EDWARDS, G. A. Control of hyperhydricity in *Eucalyptus* axillary shoot cultures grown in liquid medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 71, p. 245-252, 2002.

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestaquia: Uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 20, n. 1, p. 9-16, 1996.

XAVIER, A.; OTONI, W.C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BOREM, A. (Ed.). **Biotecnologia Florestal**. Viçosa: UFV, 2007. cap. 3, p. 55-74.

XAVIER, A.; WENDLING, I. **Miniestaquia na clonagem de *Eucalyptus***. Viçosa: SIF/UFV, 1998, n. 11, 10 p. (Informativo Técnico SIF).

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. da. **Silvicultura Clonal: princípios e técnicas**. Viçosa: UFV, 2009. 272 p.

YADAV, M. K.; GAUR, A. K.; GARG, G. K. Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, p. 153-156, 2003.

ZIV, M.; SCHWARTZ, A.; FLEMINGER, D. Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated *in vitro*; implications for hardening. **Plant Science**, v. 52, p. 127-134, 1987.

ZIV, M. The control of biorreactor environment for plant propagation in liquid culture. **Acta Horticulturae**, v. 393, p. 25-38, 1995.

ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Eds.). **Micropropagation, technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 45-69.

EFEITOS DO MEIO DE CULTURA E DA RELAÇÃO BAP/ANA NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE CLONES DE *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* EM BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

RESUMO: Foram realizados três experimentos individuais com o objetivo de testar diferentes meios de cultura e relações BAP/ANA, na multiplicação de clones comerciais de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, utilizando o biorreator de imersão temporária RITA[®]. O meio de cultura MS e a frequência de imersão a cada duas horas promoveram maior massa fresca e número de brotos por explantes. No entanto, houve diferença quanto ao crescimento das culturas entre os dois clones avaliados. A combinação 1,0 µM de BAP com 0,5 µM de ANA foi a que apresentou maiores médias em relação à massa fresca e número de brotos. As culturas apresentaram alto percentual de hiper-hidricidade, sendo esta desordem um fator limitante nas condições deste estudo para o cultivo de *Eucalyptus* em biorreatores.

Palavras-chaves: Micropropagação, clonagem de eucalipto, biotecnologia

1. INTRODUÇÃO

Dentre as técnicas de cultivo *in vitro* de plantas, a micropropagação destaca-se entre aquelas de maior interesse científico e econômico, devido às diversas vantagens que apresenta. A micropropagação em escala comercial depende de elevadas taxas de proliferação durante a fase de multiplicação, aspectos qualitativos das brotações nas fases de enraizamento e aclimatização e alto percentual de sobrevivência das plantas, tudo isso acoplado à automatização de algumas etapas do processo (ZIV, 1995). Nas últimas décadas, o uso de biorreatores tem servido como uma alternativa na micropropagação de algumas espécies, por contribuir para a automatização em determinadas fases do cultivo de plantas como a multiplicação, possibilitando a produção em larga escala.

Para espécies lenhosas como as do gênero *Eucalyptus*, ainda são escassos os estudos envolvendo a tecnologia de biorreatores. Reis et al. (2003) e McAlister et al. (2005) obtiveram sucesso no desenvolvimento de culturas de eucalipto em biorreator RITA[®], em relação ao meio semissólido, porém os autores relataram alta incidência de explantes hiper-hídricos. Castro e González (2002) utilizaram um sistema de imersão temporária adaptado do sistema

RITA[®], com frascos gêmeos, para o cultivo de clones de *Eucalyptus grandis*, e também constataram incremento nas características de crescimento e viabilidade do uso da técnica, a partir do controle da hiper-hidricidade dos explantes, obtido por meio da incorporação de ar ao recipiente da cultura, manejo dos intervalos de imersão e da composição do meio de cultura. Outros relatos do uso de sistemas de imersão temporária no cultivo de plantas lenhosas são relacionados, principalmente, à embriogênese somática de coníferas (AITKEN-CHRISTIE et al., 1988; GUPTA e TIMMIS, 2005), *Hevea brasiliensis* (ETIENNE et al., 1997) e café (ETIENNE et al., 2006).

Diversas variáveis podem influenciar na fase de multiplicação, entre elas, a composição do meio de cultura utilizado, o ambiente de crescimento e a manipulação do material vegetal durante os subcultivos. Apesar de o objetivo da fase de multiplicação ser a produção do maior número de plantas possível, os aspectos qualitativos dos explantes são de suma importância, entre eles, o mínimo de variação dos explantes e homogeneidade da parte aérea produzida, que vão determinar o sucesso nas fases seguintes de enraizamento e aclimatização (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Diferentes meios básicos de cultura podem ser utilizados na fase de multiplicação, dependendo das necessidades de cada espécie vegetal. Estudos que definem a concentração ótima de citocininas para a multiplicação e suas combinações com outros reguladores são importantes para o ajuste dos meios de cultura (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; SANTOS-SEREJO et al., 2006).

Os objetivos deste trabalho foram avaliar diferentes tipos de meios de cultura e relações BAP/ANA no meio MS, na micropropagação de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, utilizando biorreatores de imersão temporária RITA[®].

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Fonte, meio de cultura e condições de cultivo dos explantes

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Pesquisa e Tecnologia - CPT da empresa Fibria (antiga Aracruz Celulose SA), localizada no município de Aracruz, Espírito Santo.

O material vegetal utilizado para introdução nos biorreatores foram clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1 e C2), provenientes da empresa Fibria, pré-

estabelecidos *in vitro* por meio da micropropagação em meio de cultura semissólido. Foram cultivados em placas de Petri estéreis e descartáveis (Pleion Bioplass[®]), de 90 mm de diâmetro x 15 mm de altura (Figura 1A), contendo 25 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), adicionado de 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma[®]), 10 mg L⁻¹ de tiamina-HCl (Sigma[®]), 0,50 mg L⁻¹ de ácido nicotínico (Sigma[®]), 0,50 mg L⁻¹ de piridoxina-HCl (Sigma[®]), 100 mg L⁻¹ de L-glutamina (Sigma[®]), 0,34 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina – Sigma[®]), 0,01 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético – Sigma[®]), 30 g L⁻¹ de sacarose (Vetec[®]) e 7 g L⁻¹ de bacto-ágar (BD[®]). O pH foi ajustado para 5,8 com KOH (1N) e HCl (1N) antes da adição do ágar e da esterilização em autoclave a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121°C por 15 minutos. O material vegetal foi estabelecido em prateleiras de metal aramado com iluminação vertical e lateral, acondicionado em sala de cultura a 24 ± 2°C, fotoperíodo de 14 horas e irradiância média de 20 μmol m⁻² s⁻¹ medida no aparelho Optic Science - Modelo DQM.

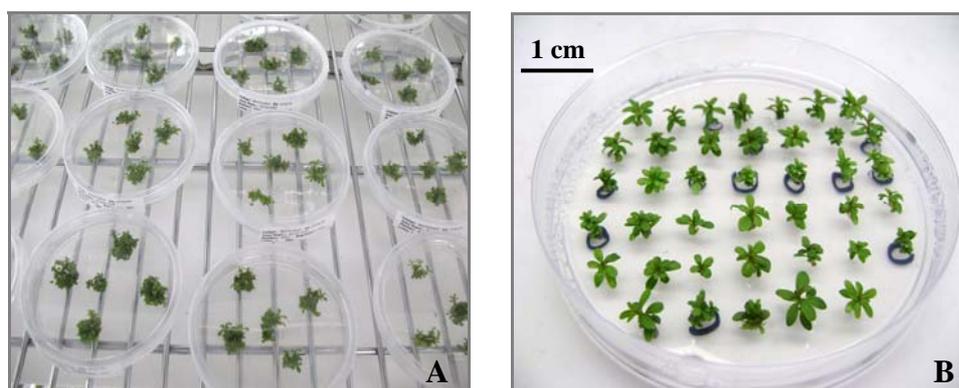


Figura 1 – Banco clonal *in vitro* (A) e brotos apicais utilizados como explantes iniciais (B) no cultivo em biorreatores de imersão temporária RITA[®] do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1).

2.2. Multiplicação em biorreator: Meio de cultura MS e WPM

Neste experimento, foram testados os meios de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD e McCOWN, 1980) (Quadro 1) e duas frequências de imersão, de 2 e 4 horas por um período de 10 segundos, na fase de multiplicação em biorreator de imersão temporária RITA[®] (Vitropic SA) (Figura 2).

Quadro 1 – Concentração de macro e micronutrientes (mg L^{-1}) dos meios de cultura utilizados no cultivo dos clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1 e C2), em biorreatores de imersão temporária RITA[®].

Componentes	Meios de Cultura			
	MS	QL	WPM	JADS
Macronutrientes (mg L^{-1})				
N	840,676	413,076	205,946	365,562
P	38,692	38,692	38,692	92,860
S	53,326	49,691	52,331	100,051
K	783,845	744,978	48,845	430,101
Ca	119,954	33,944	120,537	200,441
Mg	36,486	36,486	36,486	72,923
Micronutrientes (mg L^{-1})				
Fe	5,594	5,594	5,584	11,168
Zn	1,955	0,227	1,955	0,982
Mn	7,249	2,470	5,493	5,493
Cu	0,006	0,008	0,064	0,318
B	1,084	0,175	1,084	0,542
Mo	0,099	0,000	0,099	0,059

MS = MURASHIGE e SKOOG (1962); QL = QUOIRIN e LEPOIVRE (1977); WPM = LLOYD e McCOWN (1980) e JADS = CORREIA (1993)



Figura 2 – Modelo do recipiente de imersão temporária automatizada – RITA[®], utilizado nesta experimentação.

Foram utilizados brotos apicais, com massa fresca e tamanho uniformes, como explantes iniciais de um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1), estabelecidos *in vitro* (Figura 1B). Os explantes foram pré-cultivados, aproximadamente, sete dias antes de sua utilização nos biorreatores RITA[®] para experimentação, permanecendo em placas de Petri contendo meio MS, como descrito no item 2.1, sem adição de reguladores de crescimento.

Aos dois meios básicos de cultura testados, foram adicionados 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 10 mg L⁻¹ de tiamina-HCl, 0,50 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 0,50 mg L⁻¹ de piridoxina-HCl, 0,11 mg L⁻¹ de BAP e 30 g L⁻¹ de sacarose, com pH ajustado para 5,8 com KOH (1N) e HCl (1N), antes da esterilização em autoclave a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121°C por 15 minutos. Utilizou-se o volume de 200 mL de meio de cultura líquido por recipiente, o qual foi autoclavado diretamente dentro dos recipientes dos biorreatores. Após introdução nos biorreatores, o material vegetal foi acondicionado em sala de cultura a 24 ± 2°C, fotoperíodo de 14 horas e irradiância média de 20 μmol m⁻² s⁻¹. Como suporte de apoio para os explantes dentro dos biorreatores, utilizou-se disco de esponja polimérica (Bulpren S 28133, densidade 30 Kg m⁻³) sob papel filtro qualitativo (Nº 1 - Qaly[®]).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 2, sendo dois meios básicos de cultura (MS e WPM) e duas frequências de imersão (2 e 4 horas), com cinco repetições por tratamento, cada repetição constituída por um recipiente RITA[®] contendo oito explantes.

Para avaliação da massa fresca, foi realizada pesagem dos grupos de explantes de cada repetição dos tratamentos aos 0 e 28 dias de idade da cultura. O número de brotos foi obtido pela contagem de novos brotos com dois ou mais pares de folhas desenvolvidos durante o ciclo de cultivo, em todos os explantes, aos 28 dias de idade da cultura. O percentual de hiper-hidricidade foi obtido através da análise visual do grupo de oito explantes de cada repetição, atribuindo-se valores de 0 a 10, aos 0 e 28 dias de idade da cultura.

2.3. Multiplicação em biorreator: Meio de cultura MS, QL e JADS

Este experimento avaliou os meios de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), JADS (CORREIA, 1993) e QL (QUOIRIN e LEPOIVRE, 1977) (Quadro 1), na fase de multiplicação de dois clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1 e C2). Como explantes iniciais, para introdução nos biorreatores RITA[®], foram utilizados tufo de multibrotações, estabelecidos *in vitro* (Figura 3), com massa fresca e tamanho uniformes.

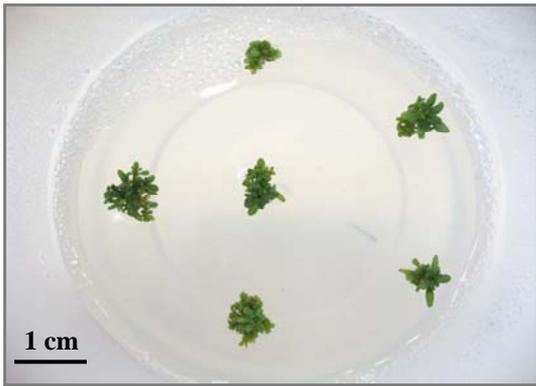


Figura 3 – Tufos de multibrotações padrão dos clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1 e C2) usados como explantes iniciais nos biorreatores de imersão temporária RITA[®].

Aos meios básicos de cultura, foram adicionados 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 10 mg L⁻¹ de tiamina-HCl, 0,50 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 0,50 mg L⁻¹ de piridoxina-HCl, 0,11 mg L⁻¹ de BAP e 30 g L⁻¹ de sacarose, com pH ajustado para 5,8 com KOH (1N) e HCl (1N) antes da esterilização em autoclave a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121°C por 15 minutos. Utilizou-se o volume de 250 mL de meio por recipiente, o qual foi autoclavado diretamente dentro dos recipientes dos biorreatores. Após introdução nos biorreatores, o material vegetal foi acondicionado em sala de cultura a 24 ± 2°C, fotoperíodo de 14 horas e irradiância média de 20 μmol m⁻² s⁻¹.

A frequência de imersão utilizada foi de duas horas por um período de 8 segundos e como suporte de apoio para os explantes dentro dos biorreatores utilizou-se disco de esponja polimérica (Bulpren S 28133, densidade 30 Kg m⁻³) sob papel filtro qualitativo (Nº 1 - Qualy[®]).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3 x 2, sendo três meios básicos de cultura (MS, JADS e QL) e dois materiais genéticos (C1 e C2), com quatro repetições por tratamento, cada repetição constituída por um recipiente RITA[®] contendo quatro explantes.

Para avaliação da massa fresca, foi realizada pesagem do grupo de explantes de cada repetição dos tratamentos, aos 0 e 21 dias de idade da cultura. O número de brotos foi obtido pela contagem dos brotos principais (saindo diretamente da base do explante) com dois ou mais pares de folhas, em todos os explantes, aos 0 e 21 dias de idade da cultura. O percentual de hiper-hidricidade foi obtido por meio da análise visual do explante, com a contagem do número de brotos hiper-hídricos em cada explante, aos 0 e 21 dias de idade da cultura.

2.4. Multiplicação em biorreator: Relação BAP/ANA

Este experimento avaliou doze diferentes combinações entre os fitorreguladores BAP/ANA: T1 = 0,0/0,0; T2 = 0,0/0,05; T3 = 0,0/0,5; T4 = 0,5/0,0; T5 = 0,5/0,05; T6 = 0,5/0,5; T7 = 1,0/0,0; T8 = 1,0/0,05; T9 = 1,0/0,5; T10 = 1,5/0,0; T11 = 1,5/0,05; e T12 = 1,5/0,5 μM . Foram utilizados brotos apicais, com massa fresca e tamanho uniformes, como explantes iniciais de um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1), estabelecidos *in vitro*, pré-cultivados, aproximadamente, sete dias antes de sua utilização nos biorreatores RITA[®] para experimentação, permanecendo em placas de Petri contendo meio MS, como descrito no item 2.1, sem adição de reguladores de crescimento.

As combinações foram testadas em meio MS, adicionado de 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 10 mg L^{-1} de tiamina-HCl, 0,50 mg L^{-1} de ácido nicotínico, 0,50 mg L^{-1} de piridoxina-HCl e 30 g L^{-1} de sacarose, com pH ajustado para 5,8 com KOH (1N) e HCl (1N) antes da esterilização em autoclave a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121°C por 15 minutos. Utilizou-se o volume de 250 mL de meio de cultura por recipiente, o qual foi autoclavado diretamente dentro dos recipientes dos biorreatores. Após introdução nos biorreatores, o material vegetal foi acondicionado em sala de cultura a $24 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 14 h e irradiância média de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A frequência de imersão utilizada foi de duas horas por um período de 8 segundos e como suporte de apoio para os explantes dentro dos biorreatores utilizou-se disco de esponja polimérica (Bulpren S 28133, densidade 30 Kg m^{-3}) sob papel filtro qualitativo (Nº 1 - Qualy[®]).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com doze tratamentos (combinações de BAP/ANA) e vinte repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por um explante e cada tratamento constituído por dois recipientes RITA[®] contendo dez explantes.

Para avaliação da massa fresca, foi realizada a pesagem dos explantes aos 0 e 23 dias de idade da cultura. O número de brotos foi obtido pela contagem de novos brotos, com dois ou mais pares de folhas, desenvolvidos durante o ciclo de cultivo, em cada explante aos 23 dias de idade da cultura. O percentual de hiper-hidricidade foi obtido através da análise visual do explante, com a contagem do número de brotos hiper-hídricos em cada explante, aos 0 e 23 dias de idade da cultura.

3. RESULTADOS

3.1. Multiplicação em biorreator: Meios de cultura MS e WPM

O fator frequência de imersão apresentou diferença em relação à característica massa fresca dos explantes, número de brotos e de hiper-hidricidade, sendo a frequência de 2 horas superior à de 4 horas para ambos os meios de cultura avaliados (Figura 4). Os explantes dos tratamentos constituídos pelo meio de cultura WPM, de modo geral, apresentaram menor vigor em relação ao meio de cultura MS, com coloração avermelhada do caule e calosidades nas folhas (Figura 5). Para o percentual de hiper-hidricidade dos explantes, na frequência de 2 horas obteve-se maior percentual de hiper-hidricidade dos explantes para os meios MS (88%) em comparação ao WPM (60%). Já para a frequência de 4 horas, o meio WPM apresentou maior percentual de hiper-hidricidade (32%) do que o meio MS (24%) (Figura 4C).

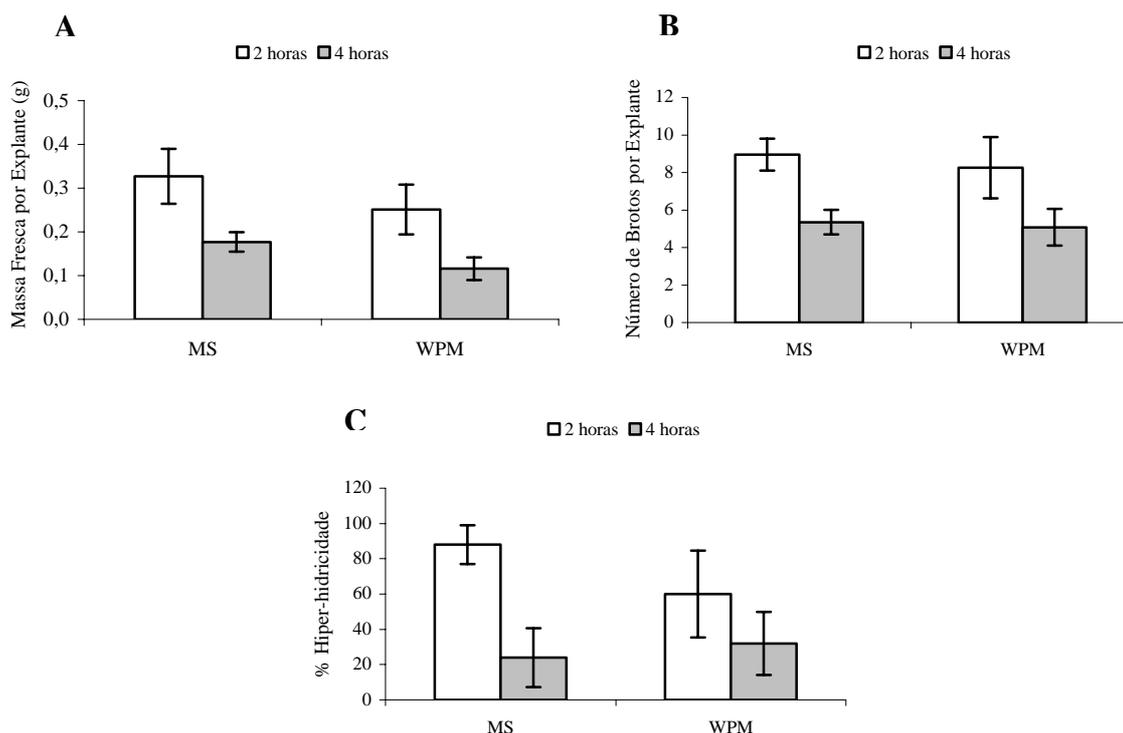


Figura 4 – Massa fresca (A), número de brotos (B) e percentual de hiper-hidricidade (C) de explantes cultivados em meios de cultura MS e WPM, nas duas frequências de imersão estudadas (2 e 4 horas), aos 28 dias de idade da cultura do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1) em biorreatores de imersão temporária RITA[®]. Barras verticais indicam o erro padrão da média.

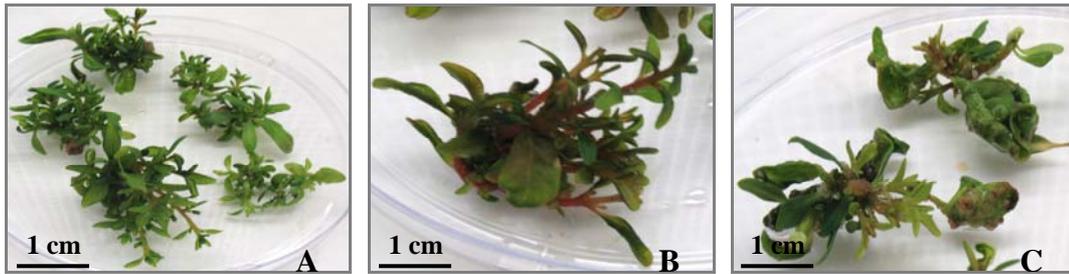


Figura 5 – Brotações do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1) cultivados em biorreator de imersão temporária RITA[®]: tufos de multibrotações, com maior vigor em meio de cultura MS (A) e apresentando coloração avermelhada no caule (B) e calosidade nas folhas (C) em meio WPM, aos 28 dias de idade.

3.2. Multiplicação em biorreator: Meios de cultura MS, QL e JADS

O C1 apresentou médias de massa fresca superiores ao C2 em dois dos três meios de cultura estudados (MS e QL) (Figura 6A). Para o C1, o meio MS tendeu a uma superioridade em relação aos demais, com média de 0,43 g, seguido pelo QL com 0,33 g, e pelo JADS com 0,19 g por explante avaliado. Quanto à característica número de brotos, também o C1 foi superior ao C2 na produção de novos brotos durante o período de cultivo, com média de 11 brotos por explante, em comparação a 5,3 do C2. E em relação aos meios de cultura estudados, o meio de cultura MS teve tendência de superioridade, com número médio de brotos de 12,7 (MS), 11,6 (QL) e 8,6 (JADS) para o C1 e 5,6 (MS), 5,3 (JADS) e 4,9 (QL) para o C2 (Figura 6B). Em relação à característica hiper-hidricidade, esta apresentou diferença entre clones, tendo o C2 apresentado maior percentual de hiper-hidricidade dos explantes, quando cultivado em meio de cultura QL e JADS (Figura 6C), no entanto, para o meio MS não se notou diferença de resposta entre os dois clones avaliados.

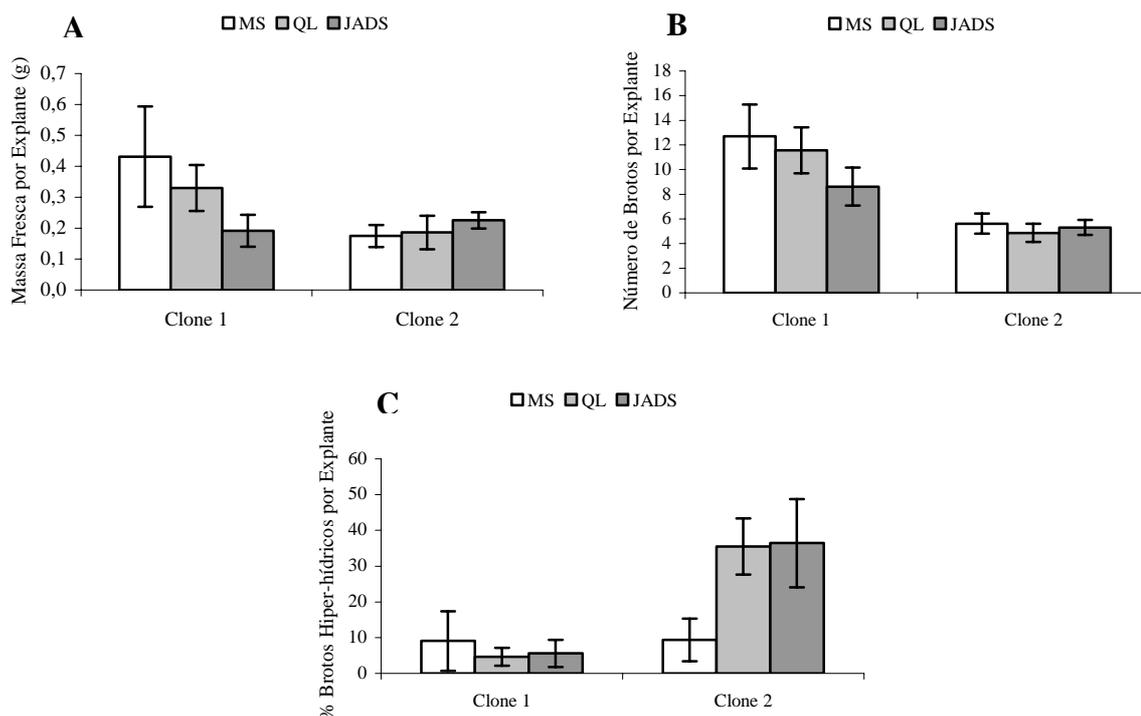


Figura 6 – Massa fresca (A), número de brotos (B) e percentual de brotos hiper-hídricos (C) por explante, para os dois clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1 e C2) e os três meios de cultura estudados, aos 21 dias de cultivo em biorreatores de imersão temporária RITA[®]. Barras verticais indicam o erro padrão da média.

3.3. Multiplicação em biorreator: Relação BAP/ANA

Houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre as combinações de BAP/ANA estudadas para todas as características avaliadas. Para massa fresca dos explantes, os tratamentos T5 (0,5/0,05), T9 (1,0/0,5) e T12 (1,5/0,5) foram semelhantes, sendo que o T9 apresentou maior média de massa fresca neste experimento (0,137 g). Os grupos de tratamentos T6 (0,5/0,5), T7 (1,0/0,0), T8 (1,0/0,05), T10 (1,5/0,0) e T11 (1,5/0,05) e, T1 (0,0/0,0), T2 (0,0/0,05), T3 (0,0/0,5) e T4 (0,5/0,0) não foram significativamente diferentes entre si, sendo que neste último grupo foram obtidas as menores médias em massa fresca (Figura 7A). Com relação ao número de brotos, a maior média também foi encontrada no T9 (4,25), no entanto, este tratamento foi estatisticamente semelhante aos tratamentos T4, T5, T6, T7, T8, T10, T11 e T12, diferindo somente de T1, T2 e T3, que apresentaram as menores médias de produtividade dos explantes, e onde a concentração de BAP foi igual a 0,0 μM . Foi observado incremento do número de brotos nos tratamentos com o aumento da concentração de BAP até 1,0 μM , já onde a concentração era de 1,5 μM , o número de brotos produzidos apresentou

ligeiro decréscimo (Figura 7B). Não foi observada hiper-hidricidade nos tratamentos onde a concentração de BAP foi 0,0 μM (T1, T2 e T3), sendo estes tratamentos semelhantes ao T4, T7, T8, T10 e T11 (Figura 7C). O maior percentual de hiper-hidricidade (42%) foi obtido no T5 e este tratamento não diferiu estatisticamente do T6, T9 e T12.

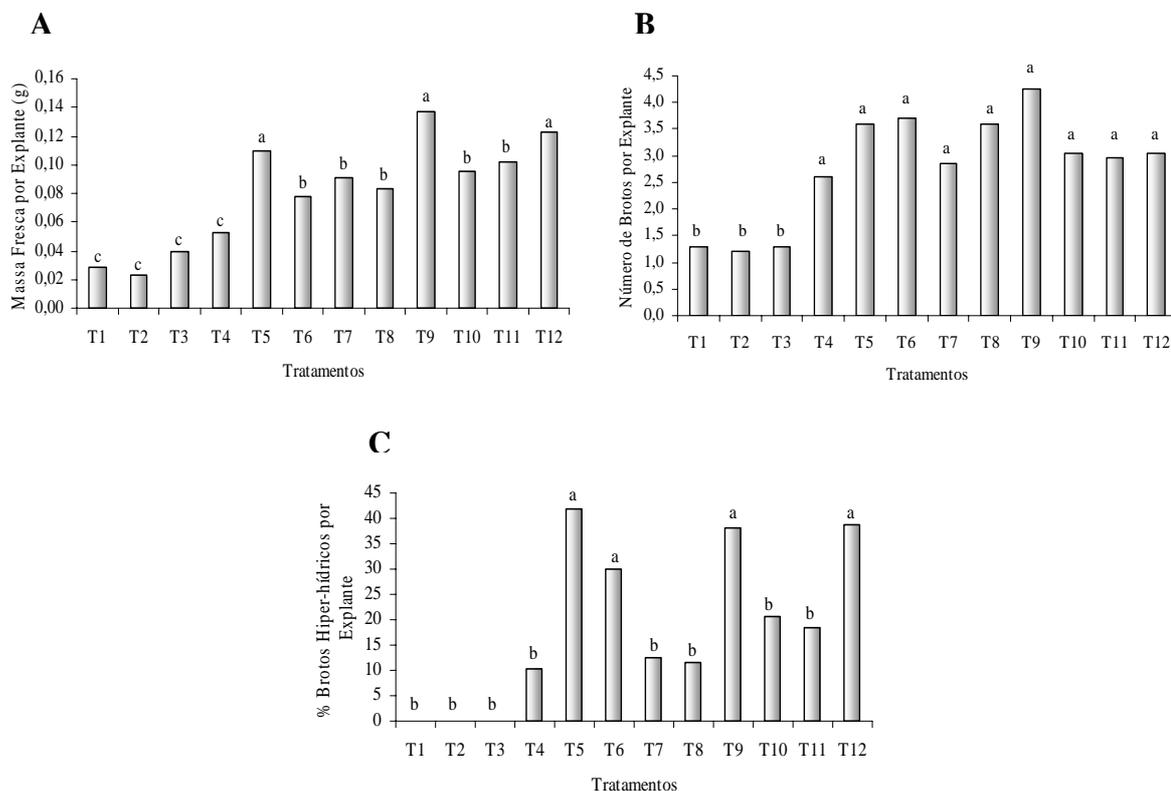


Figura 7 – Massa fresca (A), número de brotos (B) e percentual de brotos hiper-hídricos (C) por explante nas diferentes combinações de BAP/ANA (T1 = 0,0/0,0; T2 = 0,0/0,05; T3 = 0,0/0,5; T4 = 0,5/0,0; T5 = 0,5/0,05; T6 = 0,5/0,5; T7 = 1,0/0,0; T8 = 1,0/0,05; T9 = 1,0/0,5; T10 = 1,5/0,0; T11 = 1,5/0,05 e T12 = 1,5/0,5 μM de BAP/ANA) estudadas, aos 23 dias de cultivo em biorreatores de imersão temporária RITA[®] do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1). Tratamentos com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo Teste Scott-Knott.

4. DISCUSSÃO

Os biorreatores vêm surgindo como uma alternativa para viabilidade da técnica de micropropagação de diversas espécies, especialmente por eliminar e/ou automatizar algumas etapas do processo de produção. No entanto, trabalhos que tratam da avaliação de tipos e

composições de meios de cultura em meio líquido ainda são escassos, principalmente focando a tecnologia de biorreatores em espécies lenhosas, razão pela qual a discussão do presente trabalho se apoia em estudos realizados em meio semissólido.

4.1. Multiplicação em biorreator: Meios de cultura MS e WPM

Neste experimento, o meio MS apresentou melhores resultados de crescimento dos explantes, porém com maior ocorrência da hiper-hidricidade. O meio MS também se mostrou superior ao WPM, quanto ao crescimento e multiplicação das culturas, no cultivo de *Amelanchier arborea* em meio semissólido (BRAND, 1993) e de *Cabralea canjerana* (ROCHA et al., 2007).

Assim como neste trabalho, o menor vigor e a coloração diferenciada dos explantes cultivados em meio WPM também foram observados em canjerana por Rocha et al. (2007), cujas folhas apresentaram clorose. Estes resultados podem estar relacionados ao fato de o meio WPM possuir apenas 45% da força iônica total do meio MS (NUNES et al., 2002) e concentrações menores de nitrato, amônio e nitrogênio total (ROCHA et al., 2007). Em contrapartida, o meio WPM adicionado de reguladores de crescimento apresentou-se eficiente no cultivo de segmentos nodais de peroba-rosa (RIBAS et al., 2005).

As características massa fresca e número de brotos apresentaram a mesma tendência de crescimento entre os tratamentos. Nas condições estudadas, as duas características apresentaram-se relacionadas, ou seja, quanto maior a massa fresca dos explantes maior foi o número de brotos produzidos. Na micropropagação de cravo, Yadav et al. (2003) também observaram relação positiva entre massa fresca e multiplicação dos explantes.

Houve grande variação entre os explantes de um mesmo tratamento para as características avaliadas, número de brotos produzidos e massa fresca, o que explica o erro padrão da média ser elevado.

Apesar de o intervalo de imersão de 2 horas ter promovido maior ganho em biomassa fresca e em número de brotos dos explantes, a hiper-hidricidade neste manejo foi um fator limitante. Reis et al. (2003) obtiveram incremento de 8 vezes na massa fresca e 2,5 vezes no comprimento dos brotos de eucalipto cultivados por 22 dias em biorreator RITA[®], em meio MS com 0,5 µM de BAP e no manejo de 2 horas, também com alta incidência de explantes hiper-hídricos. Correia et al. (1995), também em estudos com clones de *Eucalyptus grandis* x

E. urophylla cultivados em meio JADS líquido, relataram sintomas de hiper-hidricidade após 28 dias de cultivo.

A hiper-hidricidade caracteriza-se morfológicamente por brotos alongados e espessos em diâmetro, entrenós mais curtos do que as plantas normais, e as folhas se apresentam espessadas, frequentemente alongadas, enrugadas ou enroladas e quebradiças (GASPAR, 1991; ZIV, 1991). Esta desordem tem sido relatada na maioria das vezes apenas na fase de multiplicação.

As condições do cultivo *in vitro*, como alta umidade (GASPAR, 1991), fatores nutricionais como minerais e carboidratos, altos níveis de reguladores de crescimento, baixa irradiância e elevada disponibilidade de água no meio, são as maiores indutoras de desordens fisiológicas nas plantas, como a hiper-hidricidade (MAJADA et al., 2000). Com o emprego de biorreatores, o fator disponibilidade de água é ainda ampliado pelo uso do meio líquido, o qual está associado com alta mobilidade de água e, também, com alta umidade relativa no ambiente *in vitro*, induzindo assim a presença de sintomas da hiper-hidricidade (GASPAR et al., 1987).

4.2. Multiplicação em biorreator: Meios de cultura MS, QL e JADS

O clone 1 apresentou resultados superiores para todas as características avaliadas, o que pode ser explicado pelo fato de ele ser considerado um clone de mais fácil propagação vegetativa comparativamente ao clone 2.

Esta diferença do cultivo *in vitro* entre genótipos, encontrado no presente estudo, foi também relatada por Bravo et al. (2008), na influência do genótipo na capacidade organogênica em progênies de *E. grandis*, quanto ao caráter proliferação *in vitro*. E para variações genéticas observadas entre e dentro de famílias de *E. grandis*, quanto à capacidade de formação de gemas (SOBROSA e CORDER, 2003), assim como influenciando o desenvolvimento *in vitro* de gemas de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (CORREIA et al., 1995).

A resposta ao tipo e composição do meio de cultura varia não somente de acordo com a espécie, mas entre genótipos de uma mesma espécie e até entre explantes de um mesmo genótipo, que apresentam demandas específicas (SOUZA et al., 2006). Correia et al. (1995) verificaram a importância da especificidade do meio de cultura para cada material genético, quando se deseja a proliferação de gemas com uniformidade e vigor. Além disso, fatores

ambientais como a aeração do meio de cultura e controle de seu fluxo, a qualidade e intensidade da luz e o fotoperíodo podem influenciar o crescimento e desenvolvimento dos explantes, assim como a idade ontogenética e o estado de maturação da cultura. Dessa maneira, fica clara a necessidade de ajuste do protocolo de micropropagação, de acordo com o material genético de interesse.

Ao contrário do que foi observado neste trabalho, em que o meio MS apresentou tendência de crescimento superior em relação aos demais meios estudados, Glocke et al. (2006) observaram crescimento mais vigoroso dos brotos em meio WPM e QL na micropropagação de material juvenil de *Eucalyptus erythronema* x *E. stricklandii*, em comparação com outros meios, como o MS. Já Borges (2009) avaliou a diferença entre os meios MS e JADS na multiplicação de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* e encontrou tendência de melhores resultados para o meio MS, observando também que este meio produziu brotações mais alongadas e com folhas maiores. No entanto, apesar da tendência de superioridade do meio MS, o meio JADS apresentou resultados positivos na multiplicação destes clones. O autor também observou ocorrência de hiper-hidricidade em poucos explantes no meio MS, o que não foi observado para o meio JADS.

4.3. Multiplicação em biorreator: Relação BAP/ANA

O incremento em produtividade, tanto em massa fresca como em número de brotos, foi considerado baixo neste experimento em comparação com os demais ensaios anteriores, podendo ser explicado pelo curto período de cultivo e pelo tamanho inicial dos explantes, que apresentavam em média 0,007 g de massa fresca.

A combinação 1,0/0,5 μM de BAP/ANA (T9) foi a que apresentou maiores médias em massa fresca e número de brotos. A massa fresca e o número de brotos por explantes tenderam a aumentar com crescentes concentrações de BAP e depois a diminuir nas concentrações mais elevadas deste regulador. Graça et al. (2001) observaram maior proliferação de brotos de *E. dunnii* na concentração de 1 μM de BAP, apresentando relação inversa entre o número de brotações e a concentração de BAP. Este mesmo comportamento foi relatado por Andrade et al. (2006) na multiplicação de *E. grandis* sob estímulo de BAP, observando que concentrações elevadas desta citocinina promovem ação inibitória na multiplicação de *Eucalyptus*. Muitos autores relatam este comportamento em espécies de

eucalipto (DEL PONTE et al., 2001; BRONDANI, 2008). O efeito da concentração dos reguladores de crescimento varia de acordo com a espécie (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Em termos gerais, este experimento apresentou baixo percentual de hiper-hidricidade dos explantes, variando de 0 a 41,9%, em comparação com o estudo discutido no item 4.1, que utilizou o mesmo tipo de explante inicial e atingiu valores próximos a 100 % de hiper-hidricidade. Esta diferença também pode ser explicada pelo curto período de cultivo, pois foi observado no decorrer destes estudos que a hiper-hidricidade, assim como o ganho em biomassa fresca e a produtividade, foram mais intensos a partir do 20º dia de cultivo.

A heterogeneidade no desenvolvimento dos explantes, em todas as características avaliadas, foi alta. O mesmo foi observado por Correia et al. (1995), que encontraram grande variação na multiplicação de gemas entre os explantes, dentro e entre clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, cultivados em meio de cultura líquido e sólido. A fonte de variação no crescimento *in vitro* entre os explantes pode estar relacionada com o tamanho e às características morfológicas do explante, como número de pares de folhas e diâmetro do caule, além da idade cronológica, fisiológica e ontogenética da cultura.

5. CONCLUSÕES

O meio de cultura MS e a frequência de imersão a cada duas horas foram os tratamentos que promoveram melhor resposta de crescimento em relação à massa fresca e produtividade dos explantes dos clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.

O clone C1 foi superior ao clone C2 para as características de crescimento avaliadas.

A combinação 1,0 µM de BAP com 0,5 µM de ANA foi a que apresentou maiores médias em relação à massa fresca e número de brotos.

De modo geral, as culturas apresentaram alto percentual de hiper-hidricidade, sendo esta desordem ainda um fator limitante nas condições deste estudo para a micropropagação em biorreator de imersão temporária de clones de *Eucalyptus*.

6. REFERÊNCIAS

- AITKEN-CHRISTIE, J.; SINGH, A. P.; DAVIES, H. Multiplication of meristematic tissue: a new tissue culture system for radiata pine. In: HANOVER, J. W.; KEATHLEY, D. E. **Genetic manipulation of wood plants**. New York: Plenum, 1988. p. 413-432.
- ANDRADE, W. F.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, A. N. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 12, p. 1715-1719, 2006.
- BORGES, S. R. **Micropropagação e enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus***. 2009. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- BRAND, M. H. Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 35, p. 203-209, 1993.
- BRAVO, C. D. V.; GONÇALVES, A. N.; DIAS, C. T. S.; VENCOSKY, R. Controle genético da regeneração *in vitro* em progênies de *Eucalyptus grandis*. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2181-2185, 2008.
- BRONDANI, G. E. **Miniestaquia e micropropagação de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 2008. 118 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- CASTRO, D. R.; GONZÁLEZ, O. J. Micropropagación de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) en el sistema de inmersión temporal. **Agricultura Técnica**, v. 62, p. 68-78, 2002.
- CORREIA, D. **Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de *Eucalyptus* spp. *in vitro* em meio de cultura líquido e sólido**. 1993. 113 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- CORREIA, D.; GONÇALVES, A. N.; COUTO, H. T. Z. do; RIBEIRO, M. C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **IPEF**, n. 48/49, p.107-116, 1995.
- DEL PONTE, E. M.; MATTEI, V. L.; PETERS, J. A. ASSIS, T. F. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus globulus* subsp. *globulus* Labill. **Revista Árvore**, v. 25, n. 1, p. 1-8, 2001.
- ETIENNE, H.; DECHAMP, E.; BARRY-ETIENNE, D.; BERTRAND, B. Bioreactors in coffee micropropagation. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 45-54, 2006.
- ETIENNE, H.; LARTAUD, M.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; CARRON, M. P.; BERTHOULY, M.; TEISSON, C. Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* using the temporary immersion technique. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 33, p. 81-87, 1997.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; DEBERGH, P.; MAENE, L.; PAQUES, M.; BOXUS, P. Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects. In: BONGA, J. M. e DURZAN, D. J. (Eds.). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. v. 1, p. 152-166.

GASPAR, T. Vitrification in micropropagation. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry – High-tech and micropropagation I**. Berlin: Springer, 1991. v. 17, p. 116-126.

GLOCKE, P.; DELAPORTE, K.; COLLINS, G.; SEDGLEY, M. Micropropagation of juvenile tissue of *Eucalyptus erythronema* x *Eucalyptus stricklandii* cv. 'Urrbrae Gem'. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 42, p. 139-143, 2006.

GRAÇA, M. E. C.; KALIL FILHO, A. N.; MEDEIROS, A. C. de S.; TAVARES, F. R. Efeitos das citocininas benzilamino purina e thidiazuron, na multiplicação "in vitro" de brotações de *Eucalyptus dunnii* Maid. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n.43, p. 107-112, 2001.

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-CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.

GUPTA, P. K.; TIMMIS, R. Mass propagation of conifer trees in liquid cultures-progress towards commercialization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 339-346, 2005.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society**, v. 30, p. 421-426, 1980.

MAJADA, J. P.; TADEO, F.; FAL, M.A.; SÁNCHEZ-TAMÉS, R. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 63, p. 207-214, 2000.

McALISTER, B.; FINNIE, J.; WATT, M. P.; BLAKEWAY, F. Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forest (SA). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 347-358, 2005.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NUNES, E. da C.; CASTILHO, C. V. de; MORENO, F. N.; VIANA, A. M. *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 70, p. 259-268, 2002.

QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Improved medium for *in vitro* culture of *Prunus* sp. **Acta Horticulturae**, v. 78, p. 437-442, 1977.

REIS, J. P.; MORAIS, P. B.; PENCHEL, R.; HENRIQUE, A. Micropropagação de eucalipto no sistema de imersão temporária. In: Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 1., 2003, Lavras. **Anais...** p. 276.

RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M. P. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Árvore**, v. 29, n. 4, p. 517-524, 2005.

ROCHA, S. C. da; QUORIM, M.; RIBAS, L. L. F.; KOEHLER, H. S. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. **Revista Árvore**, v. 31, n. 1, p. 43-50, 2007.

SANTOS-SEREJO, J. A.; JUNGHANS, T. G.; SOARES, T. L.; SILVA, K. M. da. Meios nutritivos para micropropagação de plantas. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. (Org.). **Introdução à micropropagação de plantas**. 1 ed. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006, p. 79-98.

SOBROSA, R. C.; CORDER, M. P. M. Efeito do genótipo sobre o potencial para produção de gemas e raízes adventícias em *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden *in vitro*. **Floresta e Ambiente**, v. 10, n. 1, p. 58-68, 2003

SOUZA, F. V. D.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S.; SANTOS-SEREJO, J. A. dos; COSTA, M. A. P. de C. Micropropagação. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. (Org.). **Introdução à micropropagação de plantas**. 1 ed. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006, v. , p. 38-52.

YADAV, M. K.; GAUR, A. K.; GARG, G. K. Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, p. 153-156, 2003.

ZIV, M. The control of biorreactor environment for plant propagation in liquid culture. **Acta Horticulturae**, v. 393, p. 25-38, 1995.

ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Eds.). **Micropropagation, Technology and Application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 45-69.

INFLUÊNCIA DA RELAÇÃO $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$ NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* EM BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo avaliar diferentes relações entre as fontes de nitrogênio nítrico e amoniacal no meio de cultura MS, na fase de multiplicação de um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em biorreator de imersão temporária RITA[®], e também comparar o cultivo em ágar (potes plásticos) e em meio líquido (biorreatores RITA[®]) para duas relações de $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$ (2:1 e 3:1) em três diferentes períodos de cultivo (21, 28 e 35 dias). Na primeira etapa do experimento, a relação 3:1 de $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$ proporcionou maiores médias de massa fresca e número de brotos por explante. O aumento da concentração de amônio no meio de cultura (relações 1:1, 1:2 e 1:3 de $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$) levou a um menor vigor dos explantes, que apresentaram folhas com coloração verde clara avermelhada. Na segunda fase, não se observou diferença entre as duas relações estudadas, sendo o cultivo em biorreator RITA[®] superior ao ágar em todas as características de crescimento avaliadas e nos três períodos de cultivo estudados. O período de 35 dias de cultivo em biorreator RITA[®] foi o que promoveu maior ganho, de 2,3 vezes, tanto em massa fresca, quanto em número de brotos por explantes em comparação ao cultivo em ágar nas duas relações estudadas. A hiper-hidricidade foi fator limitante nas duas etapas deste estudo para as plantas cultivadas em biorreatores, não sendo percebida nas plantas cultivadas em meio semissólido.

Palavras-chave: Propagação *in vitro*, culturas líquidas, fontes de nitrogênio

1. INTRODUÇÃO

A micropropagação e o uso de biorreatores têm sido consideradas ferramentas potencialmente importantes para a produção em larga escala de mudas de genótipos superiores a preços competitivos. Segundo Takayama e Akita (2006), a tecnologia de biorreatores é vantajosa por promover eficiência e facilidade das operações, e surge como o sistema mais promissor para propagação industrial de plantas.

O uso de biorreatores na propagação vegetativa de plantas lenhosas ainda se restringe a um pequeno número de trabalhos e espécies, porém o interesse de empresas e pesquisadores

do setor têm intensificado a busca por novos protocolos que tornem esta tecnologia viável a espécies florestais de larga produção como o eucalipto. Diversos são os fatores que influenciam a micropropagação em biorreatores, entre eles, podem-se citar o uso do meio líquido, o tipo e a aeração do recipiente, a atmosfera gasosa do frasco de cultivo e principalmente as condições de manejo da cultura como a composição mineral e orgânica do meio, reguladores de crescimento (ZIV, 2005) e recalcitrância do material vegetal. Os biorreatores de imersão temporária, como o sistema RITA[®], ganharam popularidade principalmente pela simplicidade e elevada taxa de produção com a mínima ocorrência de desordens fisiológicas em comparação com outros tipos de biorreatores (AFREEN, 2006).

O efeito dos nutrientes na morfogênese é de suma importância, pois a parte mineral é a maior componente dos meios de cultura de tecidos e se baseia nas exigências das plantas. A fonte de nitrogênio é um fator que influencia o comportamento das culturas, e alguns estudos têm revelado diferenças no desenvolvimento das plantas em função da dosagem e das fontes nitrogenadas (BRAND, 1993; MARQUES et al., 1998; IVANOVA E VAN STADEN, 2008; 2009).

Os íons nitrato e amônio aparecem relacionados com diversos fatores do cultivo *in vitro*, em características de crescimento da cultura, como a diferenciação de células e tecidos, e desordens fisiológicas como a hiper-hidricidade. No cultivo de *Eucalyptus grandis* em biorreatores de imersão temporária, Castro e Gonzáles (2002) obtiveram melhor taxa de multiplicação de brotos axilares, reduzindo à metade as concentrações de nitrato de amônio e nitrato de potássio do meio básico MS. Segundo Ziv et al. (1987), a redução ou remoção do nitrato de amônio no meio MS aumentou a proporção de plantas normais (sem sintomas de hiper-hidricidade) de cravo (*Dianthus caryophyllus*), tanto no cultivo em meio líquido, quanto em ágar.

A cultura de tecidos convencional via sistema ágar requer grande número de pequenos recipientes de cultivo e mão-de-obra intensiva, necessitando de ampla estrutura de câmaras de fluxo laminar, autoclave e sala de cultura, sendo estas as maiores limitações da eficiência na propagação e do alto custo da técnica. Dentro deste contexto, os biorreatores podem reduzir a mão-de-obra, alcançando baixo custo de produção e estabelecendo um sistema prático para propagação massal de plantas *in vitro* (TAKAYAMA e AKITA, 2006).

O uso de biorreatores tem aumentado a produtividade e a eficiência da propagação de plantas, principalmente pelas vantagens do meio líquido. Estas vantagens devem-se ao aumento da produtividade pelo maior contato da cultura com o meio; manuseio mais simples da cultura, economia de mão-de-obra e tempo das operações; aeração forçada, que estimula o

crescimento e a obtenção de maior biomassa; e agitação da cultura no biorreator, que resulta na perda de dominância apical e proporciona o crescimento de maior número de brotações (TAKAYAMA & AKITA, 1994; 2006).

As condições de cultivo em biorreatores são diferentes do cultivo em ágar, tornando necessário encontrar as condições ótimas de cultura em meio líquido (TAKAYAMA e AKITA, 2006). Assim, este trabalho consistiu na avaliação de diferentes relações entre as fontes de nitrogênio nítrico e amoniacal na fase de multiplicação de um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em biorreator de imersão temporária RITA[®] e na comparação entre o cultivo em ágar e em biorreator RITA[®] para duas relações de N(NO₃⁻):N(NH₄⁺) e três períodos de cultivo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Fonte, meio de cultura e condições de cultivo dos explantes

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Pesquisa e Tecnologia - CPT da empresa Fibria (antiga Aracruz Celulose S/A), localizada no município de Aracruz, Espírito Santo.

O material vegetal utilizado para introdução nos biorreatores foi um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1), proveniente da empresa Fibria, pré-estabelecido *in vitro* em meio de cultura semissólido, tendo como recipientes de cultivo placas de Petri estéreis e descartáveis (Pleion Bioplasm[®]) de 90 mm de diâmetro x 15 mm de altura. Estas continham 25 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), adicionado de 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma[®]), 10 mg L⁻¹ de tiamina-HCl (Sigma[®]), 0,50 mg L⁻¹ de ácido nicotínico (Sigma[®]), 0,50 mg L⁻¹ de piridoxina-HCl (Sigma[®]), 100 mg L⁻¹ de L-glutamina (Sigma[®]), 0,34 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina – Sigma[®]), 0,01 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético – Sigma[®]), 30 g L⁻¹ de sacarose (Vetec[®]) e 7 g L⁻¹ de bacto-ágar (BD[®]). O pH foi ajustado para 5,8 com KOH (1N) e HCl (1N) antes da adição do ágar e da esterilização em autoclave a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121°C por 15 minutos. O material vegetal foi estabelecido em prateleiras de metal aramado com iluminação vertical e lateral, acondicionado em sala de cultura a 24 ± 2°C, fotoperíodo de 14 horas e irradiância média de 20 μmol m⁻² s⁻¹, medida no aparelho Optic Science - Modelo DQM.

2.2. Relações N(NO₃⁻):N(NH₄⁺)

Foram avaliadas cinco diferentes relações - 1:1, 2:1, 3:1, 1:2 e 1:3 - entre as fontes de nitrogênio NO₃⁻ e NH₄⁺ (Quadro 1) no meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), na fase multiplicação de gemas axilares em biorreator RITA[®] (Vitropic S/A). Estas relações foram obtidas pela adição de diferentes sais sem modificar a concentração dos outros íons no meio de cultura.

Quadro 1 - Concentração dos íons N(NO₃⁻), N(NH₄⁺) e de N total (mmol L⁻¹) nas cinco relações N(NO₃⁻):N(NH₄⁺) estudadas no meio de cultura MS para cultivo do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1), em biorreatores de imersão temporária RITA[®].

Íons	Relação N(NO ₃ ⁻):N(NH ₄ ⁺)				
	3:1	2:1	1:1	1:2	1:3
N(NO ₃ ⁻)	43,90	39,00	29,30	19,50	14,60
N(NH ₄ ⁺)	14,60	19,50	29,30	39,20	43,90
N total	58,50	58,50	58,60	58,70	58,50

Como explantes iniciais, foram utilizados brotos apicais, com massa fresca e tamanho uniformes, de um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1) (Figura 1), estabelecidos *in vitro*, pré-cultivados, aproximadamente sete dias antes de sua utilização nos biorreatores RITA[®] para experimentação, permanecendo em placas de Petri contendo meio MS como descrito no item 2.1, sem adição de reguladores de crescimento.

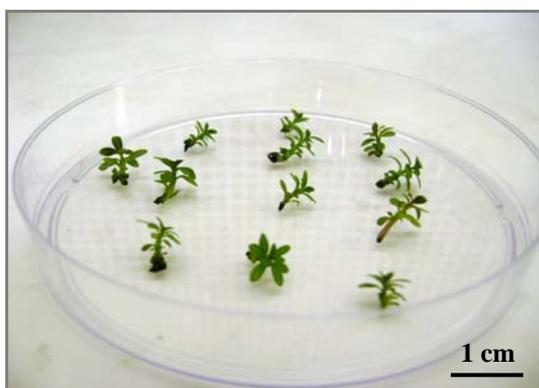


Figura 1 – Brotos apicais do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1) utilizados como explantes iniciais no cultivo em biorreatores de imersão temporária RITA[®].

Ao meio de cultura, foram adicionados 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 10 mg L⁻¹ de tiamina-HCl, 0,50 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 0,50 mg L⁻¹ de piridoxina-HCl, 0,11 mg L⁻¹ de BAP e 30 g L⁻¹ de sacarose, com pH ajustado para 5,8 com KOH (1N) e HCl (1N), antes da esterilização em autoclave a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121°C por 15 minutos. O meio de cultura foi autoclavado diretamente dentro dos recipientes dos biorreatores. Após introdução nos biorreatores, o material vegetal foi acondicionado em sala de cultura a 24 ± 2°C, fotoperíodo de 14 h e irradiância média de 20 μmol m⁻² s⁻¹. Utilizou-se o volume de 250 mL de meio por recipiente e foi realizada renovação total do meio de cultura dos frascos aos 28 dias de idade da cultura.

A frequência de imersão utilizada foi de duas horas por um período de oito segundos e como suporte de apoio para os explantes utilizou-se disco de esponja polimérica (Bulpren S 28133, densidade 30 Kg m⁻³) sob papel filtro qualitativo (Nº 1 - Qualy®).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (relações 1:1, 2:1, 3:1, 1:2 e 1:3 de N(NO₃⁻):N(NH₄⁺)) e vinte e quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por um explante, e cada recipiente RITA® contendo doze explantes.

Para avaliação da massa fresca, foi realizada a pesagem dos explantes aos 0, 21, 28, 35 e 42 dias de idade da cultura. O número de brotos foi obtido pela contagem de novos brotos, com dois ou mais pares de folhas, desenvolvidos durante o ciclo de cultivo, em todos os explantes aos 0, 21 e 28 dias de idade da cultura. O percentual de hiper-hidricidade foi obtido por meio de análise visual do explante, com a contagem do número de brotos hiper-hídricos em cada explante aos 0, 21 e 28 dias de idade da cultura.

2.3. Consumo de nutrientes pela cultura

A avaliação do consumo dos nutrientes foi realizada através da análise química do meio aos 0, 21, 28, 35 e 42 dias de idade da cultura, a partir da retirada de alíquotas de 2,5 mL de cada repetição, constituindo-se em amostras compostas por tratamento. As amostras foram analisadas no Laboratório de Análises Químicas, do Centro de Pesquisa e Tecnologia da Fibria, sendo a análise de macro e micronutrientes realizada em espectrômetro de plasma modelo ICP Optima 4300 DV (Perkin – Elmer), a de nitrato em cromatógrafo de íons modelo DX 120 (Dionex) e a de amônio em cromatógrafo de íons modelo ICS 90 (Dionex).

2.4. Cultivo em ágar x meio líquido

Com base na experimentação anterior, foram testadas duas das relações de $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$, escolhidas por apresentarem melhores resultados de produtividade e qualidade dos explantes, sendo elas 2:1 e 3:1 de $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$. O manejo vegetal e as condições da cultura foram as mesmas utilizadas no item 2.2, acrescentando-se as condições de cultivo em ágar, realizado em potes plásticos de polipropileno de volume 500 mL (Osmotec[®]), contendo 100 mL de meio de cultura solidificado com 7 g L⁻¹ de bacto-ágar (BD[®]). E sendo realizada renovação do meio de cultura a cada sete dias.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis tratamentos, duas relações de $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$ (2:1 e 3:1) e três idades de cultivo (28, 35 e 42 dias), com vinte repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por um explante, e cada recipiente, RITA[®] e pote plástico, contendo dez explantes.

As avaliações de massa fresca, número de brotos e percentual de hiper-hidricidade dos explantes foram realizadas da mesma forma que no experimento anterior, sendo avaliados ao final de cada período de cultivo estudado (28, 35 e 42 dias).

3. RESULTADOS

3.1. Relações $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$

A característica massa fresca apresentou diferença significativa entre as equações ajustadas ($P < 0,05$), sendo observado comportamento exponencial ao longo do período de cultivo em todos os tratamentos, com uma grande aceleração no crescimento a partir do 25º dia (Figura 2). Usando o teste de identidade de modelos, observou-se que os tratamentos que apresentaram maior massa fresca dos explantes - 3:1, 1:1 e 1:2 de $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$ - não foram estatisticamente diferentes ($P < 0,05$) entre si. O tratamento 2:1 de $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$, que é o mais próximo da concentração destes íons no meio MS original, ficou em posição intermediária sendo semelhante ($P < 0,05$) somente ao tratamento 1:2 de $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$. A relação 1:3 de $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$ proporcionou menor biomassa dos explantes.

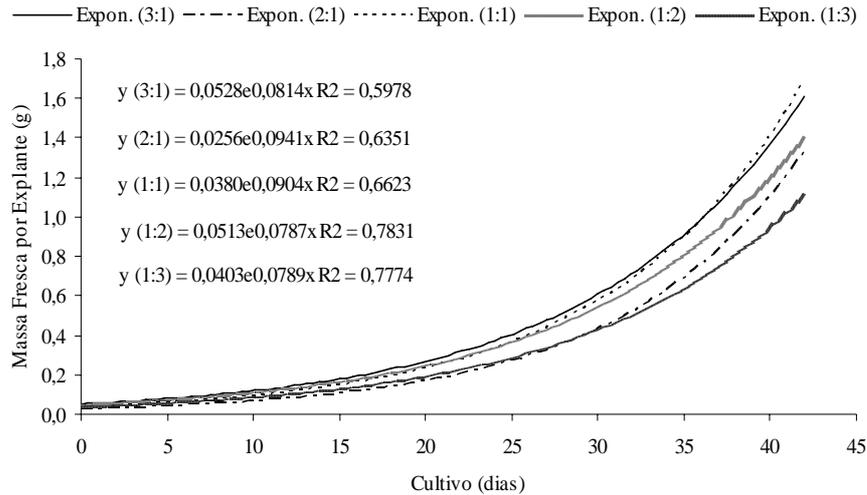


Figura 2 – Curvas de tendências de massa fresca dos explante para as cinco relações $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$ estudadas (3:1, 2:1, 1:1, 1:2 e 1:3) durante o período de 42 dias de cultivo do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1) em biorreatores de imersão temporária RITA[®].

O número de brotos apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos nas duas idades avaliadas. Aos 21 dias de idade da cultura, o número médio de brotos produzidos diminuiu de acordo com o aumento da concentração de $N(NH_4^+)$ no meio, sendo o tratamento que apresentou maior média de brotos o 3:1 (7,08a), seguido do 2:1 (4,95ab), 1:1 (4,91ab), 1:2 (4,87ab) e 1:3 (4,16b) de $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$. Na segunda idade de avaliação, a relação 3:1 (13,08a) manteve-se superior, seguida pela 1:2 (12,25a), 1:1 (11,04ab), 2:1 (10,37ab) e 1:3 (8,70b) de $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$ (Figura 3A). Para percentual de hiper-hidricidade, não foi observada diferença estatística ($P < 0,05$) entre os tratamentos aos 21 dias de idade, com média geral dos tratamentos de 43% de hiper-hidricidade por explante. Aos 28 dias, os tratamentos foram estatisticamente diferentes ($P < 0,05$), sendo que o único tratamento que se apresentou diferente dos demais foi o 2:1 de $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$ com menor percentual de hiper-hidricidade (68%). Constatou-se que com a redução do NO_3^- e quanto maior a concentração de NH_4^+ no meio, maior foi o percentual de hiper-hidricidade, chegando a 100% nas relações 1:2 e 1:3 de $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$ (Figura 3B).

Com o aumento da concentração de $N(NH_4^+)$ no meio de cultura, os explantes apresentaram-se menos vigorosos, com folhas de coloração verde clara avermelhada (Figuras 4 e 5).

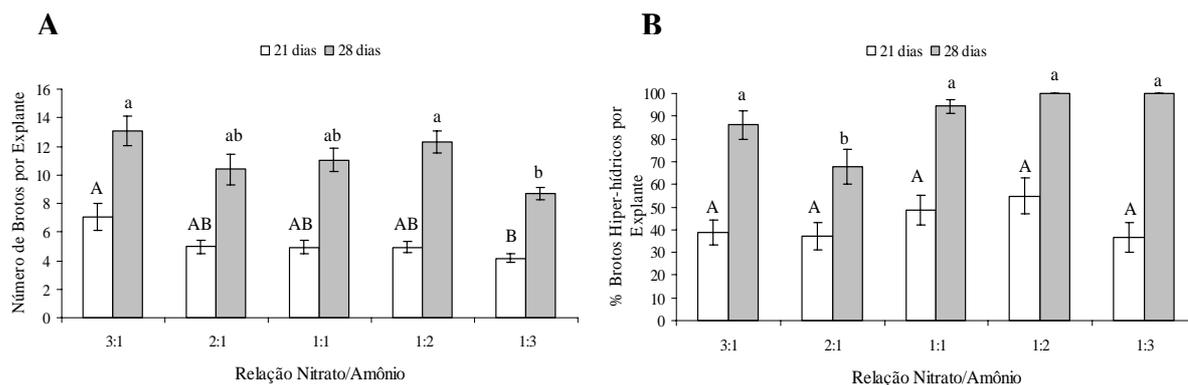


Figura 3 – Número de brotos (A) e percentual de brotos hiper-hídricos (B) por explante, nas cinco relações $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$ estudadas (3:1, 2:1, 1:1, 1:2 e 1:3), aos 21 e 28 dias de cultivo do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1) em biorreatores de imersão temporária RITA[®]. Barras verticais indicam o erro padrão da média. Letras maiúsculas indicam comparação de médias aos 21 dias e letras minúsculas aos 28 dias. Tratamentos com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo Teste Tukey.

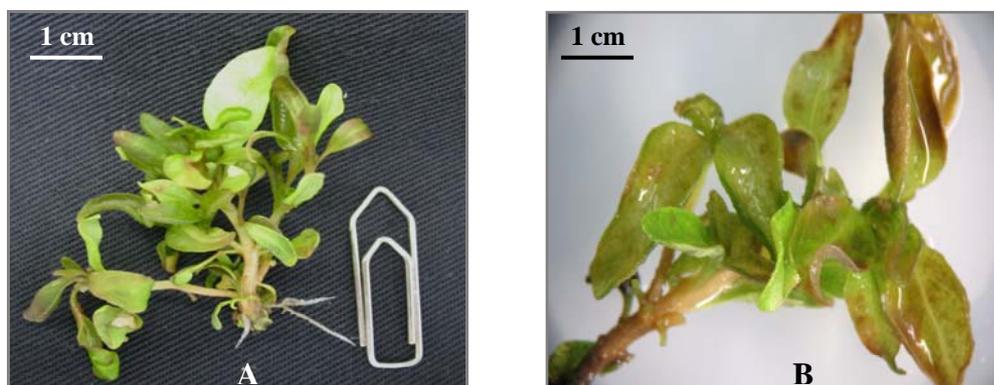


Figura 4 – Tufo de multibrotações do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1), aos 42 dias de cultivo em biorreator de imersão temporária RITA[®], em meio MS e com a relação de 1:3 de $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$ (A) e detalhe da coloração verde clara avermelhada das folhas (B).

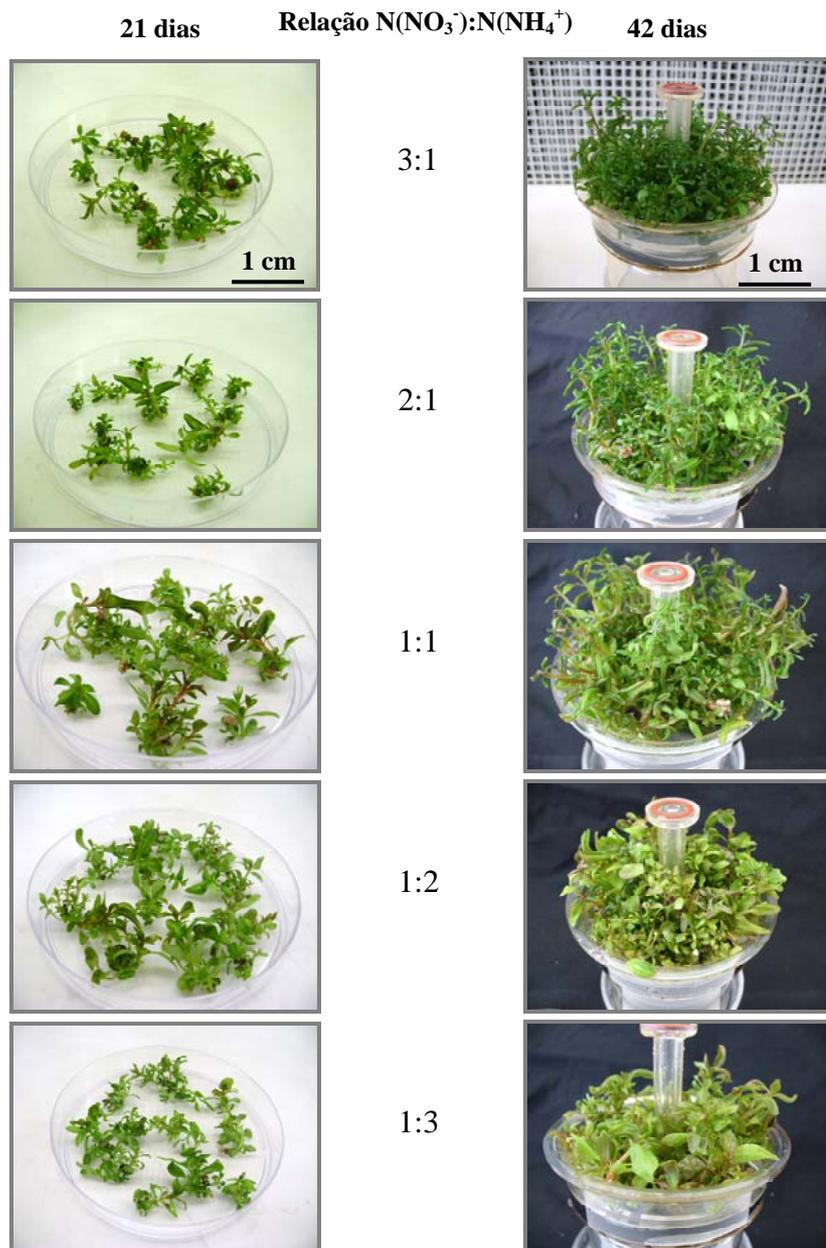


Figura 5 - Padrão de brotos produzidos nas cinco relações $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$ estudadas (3:1, 2:1, 1:1, 1:2 e 1:3) aos 21 e 42 dias de cultivo em biorreator de imersão temporária RITA[®] do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1).

3.2. Consumo de nutrientes pela cultura

O consumo total de $N(NO_3^-)$ ao final dos 42 dias de cultivo foi maior nos tratamentos em que a dosagem deste íon era maior, decrescendo à medida que se aumentou a concentração de $N(NH_4^+)$. No consumo de $N(NH_4^+)$, os tratamentos com maior concentração

deste íon apresentaram consumo superior, sendo a relação 1:2 o tratamento com o maior consumo, seguida pelo 1:3 de $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$, e o menor consumo foi observado na relação 2:1 de $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$. O consumo total de N foi maior na relação 1:2 e menor em 1:3 de $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$ (Quadro 2).

O potássio foi o macronutriente mais consumido pela cultura, sendo este consumo superior nas relações com maior concentração de $N(NO_3^-)$, seguido pelos tratamentos com maior concentração de $N(NH_4^+)$, e o menor consumo foi observado na relação 1:1 de $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$. A mesma resposta foi constatada para o cálcio e magnésio. Somente o fósforo foi consumido em maior quantidade nos tratamentos em que a concentração de $N(NH_4^+)$ era maior ou igual à do $N(NO_3^-)$ (Quadro 2).

Dentre os micronutrientes, o manganês e o boro seguiram a mesma resposta relatada acima para a maioria dos macronutrientes. Já os consumos de ferro e molibdênio foram semelhantes ao de fósforo, quanto à resposta. O consumo de zinco pelas plantas não manteve um padrão, sendo maior na relação 3:1 e menor na 2:1 de $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$ (Quadro 2).

Quadro 2 – Conteúdo total de nutrientes acumulado nas plântulas do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1), durante 42 dias de cultivo, por recipiente do biorreator de imersão temporária RITA[®].

Nutriente	Conteúdo Total de Nutrientes Acumulado (mg/recipiente)				
	----- Relação $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$ -----				
	3:1	2:1	1:1	1:2	1:3
Macronutrientes					
N(NO₃⁻)	69,40	59,46	53,81	50,27	37,36
N(NH₄⁺)	43,07	41,90	53,21	70,36	59,40
N total	112,47	101,37	107,02	120,63	96,75
P	6,742	5,868	7,038	7,849	6,760
K	120,183	84,210	66,249	76,396	82,439
Ca	11,774	7,794	6,426	6,752	7,593
Mg	6,116	2,959	2,336	2,490	2,859
Micronutrientes					
Fe	0,801	0,630	1,012	1,101	0,706
Zn	0,326	0,172	0,196	0,219	0,216
Mn	0,703	0,386	0,274	0,314	0,355
B	0,090	0,069	0,065	0,078	0,064
Mo	0,018	0,016	0,018	0,026	0,024

3.3. Cultivo em ágar x meio líquido

O cultivo em biorreator RITA[®] foi superior ao ágar em todas as características avaliadas, nas duas relações $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$ e nos três períodos de cultivo estudados. O período de 35 dias de cultivo em biorreator RITA[®] foi o que promoveu maior ganho, de 2,3 vezes, tanto em massa fresca, quanto em número de brotos formados por explante, em comparação com o cultivo em ágar nas duas relações estudadas (Figura 6).

A hiper-hidricidade foi um fator limitante para as plantas cultivadas em biorreatores, alcançando taxas muito elevadas, próximas a 100%, em todos os períodos de cultivo estudados, no entanto, não foi percebida esta desordem fisiológica nas plantas cultivadas em meio semissólido.

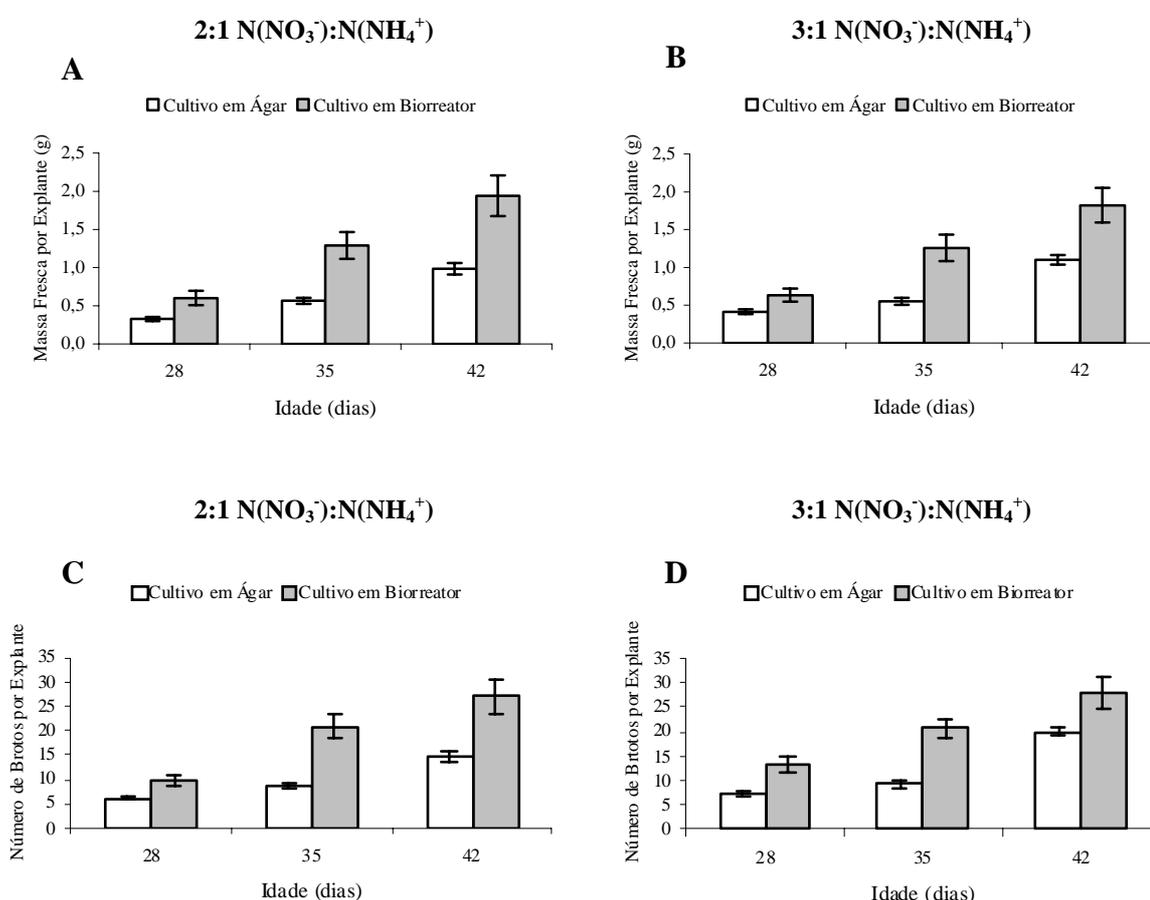


Figura 6 – Massa fresca por explante na relação 2:1 de $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$ (A) e na relação 3:1 de $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$ (B), número de brotos por explante na relação 2:1 de $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$ (C) e na relação 3:1 de $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$ (D), aos 28, 35 e 42 dias de cultivo do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1) em ágar e em biorreatores de imersão temporária RITA[®]. Barras verticais indicam o erro padrão da média.

Além da diferença no desenvolvimento dos explantes, também foi observada diferença no padrão de brotos produzidos. O sistema de cultivo em ágar formou tufo de multibrotações não-alongadas, enquanto o cultivo em biorreator produziu tufo com brotos alongados mais bem definidos (Figura 7).

4. DISCUSSÃO

4.1. Relações $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$

As relações 3:1 e 1:1 de $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$ promoveram o maior crescimento em massa fresca e número de brotos por explante, onde as altas concentrações de $N(NH_4^+)$ proporcionaram aspecto visual com menor vigor dos explantes e maior ocorrência de hiper-hidricidade. Ivanova e Van Staden (2009) obtiveram maior taxa de multiplicação de *Aloe polyphylla* em meio de cultura MS contendo ambos NO_3^- e NH_4^+ como fontes nitrogenadas, aumentando com o aumento de N total, e observaram melhor formação de brotos nos meios com presença relativamente semelhante entre NO_3^- e NH_4^+ , com relações de 20:40, 30:30 e 40:20 de $NO_3^-:NH_4^+$.

Com relação ao aspecto visual e vigor dos brotos formados, outros autores também perceberam inferioridade na qualidade dos brotos, estes apresentando coloração amarelada ou verde pálido, atrofiados e frágeis (IVANOVA e VAN STADEN, 2008; 2009), com o aumento de NH_4^+ no meio de cultura.

Segundo alguns autores, a fonte de nitrogênio utilizada e o balanço entre os íons NO_3^- e NH_4^+ podem interferir na taxa de multiplicação das plantas (SANTOS-SEREJO et al., 2006). Castro e González (2002) obtiveram melhor multiplicação dos brotos de eucalipto em meio de cultura MS com as concentrações de nitrato de amônio e nitrato de potássio à metade de suas forças.

Segundo Ziv (1995b), as plantas cultivadas em meio líquido têm preferência pela utilização de NH_4^+ e somente em um estágio posterior passam a utilizar o NO_3^- . O elevado nível de nitrogênio na forma de NH_4^+ mostrou causar hiper-hidricidade e hipo-lignificação em algumas espécies (ZIV, 1995a, HARTMANN et al., 2002). Este mesmo fato foi observado por Ivanova e Van Staden (2009) quando somente NH_4^+ foi utilizado como fonte de N, elevando o índice de hiper-hidricidade. No entanto, Ivanova e Van Staden (2008) observaram que altas concentrações de NH_4^+ na ausência de citocininas não induziram a hiper-hidricidade

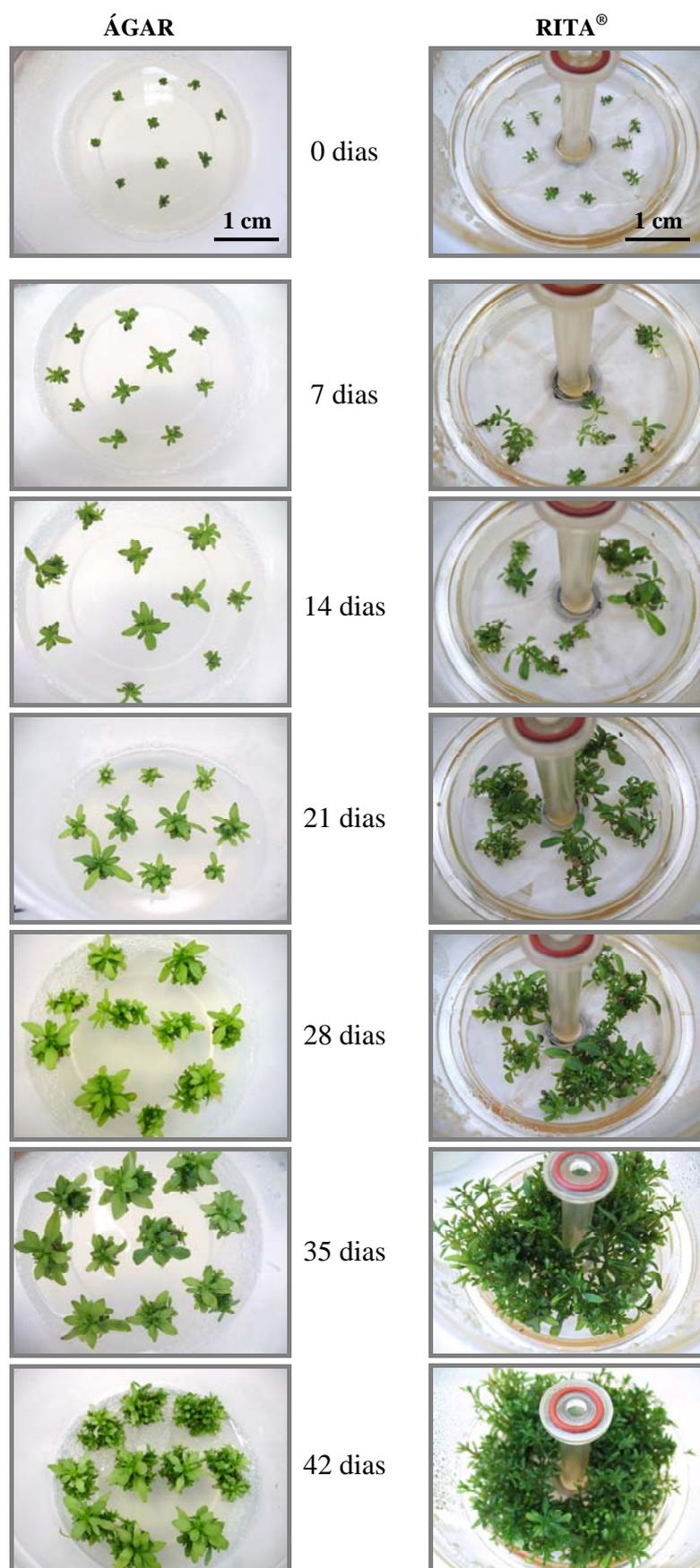


Figura 7 - Padrão de brotos produzidos na relação 2:1 de $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$, nos dois sistemas de cultivo, ágar e biorreator RITA[®], aos 0, 7, 14, 21, 35 e 42 dias de cultivo do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1).

em *Aloe polyphylla*, sendo esta desordem induzida de maneira dependente da concentração de citocininas no meio de cultura.

A baixa relação $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ pode ser uma condição indutora da hiper-hidricidade (HARTMANN et al., 2002). Assim, tem sido recomendada uma redução do nitrogênio na forma amoniacal no meio MS como medida de prevenção da hiper-hidricidade nas culturas (ZIV et al., 1987; IVANOVA e VAN STADEN, 2009). No entanto, na maioria dos estudos, o NO_3^- é simultaneamente aumentado com a adição de nitrato de amônio, o que dificulta relacionar a hiper-hidricidade com a concentração de NO_3^- ou NH_4^+ (BRAND, 1993). O íon NH_4^+ pode ser tóxico aos tecidos da planta em concentrações elevadas. Brand (1993) observou aumento linear da hiper-hidricidade, concentração de NO_3^- e de nitrogênio total nos tecidos, massa fresca e seca dos explantes e no número de brotos, no cultivo de *Amelanchier arborea*, com o aumento na concentração de nitrato de amônio no meio.

Neste experimento, observou-se maior ganho em massa fresca a partir do 15°-20° dias de cultivo, o que, apesar de não ter sido avaliado, também é esperado para número de brotos formados. Na etapa de introdução, Grattapaglia e Machado (1998) sugerem que, para o objetivo de propagação, explantes maiores são ideais para serem introduzidos, pois explantes muito pequenos levam mais tempo para se desenvolver. Se a mesma afirmativa for verdadeira para a etapa de multiplicação, pode-se considerar que brotos apicais necessitam de mais tempo para se desenvolver em tufos. Assim, devido a este fator, foi observado significativo crescimento dos explantes somente a partir do 20° dia de cultivo. Ao contrário do apresentado neste estudo, Andrade et al. (2006) observaram maior produção de massa fresca de *Eucalyptus grandis* no cultivo em ágar entre 14 e 21 dias de cultivo.

4.2. Cultivo em ágar x meio líquido

Constatou-se que o cultivo em biorreator foi superior ao cultivo em ágar para o crescimento em massa fresca e número de brotos formados por explante, indicando que as culturas líquidas apresentam vantagens em comparação com as culturas sólidas, como a maior e mais rápida taxa de crescimento das plantas cultivadas em meio líquido, onde são banhadas pelo meio nutritivo, o que permite rápida absorção dos nutrientes pelas células (GUPTA e TIMMIS, 2005) e melhor aproveitamento do meio (LEMOS et al., 2001).

Reis et al. (2003) obtiveram incremento de 8 vezes na massa fresca e 2,5 vezes no comprimento dos brotos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivados em biorreator

RITA[®]. McAlister et al. (2005) encontraram resultados promissores no cultivo de clones de *Eucalyptus* em sistema RITA[®], a partir de plantas estabelecidas via sistema semissólido. Estes autores obtiveram resultados superiores aos encontrados no cultivo em ágar, com maior taxa de multiplicação, além de o sistema RITA[®] promover grande proliferação de brotos dos 14 aos 18 dias, enquanto no sistema ágar, a multiplicação foi alcançada somente dos 25 aos 28 dias de cultivo. Para banana (LEMOS et al., 2001) e abacaxi (SILVA et al., 2007), a imersão temporária também foi um método de propagação mais eficiente comparado ao sistema tradicional.

O cultivo em meio semissólido apresentou como padrão brotações menores e taxa de multiplicação inferior comparativamente ao cultivo em imersão temporária, característica que pode estar relacionada com a pouca possibilidade de trocas gasosas nestes sistemas (ETIENNE e BERTHOULY, 2002). Este mesmo padrão de brotações também foi relatado por McAlister et al. (2005) em eucalipto.

Vários relatos indicam que as vantagens do uso de biorreatores no cultivo de plantas se devem, principalmente, ao uso do meio nutritivo líquido, gerando maior produtividade e eficiência do processo de propagação (TAKAYAMA e AKITA, 1994; PENCHEL et al., 2007). Proporcionar ainda manuseio mais simples da cultura, economia de mão-de-obra e tempo das operações, aeração forçada, que estimula o crescimento e a obtenção de maior biomassa; agitação da cultura no biorreator, que resulta na perda de dominância apical e estimula o crescimento de maior número de brotações nos explantes (TAKAYAMA e AKITA, 1994); menor tempo de subcultivo; a composição do meio pode ser mudada por simples transferência e a esterilização do meio pode ser feita por ultrafiltração ou autoclavagem (ALVARD et al., 1993), além de promover maior uniformidade das condições de cultivo (ETIENNE et al., 2006).

Whitehouse et al. (2002) obtiveram sucesso limitado na multiplicação de gemas de *Eucalyptus*, utilizando meio líquido devido à hiper-hidricidade dos explantes, problema frequentemente relacionados ao uso de meio líquido e, também, encontrado nos explantes deste estudo. O meio líquido está associado com alta mobilidade de água e também com alta umidade relativa no ambiente *in vitro*, induzindo a presença de sintomas desta desordem. O status da água no meio de cultura está entre os fatores mais importantes afetando a hiper-hidricidade, além da concentração de reguladores de crescimento e sais de nitrogênio (GASPAR et al., 1987; HARTMANN et al., 2002).

Muitos estudos relatam o cultivo em biorreatores e o uso do meio líquido para diversas técnicas de cultura de tecidos em diferentes espécies, entre elas: (i) embriogênese somática de

Pinus radiata (AITKEN-CHRISTIE et al., 1988), de *Hevea brasiliensis* (ETIENNE et al., 1997), de coníferas (GUPTA e TIMMIS, 2005), de café (ETIENNE et al., 2006), cacau (NIEMENAK et al., 2008); (ii) micropropagação de abacaxi (ESCALONA et al., 1999; SILVA et al., 2007), de banana (LEMONS et al., 2001), de cana-de-açúcar (LORENZO et al., 1998), de batata (TEISSON e ALVARD, 1999) e de helicônia (RODRIGUES et al., 2006).

5. CONCLUSÕES

As relações 3:1 e 1:1 de $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$ promoveram o maior crescimento e produtividade dos explantes. Altas concentrações de amônio proporcionaram aspecto visual com menor vigor dos explantes e maior ocorrência de hiper-hidricidade. O tratamento 2:1 de $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$ obteve menor percentual de hiper-hidricidade (68%) dos explantes.

O cultivo em meio líquido foi superior ao meio semissólido, sendo o período de 35 dias de cultivo em biorreator RITA[®] o que promoveu maior ganho em massa fresca e produtividade dos explantes.

A hiper-hidricidade foi um fator limitante para as plantas cultivadas em biorreatores, alcançando percentuais próximos a 100%, não sendo percebida esta desordem fisiológica nas plantas cultivadas em meio semissólido.

O sistema de cultivo em ágar formou tufos de multibrotações não-alongadas, enquanto o cultivo em biorreator produziu tufos com brotos alongados mais bem definidos.

6. REFERÊNCIAS

AFREEN, F. Temporary immersion bioreactor – Engineering considerations and applications in plant micropropagation. In: GUPTA, S. D.; IBARAKI, Y. (Eds.). **Plant tissue culture engineering**. Dordrecht: Springer, 2006. p. 187-201.

AITKEN-CHRISTIE, J.; SINGH, A. P.; DAVIES, H. Multiplication of meristematic tissue: a new tissue culture system for radiata pine. In: HANOVER, J. W.; KEATHLEY, D. E. **Genetic manipulation of wood plants**. New York: Plenum, 1988. p. 413-432.

ALVARD, M.; COTE, F.; TEISSON, C. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 32, p. 55-60, 1993.

ANDRADE, W. F.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, A. N. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 12, p. 1715-1719, 2006.

BRAND, M. H. Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 35, p. 203-209, 1993.

CASTRO, D. R.; GONZÁLEZ, O. J. Micropropagación de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) en el sistema de inmersión temporal. **Agricultura Técnica**, v. 62, p. 68-78, 2002.

ESCALONA, M.; LORENZO, J. C.; GONZALEZ, B.; DAQUINTA, M.; GONZALEZ, J. L.; DESJARDINS, Y.; BARROTO, C. G. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion system. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 743-748, 1999.

ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion system in plant micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 215-231, 2002.

ETIENNE, H.; DECHAMP, E.; BARRY-ETIENNE, D.; BERTRAND, B. Bioreactors in coffee micropropagation. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 45-54, 2006.

ETIENNE, H.; LARTAUD, M.; MICHAUX-FERRIÉRE, N.; CARRON, M. P.; BERTHOULY, M.; TEISSON, C. Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* using the temporary immersion technique. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 33, p. 81-87, 1997.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; DEBERGH, P.; MAENE, L.; PAQUES, M.; BOXUS, P. Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects. In: BONGA, J. M. e DURZAN, D. J. (Eds.). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. v. 1, p. 152-166.

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. v. 1, p. 183-260.

GUPTA, P. K.; TIMMIS, R. Mass propagation of conifer trees in liquid cultures-progress towards commercialization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 339-346, 2005.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T. GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 7. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. 880 p.

IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Effect of ammonium ions and cytokinins on hyperhydricity and multiplication rate of *in vitro* regenerated shoots of *Aloe polyphylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 92, p. 227-231, 2008.

IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Nitrogen source, concentration, and $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ ratio influence shoot regeneration and hyperhydricity in tissue cultured *Aloe polyphylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 99, p. 167-174, 2009.

LEMOS, E. E. P.; FERREIRA, M. S.; ALENCAR, L. M. C.; OLIVEIRA, J. G. L.; MAGALHÃES, V. S. Micropropagação de clones de banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, p. 482-487, 2001.

LORENZO, J. C.; GONZALEZ, B. L.; ESCALONA, M.; TEISSON, C.; ESPINOSA, P.; BARROTO, C. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 54, p. 197-200, 1998.

MARQUES, D. de A.; SHEPHERD, S. L. K.; CROCOMO, O. J. Influência de fontes de nitrogênio sobre o desenvolvimento de gemas axilares de explantes caulinares de *Chrysanthemum morifolium* Ramat. cultivado *in vitro*. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 21, n. 2, 1998.

McALISTER, B.; FINNIE, J.; WATT, M. P.; BLAKEWAY, F. Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forest (SA). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 347-358, 2005.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NIEMENAK, N.; SAARE-SURMINSKI, K.; ROHSIUS, C.; NDOUMOU, D. O.; LIEBEREI, R. Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 4, p. 667-676, 2008.

PENCHEL, R. M.; OTONI, W. C.; XAVIER, A. Tecnologia de biorreatores e propagação fotoautotrófica *in vitro*. In: Borém, A. (Ed.). **Biotechnology Florestal**. Viçosa: UFV, 2007. cap. 4, p. 75-92.

REIS, J. P.; MORAIS, P. B.; PENCHEL, R.; HENRIQUE, A. Micropropagação de eucalipto no sistema de imersão temporária. In: Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 1., 2003, Lavras. **Anais...** p. 276.

RODRIGUES, P. H. V.; TEIXEIRA, F. M.; LIMA, A. M. L. P.; AMBROSANO, G. M. B. Propagação de mudas de helicônia em biorreator de imersão temporária. **Bragantia**, v. 65, n. 1, p. 29-35, 2006.

SANTOS-SEREJO, J. A.; JUNGHANS, T. G.; SOARES, T. L.; SILVA, K. M. da. Meios nutritivos para micropropagação de plantas. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. (Eds.). **Introdução à micropropagação de plantas**. 1 ed. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006, v. , p. 79-98.

SILVA, A. B. da; PASQUAL, M.; TEIXEIRA, J. B.; ARAÚJO, A. G. de. Métodos de propagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 9, p. 1257-1260, 2007.

TAKAYAMA, S.; AKITA, M. Bioengineering aspects of bioreactor application in plant propagation. In: GUPTA, S. D.; IBARAKI, Y. **Plant tissue culture engineering**. Dordrecht: Springer. p. 83-100, 2006.

TAKAYAMA, S.; AKITA, M. The types of biorreactor used for shoot and embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 39, p. 147-156, 1994.

TEISSON, C.; ALVARD, D. *In vitro* production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion. **Potato Research**, v. 42, p. 499-504, 1999.

WHITEHOUSE, A. B.; MARKS, T. R.; EDWARDS, G. A. Control of hyperhydricity in *Eucalyptus* axillary shoot cultures grown in liquid medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 71, p. 245-252, 2002.

ZIV, M. *In vitro* acclimatization. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; SMITH, M. L. (Eds.). **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995a. p. 493-516.

ZIV, M.; SCHWARTZ, A.; FLEMINGER, D. Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated in vitro; implications for hardening. **Plant Science**, v. 52, p. 127-134, 1987.

ZIV, M. The control of biorreactor environment for plant propagation in liquid culture. **Acta Horticulturae**, v. 393, p. 25-38, 1995b.

ZIV, M. Simple bioreactor for mass propagation of plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 277-285, 2005.

EFEITO DA FREQUÊNCIA DE IMERSÃO E DE INJEÇÃO ADICIONAL DE AR NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* EM BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

RESUMO: Os objetivos do presente estudo foram avaliar diferentes frequências de imersão (2, 4, 8 e 16 horas) e suportes de apoio dos explantes dentro dos biorreatores RITA[®] (papel filtro e espuma), assim como um sistema de ventilação com entrada de ar adicional acoplado ao recipiente dos biorreatores, quanto às características massa fresca, número de brotos e hiper-hidricidade dos explantes, na fase de multiplicação de gemas axilares de um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. As imersões a cada 2 e 4 horas e o suporte papel filtro proporcionaram maior massa fresca e número de brotos por explantes, porém ocasionaram maior percentual de brotos hiper-hídricos. A injeção adicional de ar ao recipiente do biorreator RITA[®] não influenciou o crescimento das culturas.

Palavras-chave: Propagação *in vitro*, clonagem de eucalipto, atmosfera gasosa

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novas tecnologias para produção de mudas micropropagadas em larga escala, em especial para espécies florestais de interesse econômico como as do gênero *Eucalyptus*, é uma das alternativas para tornar esta técnica da cultura de tecidos comercialmente viável. O desenvolvimento de equipamentos como os biorreatores constitui uma alternativa promissora, pois permite reduzir a mão-de-obra e o custo de produção, estabelecendo um sistema prático para propagação massal de plantas *in vitro* (TAKAYAMA e AKITA, 2006).

Muitos fatores interferem na micropropagação de plantas, principalmente em se tratando do uso de biorreatores e meio líquido de crescimento. As condições do cultivo *in vitro*, alta umidade, fatores nutricionais como minerais e carboidratos, altos níveis de reguladores de crescimento, baixa irradiância e elevada disponibilidade de água no substrato são os maiores indutores de desordens fisiológicas nas plantas, como a hiper-hidricidade (MAJADA et al., 2000).

Esta é uma desordem fisiológica comum na cultura de tecidos vegetais, que frequentemente consiste em obstáculo na micropropagação de espécies lenhosas, visto afetar a multiplicação de gemas, o vigor da cultura e também impossibilitar a aclimatização das plantas nas condições *ex vitro*. É morfológicamente caracterizada por brotos alongados e espessos em diâmetro, entrenós mais curtos do que as plantas normais, e as folhas se apresentam espessadas, frequentemente alongadas, enrugadas ou enroladas e quebradiças (GASPAR, 1991; ZIV, 1991). É considerada um dos maiores problemas das plantas cultivadas em culturas líquidas (ZIV, 1995), envolvendo múltiplos fatores que dependem de respostas fisiológicas específicas das condições da cultura, assim como da espécie estudada (GASPAR et al., 1987; ZIV, 1991).

Mudanças anatômicas observadas em folhas hiper-hídricas de plantas lenhosas como maçã e eucalipto incluem estômatos anormais, redução do tecido paliçádico, grandes espaços intercelulares nas camadas de células do mesófilo e presença de uma fina camada ou ausência de cutícula (CHAKRABARTY et al., 2005; PICOLI et al., 2008). Fisiologicamente, envolve o excesso de absorção de água e a inibição da síntese de lignina e celulose (HARTMANN et al., 2002).

O manejo da cultura, como a determinação da frequência e da duração da imersão, é fator fundamental para obtenção de um maior coeficiente de multiplicação e melhor qualidade das plantas em sistemas de imersão temporária (CASTRO e GONZÁLEZ, 2002), pois determina a absorção de nutrientes e controla a hiper-hidricidade das plântulas (ETIENNE e BERTHOULY, 2002). Alguns estudos focaram o manejo dos intervalos e a duração da imersão em espécies do gênero *Eucalyptus* (CASTRO e GONZÁLEZ, 2002; McALISTER et al., 2005), em helicônia (RODRIGUES et al., 2006), banana (LE MOS et al., 2001) e abacaxi (SILVA et al., 2007). Na maioria dos casos, os menores intervalos entre as imersões favoreceram o desenvolvimento das culturas pelo maior aproveitamento do meio de cultura líquido pela planta.

Muitos trabalhos enfatizam o ambiente gasoso dos recipientes de cultivo influenciando o desenvolvimento das culturas (ZIV, 1991; 1995; GASPAR, 1991; CHAKRABARTY et al., 2005; AFREEN, 2006) e a ventilação ou trocas gasosas como uma medida de prevenção de estresses, como a hiper-hidricidade (MAJADA et al., 2000; PARK et al., 2004). Lai et al. (2005) relatam a importância da ventilação na redução da umidade relativa dentro do recipiente e para remoção do etileno, CO₂ e outros componentes voláteis acumulados no “headspace” dos frascos de cultivo para obtenção de brotações não-hiperídricas. Gaspar (1991) cita diversos fatores como indutores da hiper-hidricidade, entre eles a atmosfera do

vaso de cultura. Castro e González (2002) alcançaram sucesso na micropropagação de *Eucalyptus grandis* em sistema de imersão temporária, a partir da incorporação de ar adicional ao recipiente da cultura. Em maçã, a hiper-hidricidade foi completamente eliminada com o fornecimento de ar dentro da câmara do biorreator (CHAKRABARTY et al., 2003).

Em vista da importância do manejo das condições de cultivo sobre o desenvolvimento das culturas, os objetivos deste estudo foram avaliar diferentes manejos de frequência de imersão e suportes de apoio dos explantes dentro de biorreatores RITA[®], assim como um sistema de ventilação com entrada de ar adicional acoplado ao recipiente do biorreator, quanto às características de massa fresca, número de brotos e de hiper-hidricidade dos explantes, na fase de multiplicação de gemas axilares de um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Fonte, meio de cultura e condições de cultivo dos explantes

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia, do Centro de Pesquisa e Tecnologia - CPT da empresa Fibria (antiga Aracruz Celulose S/A), localizada no município de Aracruz, Espírito Santo.

O material vegetal utilizado para introdução nos biorreatores foi um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1) proveniente da empresa Fibria, pré-estabelecido *in vitro* em meio de cultura semissólido, tendo como recipientes de cultivo placas de Petri estéreis e descartáveis (Pleion Bioplass[®]) de 90 mm de diâmetro x 15 mm de altura. Estas continham 25 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), adicionado de 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma[®]), 10 mg L⁻¹ de tiamina-HCl (Sigma[®]), 0,50 mg L⁻¹ de ácido nicotínico (Sigma[®]), 0,50 mg L⁻¹ de piridoxina-HCl (Sigma[®]), 100 mg L⁻¹ de L-glutamina (Sigma[®]), 0,34 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina – Sigma[®]), 0,01 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético – Sigma[®]), 30 g L⁻¹ de sacarose (Vetec[®]) e 7 g L⁻¹ de bacto-ágar (BD[®]). O pH foi ajustado para 5,8 com KOH (1N) e HCl (1N) antes da adição do ágar e da esterilização em autoclave a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121°C por 15 minutos. O material vegetal foi estabelecido em prateleiras de metal aramado com iluminação vertical e lateral, acondicionado em sala de cultura a 24 ± 2°C, fotoperíodo de 14 horas e irradiância média de 20 µmol m⁻² s⁻¹, medida no aparelho Optic Science - Modelo DQM.

2.2. Frequências de imersão e suportes de apoio dos explantes

Foram testados quatro intervalos entre as imersões - 2, 4, 8, ou 16 horas - por um período de oito segundos, e dois sistemas de suporte de apoio para os explantes, somente papel filtro qualitativo (Nº 1 - Qualy[®]) e o uso de disco de esponja polimérica (Bulpren S 28133, densidade 30 Kg m⁻³) sob o papel filtro (Figura 1), em biorreator RITA[®] (Vitropic S/A).

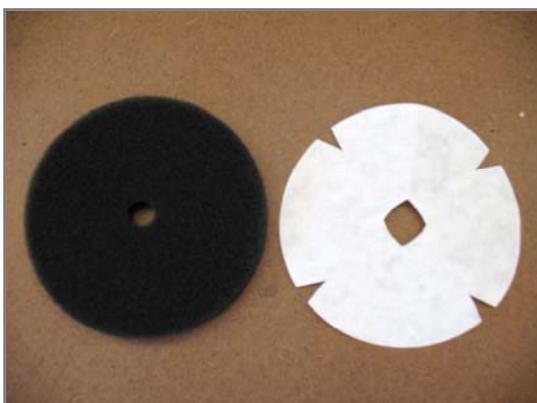


Figura 1 – Disco de esponja polimérica (esquerda) e papel filtro (direita) usados como suporte de apoio dos explantes dentro dos biorreatores de imersão temporária RITA[®].

Foram utilizados brotos apicais, com massa fresca e tamanho uniformes, como explantes iniciais, de um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1), estabelecidos *in vitro*. Os explantes foram pré-cultivados, aproximadamente, sete dias antes de sua utilização nos biorreatores RITA[®] para experimentação, permanecendo em placas de Petri contendo meio MS como descrito no item 2.1, sem adição de reguladores de crescimento.

O meio de cultura utilizado foi o MS, contendo 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 10 mg L⁻¹ de tiamina-HCl, 0,50 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 0,50 mg L⁻¹ de piridoxina-HCl, 0,11 mg L⁻¹ de BAP e 30 g L⁻¹ de sacarose, com pH ajustado para 5,8 com KOH (1N) e HCl (1N) antes da esterilização em autoclave a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121°C por 15 minutos. Utilizou-se o volume de 250 mL de meio de cultura por recipiente, autoclavado diretamente dentro dos recipientes (biorreatores). Após introdução nos biorreatores, o material vegetal foi acondicionado em sala de cultura a 24 ± 2°C, fotoperíodo de 14 h e irradiância média de 20 μmol m⁻² s⁻¹.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 4 x 2, constituído por quatro manejos de imersão (2, 4, 8 e 16 horas) e dois suportes

de apoio para os explantes dentro dos biorreatores (papel filtro e esponja polimérica), com quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por um recipiente RITA[®] contendo oito explantes.

Para avaliação de massa fresca, foi realizada pesagem dos explantes aos 0, 21 e 28 dias de idade da cultura. O número de brotos foi obtido pela contagem de novos brotos, com dois ou mais pares de folhas desenvolvidos durante o ciclo de cultivo, em todos os explantes, aos 21 e 28 dias de idade da cultura. O percentual de hiper-hidricidade foi obtido através da análise visual do explante, com a contagem do número de brotos hiper-hídricos em cada explante aos 0, 21 e 28 dias de idade da cultura.

2.3. Injeção adicional de ar aos recipientes

Este experimento avaliou a influência da injeção adicional de ar no compartimento superior do recipiente do biorreator RITA[®], através do filtro de saída original de ar, possibilitada pela criação de uma saída alternativa de ar na tampa do frasco (Figura 2). O volume de ar adicionado foi de $0,8 \text{ L min}^{-1}$, medido por meio do aparelho rotâmetro, e o fluxo controlado automaticamente em intervalos de quatro horas com duração de um minuto.

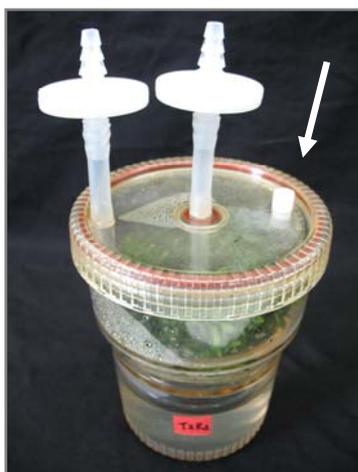


Figura 2 – Recipiente do biorreator de imersão temporária RITA[®], com a saída de ar adicional incorporada à tampa do frasco.

Foram utilizados brotos apicais, com massa fresca e tamanho uniformes, como explantes iniciais, de um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1), estabelecidos *in vitro*. Os explantes foram pré-cultivados, aproximadamente, sete dias antes da montagem do

experimento, permanecendo em placas de Petri contendo meio MS como descrito no item 2.1, sem adição de reguladores de crescimento.

O meio de cultura utilizado para introdução nos biorreatores foi o MS, contendo 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 10 mg L⁻¹ de tiamina-HCl, 0,50 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 0,50 mg L⁻¹ de piridoxina-HCl, 0,11 mg L⁻¹ de BAP e 30 g L⁻¹ de sacarose, com pH ajustado para 5,8 com KOH (1N) e HCl (1N) antes da esterilização em autoclave a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121°C por 15 minutos. Utilizou-se o volume de 250 mL de meio de cultura por recipiente, o qual foi autoclavado diretamente dentro dos recipientes (biorreatores). Após introdução nos biorreatores, o material vegetal foi acondicionado em sala de cultura a 24 ± 2°C, fotoperíodo de 14 h e irradiância média de 20 μmol m⁻² s⁻¹. Foi realizada renovação do meio de cultura aos 21 dias de idade. O manejo de imersão utilizado foi de duas horas, por um período de oito segundos. Como suporte de apoio para os explantes, utilizou-se papel filtro qualitativo (Nº 1 - Qualy[®]). A umidade relativa e a temperatura, dentro dos recipientes dos biorreatores RITA[®], foram medidas por meio de termo-higrômetro modelo HOBO[®], da marca Onset.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com dois tratamentos, com e sem incorporação adicional de ar nos frascos, com cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por um recipiente RITA[®], contendo doze explantes.

Para avaliação de massa fresca, foi realizada pesagem dos explantes de cada repetição dos tratamentos aos 0, 7, 14, 21 e 28 dias de idade da cultura. Após avaliação final do experimento, aos 28 dias, os explantes foram mantidos em estufa (50°C por 72 horas) para obtenção de seu peso seco. O número de brotos foi obtido pela contagem de novos brotos, com dois ou mais pares de folhas, desenvolvidos durante o ciclo de cultivo, em todos os explantes, aos 7, 14, e 28 dias de idade da cultura. O percentual de hiper-hidricidade foi obtido por meio de análise visual do explante, com a contagem do número de brotos hiper-hídricos em cada explante aos 0, 7, 21 e 28 dias de idade da cultura.

3. RESULTADOS

3.1. Frequências de imersão e suportes de apoio dos explantes

A característica massa fresca (Figuras 3A e B) apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) para os fatores frequência de imersão e suporte, não havendo interação significativa entre os dois fatores, nas duas idades de avaliação (21 e 28 dias). As frequências de 2 e 4 horas foram superiores às demais apresentando média geral de 0,22 g e 0,16 g aos 21 dias e de 0,49 g e 0,31 g aos 28 dias, respectivamente. As frequências de 8 e 16 horas promoveram menor crescimento dos explantes, com médias iguais de 0,11 g para os dois intervalos de imersão aos 21 dias, e de 0,19 g e 0,17 g aos 28 dias, respectivamente. Para o fator suporte de apoio dos explantes, o papel filtro apresentou-se superior ($P < 0,05$) nas duas idades avaliadas em relação à espuma, com médias de 0,20 g e 0,39 g para o papel em comparação a 0,09 g e 0,19 g para espuma, aos 21 e 28 dias, respectivamente.

Comparando-se os tratamentos de manejo de imersão do cultivo em biorreator com o cultivo convencional em meio semissólido utilizando jarras de vidro, observou-se ganho de 2,5 vezes em massa fresca dos explantes cultivados no manejo de imersão a cada 2 horas, sendo o crescimento dos explante no cultivo ágar semelhante ao manejo de frequências de 8 e 16 horas, nas duas idades avaliadas.

Assim como para massa fresca, o número de brotos (Figura 3C e D) apresentou diferenças significativas ($P < 0,05$) para os fatores frequência de imersão e suporte, não havendo interação entre estes dois fatores, nas duas idades avaliadas, 21 e 28 dias. As frequências de 2 e 4 horas também se apresentaram superiores com médias de 6,95 e 5,27 aos 21 dias, e de 14,37 e 9,85 aos 28 dias, respectivamente. Nas frequências de 8 e 16 horas, foram obtidas médias de 4,08 e 3,72 aos 21 dias, e de 7,29 e 6,17 aos 28 dias, respectivamente. O suporte papel filtro apresentou-se superior em número de brotos formados ($P < 0,05$), com médias de 6,06 e 11,98, em comparação ao suporte espuma, que proporcionou médias de 3,95 e 6,86, aos 21 e 28 dias de idade, respectivamente.

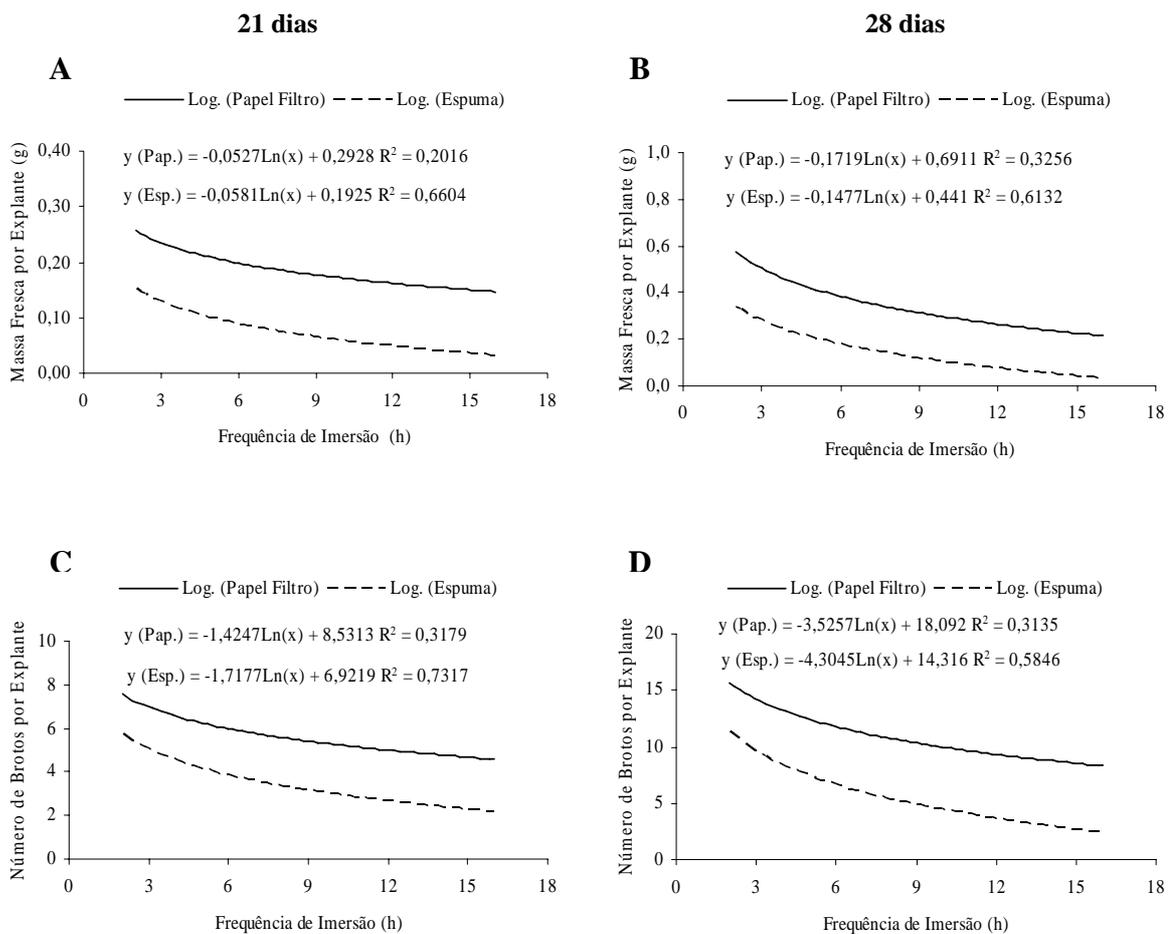


Figura 3 – Curvas de tendência para massa fresca e número de brotos aos 21 dias (A e C) e aos 28 dias (B e D), para os dois suportes de apoio dos explantes (papel filtro e espuma), nas quatro frequências de imersão estudadas (2, 4, 8 e 12 horas), em biorreatores de imersão temporária RITA[®], do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1).

Para percentual de brotos hiper-hídricos por explante, somente o fator frequência de imersão foi significativo ($P < 0,05$) aos 21 dias de idade, enquanto aos 28 dias não houve diferença entre os tratamentos (Quadro 1). No entanto, foi observado decréscimo do percentual de brotos hiper-hídricos com o aumento dos intervalos entre as imersões.

Quadro 1 – Percentual de brotos hiper-hídricos para os dois suportes de apoio dos explantes nas quatro frequências de imersão estudadas, aos 21 e 28 dias de cultivo em biorreatores de imersão temporária RITA[®], do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1). Tratamentos com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo Teste Tukey.

Frequência de Imersão (horas)	21 dias			28 dias		
	Papel Filtro	Espuma	Média	Papel Filtro	Espuma	Média
2	40,4	44,7	42,6 a	68,1	63,6	65,9 a
4	23,8	34,1	28,9 ab	62,2	79,3	70,7 a
8	9,9	16,7	13,3 b	42,6	56,9	49,8 a
16	20,5	5,6	13,1 b	34,9	63,3	49,1 a

3.2. Injeção adicional de ar aos recipientes

Os dois tratamentos estudados, sem e com injeção adicional de ar, mostraram-se iguais ($P < 0,05$) pelo teste de identidade de modelos para todas as características avaliadas: massa fresca e seca, número de brotos produzidos e hiper-hidricidade dos explantes (Figura 4). Apesar de outros trabalhos terem obtido sucesso com o manejo do ambiente gasoso dentro de biorreatores, nas condições de fluxo de ar estudadas não foi observada diferença entre os tratamentos para estas características. Quanto à massa seca obtida aos 28 dias, ela correspondeu a 7,4% da massa fresca nos dois tratamentos, confirmando a semelhança entre eles.

Pode-se observar que a massa fresca, o número de brotos e a hiper-hidricidade dos explantes ganharam impulso a partir do 14^o dia de cultivo (Figura 4), indicando que, nas condições estudadas, o maior desenvolvimento das culturas ocorreu a partir deste momento.

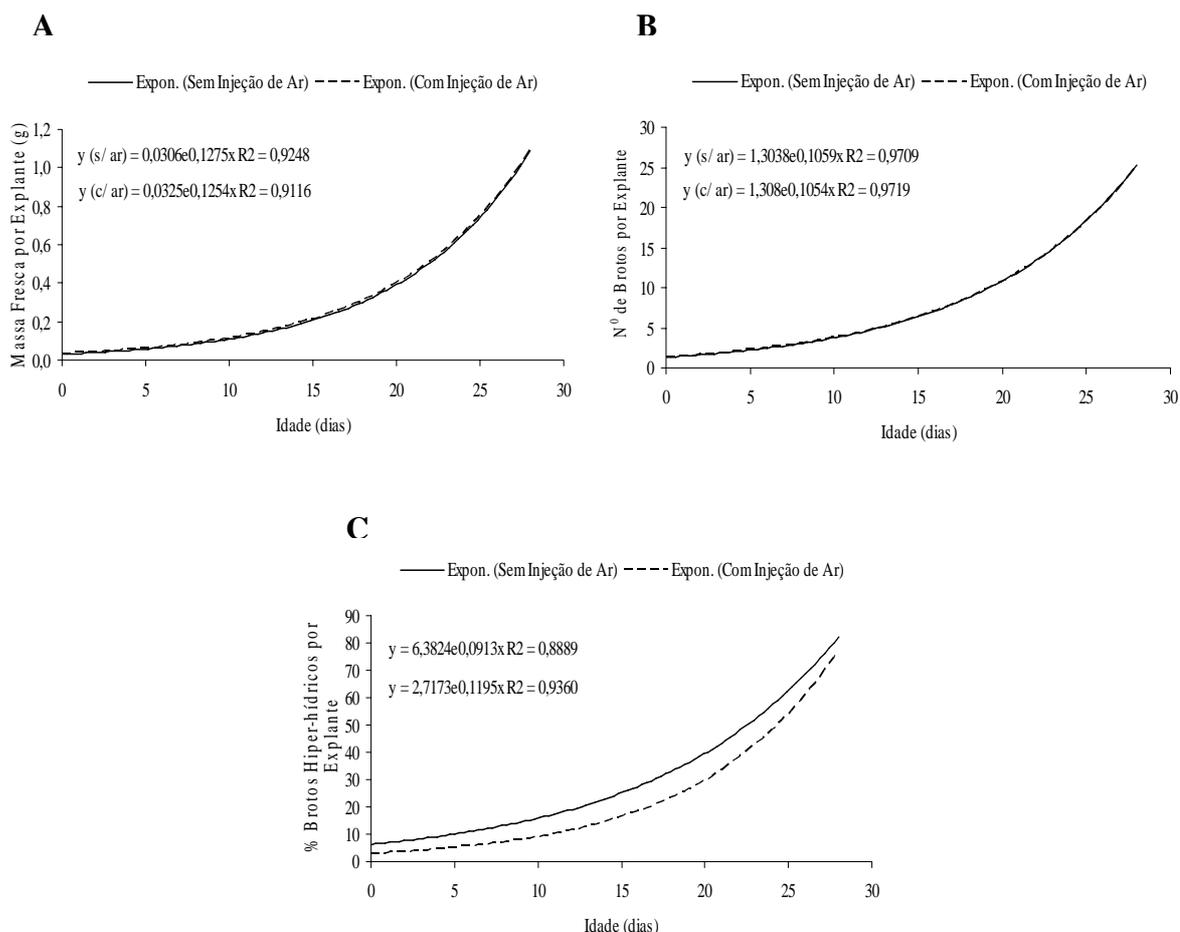


Figura 4 – Curvas de tendência para as características massa fresca (A), número de brotos (B) e percentual de brotos hiper-hídricos (C) por explante, nos dois tratamentos de manejo do ar estudados (sem e com injeção adicional de ar ao recipiente RITA[®]), dos 0 aos 28 dias de cultivo do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1) em biorreatores de imersão temporária RITA[®].

4. DISCUSSÃO

4.1. Frequências de imersão e suportes de apoio dos explantes

Os menores intervalos entre as imersões promoveram maior crescimento em massa fresca e número de brotos formados por explante, no entanto a hiper-hidricidade foi mais severa nestes manejos mais frequentes de imersão. Assim como observado neste trabalho, McAlister et al. (2005) obtiveram a maior taxa de multiplicação de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* e de *Eucalyptus grandis* x *E. nitens* em biorreator RITA[®] na menor frequência testada (10 minutos com duração de 30 segundos). O mesmo foi observado por Reis et al. (2003), em que incrementos de 8 vezes na massa fresca e 2,5 vezes no

comprimento dos brotos *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivados em biorreator RITA[®] foram obtidos em manejo de imersão de 2 horas, com alta incidência de explantes hiper-hídricos. Contrário aos resultados do presente estudo, Castro e González (2002) consideraram melhor tratamento em produtividade dos explantes de *E. grandis* uma das maiores frequências de imersão estudadas (12 horas com duração de 3 minutos) em comparação com os menores intervalos (3 e 6 horas). Com relação à hiper-hidricidade, assim como apresentado, os autores observaram menor ocorrência desta desordem em maiores intervalos de imersão (12 e 24 horas) em comparação com os menores intervalos (3 e 6 horas).

Na micropropagação de espécies como a *Heliconia champneiana*, os menores intervalos entre as imersões (1 e 4 horas) também favoreceram o desenvolvimento e propagação dos explantes em biorreatores de imersão temporária (RODRIGUES et al., 2006). O mesmo comportamento foi relatado para banana em sistema de imersão temporária, onde o ciclo de imersão de quatro horas proporcionou maior aproveitamento do meio de cultura em comparação com 12 horas (LEMOS et al., 2001). Os dois autores relataram vantagens do sistema de imersão temporária em comparação com o cultivo em ágar, como maior eficiência na produção, aclimatização e crescimento dos explantes.

Neste experimento, houve clara relação entre as características massa fresca e número de brotos produzidos, assim como relatado por Yadav et al. (2003), em que os autores encontraram correlação entre taxa de multiplicação, crescimento e hiper-hidricidade, correlação positiva entre peso dos brotos e multiplicação e negativa entre peso dos brotos, multiplicação e hiper-hidricidade. Porém, neste estudo, foi encontrada relação positiva entre as características massa fresca, número de brotos e hiper-hidricidade, pois os tratamentos com os menores intervalos de imersão promoveram maior crescimento e hiper-hidricidade dos explantes.

4.2. Injeção adicional de ar aos recipientes

Apesar de diversos estudos relatarem os benefícios do manejo do ambiente gasoso para as culturas, neste trabalho não foi observada diferença entre os tratamentos de injeção de ar dentro do biorreator para nenhuma das características de crescimento avaliadas, assim como para a hiper-hidricidade. Diversos fatores podem ter influenciado estes resultados, como a qualidade e a quantidade de ar implantada nos frascos. Segundo Ziv (1995), a composição gasosa dentro dos recipientes de cultivo é influenciada pelo volume do recipiente e da

ventilação, sendo assim, neste estudo, o fluxo de ar adicionado aos frascos dos biorreatores pode não ter sido suficiente para influenciar os resultados, sendo esta uma das possíveis causas da não diferenciação dos tratamentos. Sistemas de ventilação, como membranas permeáveis e aeração forçada, são essenciais para melhorias na micropropagação, quando a hiper-hidricidade é um obstáculo (MAJADA et al., 2000).

Ao contrário do que foi observado neste trabalho, Castro e González (2002) obtiveram redução da hiper-hidricidade em *Eucalyptus grandis* com a incorporação de ar, a cada 6 horas por 3 minutos, ao sistema de imersão temporária, o que permitiu a renovação da atmosfera dos recipientes e a diminuição da umidade relativa nos frascos de cultivo, sem interferir nas características de crescimento da cultura. Já Lai et al. (2005) observaram efeito negativo no número de gemas desenvolvidas e positivo na qualidade dos brotos formados com o uso da ventilação pela remoção do parafilme dos recipientes em culturas de *Scrophularia yoshimurae*.

Saher et al. (2005) reduziram a hiper-hidricidade com o uso de fundo de resfriamento dos frascos em culturas de cravo, tendo a diminuição de 3-4°C dentro do frasco de cultura sido suficiente para deixar a umidade relativa abaixo de 90%. A alta umidade é citada como um dos fatores indutores da hiper-hidricidade (GASPAR et al., 1987; MAJADA et al., 2000).

Nas condições deste estudo, a umidade relativa dentro dos biorreatores foi mensurada, apresentando-se constante em 100% durante todo o período de cultivo, o que pode ter atuado como um potencializador do alto percentual de hiper-hidricidade dos explantes cultivados nos biorreatores. A alta umidade relativa na atmosfera do frasco de cultivo é um agente realçador da hiper-hidricidade, ou seja, atua com outros fatores na indução desta desordem fisiológica (GASPAR, 1991).

A composição da atmosfera gasosa dos recipientes de cultivo influencia o desenvolvimento das culturas pelo acúmulo de substância, como o etileno, que podem ser produzidas em excesso pelas plantas (GASPAR, 1991; PARK et al., 2004) e pela alta umidade relativa, próxima a 100%, que afeta a taxa de transpiração das culturas (SAHER et al., 2005), sendo estes agentes indutores de mudanças morfológicas nas plantas.

Trabalhos relatam como principais alternativas para o controle desta desordem fisiológica o uso de agente antivitrificante EM2 (Sigma-Aldrich®) (Whitehouse et al., 2002), o uso de ágar hidrolisado (MARGA et al., 1997), o aumento da concentração de ágar (ABDOLI et al., 2007; BRAND, 1993), ferro, magnésio (YADAV et al., 2003) e de nitrato de prata (MAYOR et al., 2003) no meio de cultura.

5. CONCLUSÕES

Os menores intervalos entre as imersões (2 e 4 horas) e o suporte papel filtro proporcionaram maior crescimento em massa fresca e número de brotos formados por explante, porém ocasionaram maior percentual de brotos hiper-hídricos.

Quanto à injeção adicional de ar ao recipiente do biorreator RITA[®], o fluxo de ar de 0,8 L min⁻¹ adicionado aos frascos não influenciou o desenvolvimento das culturas.

6. REFERÊNCIAS

ABDOLI, M.; MOIENI, A.; DEHGHANI, H. Effects of cultivar and agar concentration on *in vitro* shoot organogenesis and hyperhydricity in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Pakistan Journal of Botany**, v. 39, n. 1, p. 31-35, 2007.

AFREEN, F. Temporary immersion bioreactor – Engineering considerations and applications in plant micropropagation. In: GUPTA, S. D.; IBARAKI, Y. (Eds.). **Plant tissue culture engineering**. Dordrecht: Springer, 2006. p. 187-201.

BRAND, M. H. Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 35, p. 203-209, 1993.

CASTRO, D. R.; GONZÁLEZ, O. J. Micropropagación de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) en el sistema de inmersión temporal. **Agricultura Técnica**, v. 62, p. 68-78, 2002.

CHAKRABARTY, D.; HAHN, E. J.; YUN, Y. S.; PAEK, K. Y. Micropropagation of apple root stock ‘M9 EMLA’ using bioreactor. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.78, p. 605-609, 2003.

CHAKRABARTY, D.; PARK, S.Y.; ALI, M.B.; SHIN, K. S.; PAEK, K. Y. Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. **Tree Physiology**, v. 26, p. 377-388, 2005.

ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion system in plant micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 215-231, 2002.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; DEBERGH, P.; MAENE, L.; PAQUES, M.; BOXUS, P. Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Eds.). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. v. 1, p. 152-166.

GASPAR, T. Vitrification in micropropagation. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry – High-tech and micropropagation I**. Berlin: Springer, 1991. v. 17, p. 116-126.

- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 6. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. 770 p.
- LAI, C.; LIN, H.; NALAWADE, S. M.; FANG, W.; TSAY, H. Hyperhydricity in shoot cultures of *Scrophularia yoshimurae* can be effectively reduced by ventilation of culture vessels. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 355-361, 2005.
- LEMOS, E. E. P.; FERREIRA, M. S.; ALENCAR, L. M. C.; OLIVEIRA, J. G. L.; MAGALHÃES, V. S. Micropropagação de clones de banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, p. 482-487, 2001.
- MAJADA, J. P.; TADEO, F.; FAL, M.A.; SÁNCHEZ-TAMÉS, R. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 63, p. 207-214, 2000.
- MARGA, F.; VEBRET, L.; MORVAN, H. Agar fractions could protect apple shoots cultured in liquid media against hyperhydricity. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 49, p. 1-5, 1997.
- MAYOR, M. L.; NESTARES, G.; ZORZOLI, R.; PICARDILI, L. A. Reduction of hyperhydricity in sunflower tissue cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, p. 99-103, 2003.
- McALISTER, B.; FINNIE, J.; WATT, M. P.; BLAKEWAY, F. Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forest (SA). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 347-358, 2005.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- PARK, S. W.; JEON, J. H.; KIM, Y. M.; ASWATH, C.; JOUNG, H. Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots in vitro. **Scientia Horticulturae**, v. 99, p. 199-205, 2004.
- PICOLI, E. A. T.; PAIVA, E. A. S.; XAVIER, A.; AGUIAR, R. M.; CAROLINO, S. M. B.; FÁRI, M. G.; OTONI, W. C. Ultrastructural and biochemical aspects of normal and hyperhydric eucalypt. **International Journal of Horticultural Science**, v. 14, n. 3, p. 61-69, 2008.
- REIS, J. P.; MORAIS, P. B.; PENCHEL, R.; HENRIQUE, A. Micropropagação de eucalipto no sistema de imersão temporária. In: Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 1., 2003, Lavras. **Anais...** p. 276.
- RODRIGUES, P. H. V.; TEIXEIRA, F. M.; LIMA, A. M. L. P.; Ambrosano, G. M. B. Propagação de mudas de helicônia em biorreator de imersão temporária. **Bragantia**, v. 65, n. 1, p. 29-35, 2006.
- SAHER, S.; PIQUERAS, A.; HELLIN, E.; OLMOS, E. Prevention of hyperhydricity in micropropagated carnation shoots by bottom cooling: implications of oxidative stress. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 149-158, 2005.

SILVA, A. B. da; PASQUAL, M.; TEIXEIRA, J. B.; ARAÚJO, A. G. de. Métodos de propagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 9, p. 1257-1260, 2007.

TAKAYAMA, S.; AKITA, M. Bioengineering aspects of bioreactor application in plant propagation. In: GUPTA, S. D.; IBARAKI, Y. (Eds.). **Plant tissue culture engineering**. Dordrecht: Springer. p. 83-100, 2006.

WHITEHOUSE, A. B.; MARKS, T. R.; EDWARDS, G. A. Control of hyperhydricity in *Eucalyptus* axillary shoot cultures grown in liquid medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 71, p. 245-252, 2002.

YADAV, M. K.; GAUR, A. K.; GARG, G. K. Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, p. 153-156, 2003.

ZIV, M. The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. **Acta Horticulturae**, v. 393, p. 25-38, 1995.

ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Eds.). **Micropropagation, Technology and Application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 45-69.

ALONGAMENTO *IN VITRO* DE MULTIBROTAÇÕES DE *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* EM MEIO SEMISSÓLIDO E EM BIORRETORES DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

RESUMO: O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de diferentes períodos de cultivo (14, 21, 28 e 35 dias) na fase de alongamento *in vitro* de multibrotações de um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, utilizando biorreatores de imersão temporária RITA[®] e BIT[®] (meio líquido) comparativamente ao cultivo em potes plásticos (meio semissólido). O biorreator BIT[®] e o cultivo em ágar nos potes plásticos promoveram maiores médias de ganho em massa fresca e número final de brotos em todas as idades de avaliação. O alongamento dos brotos não foi satisfatório, sendo a maior parte dos brotos (>60%) classificados na classe de tamanho de 0,0-2,0 cm. Poucos foram os explantes que apresentaram tamanho superior a 4,1 cm. Há necessidade de ajuste do manejo da cultura na fase de alongamento para a obtenção de brotos com maior vigor aptos a enraizar em condições *ex vitro*, afim de que esta técnica possa se tornar viável em larga escala.

Palavras-chave: Propagação *in vitro*, clonagem de *Eucalyptus*, alongamento *in vitro*

1. INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Eucalyptus* estão entre as plantas lenhosas mais domesticadas no mundo, pelo grande interesse silvicultural em torno delas, em vista da infinidade de usos desta matéria-prima no setor florestal mundial.

A propagação de indivíduos geneticamente melhorados normalmente constitui alvo do setor produtivo, visando à maior produtividade e qualidade tecnológica da madeira para o fim desejado. Neste sentido, entre as técnicas de propagação clonal, a micropropagação tem sido considerada potencial diante das tecnologias existentes. A micropropagação é amplamente estudada em diversas espécies vegetais, sendo a técnica de cultura de tecidos que mais tem se difundido, apresentando aplicações práticas variadas (ARAÚJO et al., 2008).

Dentre as vantagens do uso da micropropagação em espécies florestais, está a possibilidade de propagação de árvores selecionadas em todas as idades, uma alternativa em relação aos métodos clássicos de propagação vegetativa. Para o gênero *Eucalyptus*, esta

técnica tem sido utilizada com sucesso para o rejuvenescimento de clones selecionados (XAVIER et al., 2007).

Na micropropagação de clones de *Eucalyptus*, a tendência é de que a fase de enraizamento *in vitro* possa ser eliminada, e o enraizamento de brotos alongados aconteça diretamente em condições *ex vitro* (XAVIER et al., 2007). Para isso, existe a necessidade da obtenção de brotos vigorosos e com características morfológicas como comprimento, diâmetro do caule e número de pares de folhas adequados, proporcionando condições de que estes propágulos vegetativos sejam capazes de enraizar e sobreviver em condições *ex vitro*.

Estudos de manejo do alongamento da cultura englobam diversas variáveis como a concentração de fitorreguladores como a giberelina, por exemplo, que pode ser útil para induzir o alongamento da parte aérea (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998), recipientes e período de cultivo, bem como o estado líquido ou sólido do meio de cultura, que podem influenciar o crescimento e vigor do material vegetal a ser transplantado para o ambiente *ex vitro*.

Plantas enraizadas *ex vitro* possuem sistema vascular mais bem formado, completo e funcional, as raízes apresentam células corticais menos intumescidas em comparação com raízes formadas *in vitro* (HARTMANN et al., 2002; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A eliminação da etapa de enraizamento *in vitro* constitui uma alternativa para a otimização da técnica, a partir da redução do tempo de permanência da cultura em laboratório (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998), visto que os custos de laboratório somam 60% ou mais no custo total de produção da propagação *in vitro*. A automação de algumas etapas pode ser uma alternativa para viabilização desta técnica (GUPTA e TIMMIS, 2005).

Três principais alternativas têm sido aplicadas na automação da cultura de tecidos: a mecanização de procedimentos rotineiros da micropropagação, novas tecnologias baseadas em culturas líquidas e sistemas de cultivo *in vitro* alternativos (PENCHEL et al., 2007). A tecnologia de biorreatores vem sendo promissora pela redução do custo com mão-de-obra, a partir do estabelecimento de um sistema de cultivo prático que viabiliza a alta produção de plantas (TAKAYAMA e AKITA, 2006; PENCHEL et al., 2007).

Dessa maneira, em vista das aplicações da propagação vegetativa *in vitro* de eucalipto, a tecnologia de biorreatores pode contribuir como base para o processo de produção de mudas, com a geração de mudas micropropagadas para a formação dos minijardins clonais ou até mesmo, no futuro, funcionar como um próprio microjardim de laboratório, fornecendo explantes alongados (microestacas) para o enraizamento e formação das mudas *ex vitro*.

Neste estudo, avaliou-se a influência de diferentes períodos de cultivo no alongamento *in vitro* de multibrotações de um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* utilizando biorreatores de imersão temporária RITA[®] e BIT[®] (meio líquido), comparativamente ao cultivo em potes plásticos (meio semissólido).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Fonte, meio de cultura e condições de cultivo dos explantes

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia, do Centro de Pesquisa e Tecnologia - CPT da empresa Fibria (antiga Aracruz Celulose S/A), localizada no município de Aracruz, Espírito Santo.

O material vegetal utilizado para introdução nos biorreatores foi um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1), proveniente da empresa Fibria, pré-estabelecido *in vitro* em meio de cultura semissólido, tendo como recipientes de cultivo placas de Petri estéreis e descartáveis (Pleion Bioplass[®]) de 90 mm de diâmetro x 15 mm de altura. Estas continham 25 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), adicionado de 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma[®]), 10 mg L⁻¹ de tiamina-HCl (Sigma[®]), 0,50 mg L⁻¹ de ácido nicotínico (Sigma[®]), 0,50 mg L⁻¹ de piridoxina-HCl (Sigma[®]), 100 mg L⁻¹ de L-glutamina (Sigma[®]), 0,34 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina – Sigma[®]), 0,01 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético – Sigma[®]), 30 g L⁻¹ de sacarose (Vetec[®]) e 7 g L⁻¹ de bacto-ágar (BD[®]). O pH foi ajustado para 5,8 com KOH (1N) e HCl (1N) antes da adição do ágar e da esterilização em autoclave a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121°C por 15 minutos. O material vegetal foi estabelecido em prateleiras de metal aramado com iluminação vertical e lateral, acondicionado em sala de cultura a 24 ± 2°C, fotoperíodo de 14 horas e irradiância média de 20 μmol m⁻² s⁻¹, medida no aparelho Optic Science - Modelo DQM.

2.2. Meio semissólido (pote plástico) x meio líquido (RITA[®] e BIT[®])

Foram testados três tipos de recipientes, constituídos pelos sistemas de imersão temporária RITA[®] (Vitropic S/A) e BIT[®] (patente N° P10004185-8 requerida pela Embrapa), e pote plástico de polipropileno de volume 500 mL (Osmotec[®]) (Figura 1), em quatro

períodos de cultivo, 14, 21, 28 e 35 dias. Utilizou-se o meio de cultura MS com a concentração de sais à metade de sua força, contendo 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 5 mg L^{-1} de tiamina-HCl, $0,50 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido nicotínico, $0,50 \text{ mg L}^{-1}$ de piridoxina-HCl, e $2,00 \text{ mg L}^{-1}$ de glicina, $0,07 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, $0,53 \text{ mg L}^{-1}$ de AIA (ácido indol-acético - Sigma[®]), $1,04 \text{ mg L}^{-1}$ de GA₃ (ácido giberélico - Sigma[®]), 30 g L^{-1} de sacarose, no meio líquido, e 7 g L^{-1} de bacto-ágar (BD[®]) para o meio semissólido utilizado nos potes plásticos, com pH ajustado para 5,8 com KOH (1N) e HCl (1N) antes da esterilização em autoclave a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121°C por 15 minutos. O meio de cultura foi autoclavado diretamente dentro dos recipientes dos biorreatores RITA[®], e para o biorreator BIT[®] e pote plástico, a autoclavagem do recipiente e do meio foram realizadas separadamente. Os recipientes do biorreator BIT[®] foram esterilizados por lavagem com solução de hipoclorito 14% diluído a 2% de cloro ativo, e os potes plásticos através da autoclavagem a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121°C por 30 minutos.

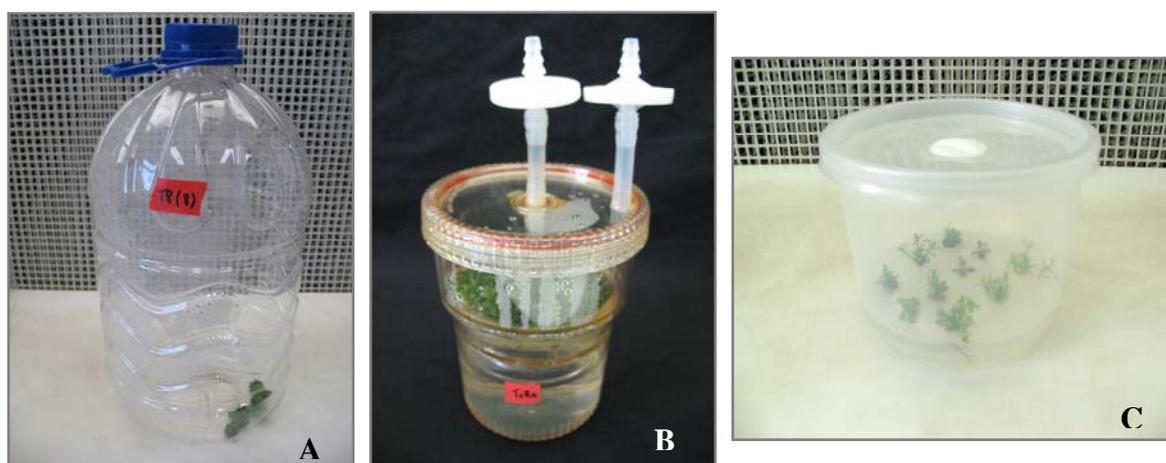


Figura 1 – Tipos de recipientes utilizados no experimento: biorreator de imersão temporária – BIT[®] (A); recipiente de imersão temporária automatizada – RITA[®] (B); e pote plástico Osmotec[®] (C).

Utilizaram-se como explantes iniciais, para introdução nos biorreatores, tufo de multibrotações, com massa fresca e tamanho uniformes, de um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1), estabelecidos *in vitro* (Figura 2).



Figura 2 - Tufos de multibrotações usados como explantes iniciais do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1) para alongamento nos biorreatores de imersão temporária RITA[®] e BIT[®] e nos potes plástico Osmotec[®].

Após introdução nos recipientes de cultivo, o material vegetal foi acondicionado em sala de cultura a $24 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 14 h e irradiância média de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (biorreatores RITA[®] e potes plásticos) e $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (biorreatores BIT[®]). Utilizou-se o volume de 250 mL de meio por recipiente, tanto para o biorreator RITA[®] como para o BIT[®], e 100 mL para o pote plástico, sendo realizada renovação do meio de cultura a cada sete dias.

Para o sistema de imersão temporária (RITA[®] e BIT[®]), utilizou-se o intervalo entre as imersões de quatro horas, por um período de oito segundos no biorreator RITA[®], e de oito horas durante um minuto no BIT[®]. Como suporte para os explantes no RITA[®], utilizou-se papel filtro qualitativo (Nº 1 - Qualy[®]).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3 x 4, constituído por três tipos de recipientes (RITA[®], BIT[®] e Pote Plástico) e quatro períodos de cultivo (14, 21, 28 e 35 dias), com dezesseis repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por um explante. Cada tratamento foi constituído por dois dos respectivos recipientes de cultivo (biorreator RITA[®], BIT[®] e pote plástico), contendo oito explantes cada.

Para avaliação da massa fresca, foi realizada a pesagem dos explantes aos 0 dias e ao final de cada período de cultivo (14, 21, 28 e 35 dias de idade da cultura). O número final de brotos foi obtido pela contagem do número de brotos em cada explante ao final de cada período de cultivo (14, 21, 28 e 35 dias de idade da cultura). A variável alongamento foi obtida por meio da classificação dos brotos em quatro diferentes classes de tamanho - 0,0-2,0; 2,1-3,0; 3,1-4,0; $>4,1$ cm - ao final de cada período de cultivo (14, 21, 28 e 35 dias de idade da cultura). O percentual de hiper-hidricidade foi obtido através da análise visual de cada explante atribuindo-se valores de 0 a 10, dependendo do nível hiper-hidricidade dos explantes, ao final de cada período de cultivo (14, 21, 28 e 35 dias de idade da cultura).

3. RESULTADOS

O biorreator BIT[®] promoveu maiores médias de ganho em massa fresca e número final de brotos nas duas primeiras idades de avaliação (14 e 21) dias, seguido pelo cultivo em ágar nos potes plásticos, sendo que estes últimos apresentaram médias superiores para estas características nas idades de 28 e 35 dias. O sistema RITA[®] proporcionou o menor ganho em massa fresca e número final de brotos em todos os períodos de cultivos avaliados (Quadro 1).

A maior parte dos brotos (>60%) foi classificada na classe de 0,0-2,0 cm, seguida pelas classes de 2,1-3,0 cm (<20%) e 3,1-4,0 cm (<10%, com exceção do cultivo em biorreator BIT[®], aos 35 dias de cultivo), em todos os tratamentos estudados. Poucos foram os explantes que apresentaram tamanho superior a 4,1 cm (Quadro 1).

Quadro 1 – Médias de ganho em massa fresca, número final de brotos e percentual de brotos em cada classe de tamanho, para todos os recipientes de cultivo estudados (RITA[®], BIT[®] e Pote Plástico), aos 14, 21, 28 e 35 dias de idade da cultura do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1).

Recipiente	Ganho MF	Nº Final Brotos	Classes de Tamanho (cm)			
			0,0-2,0	2,1-3,0	3,1-4,0	>4,1
----- 14 dias -----						
RITA [®]	0,52	24,00	90,98	9,02	0,00	0,00
BIT [®]	1,00	30,88	88,56	9,58	1,54	0,31
POTE	0,81	28,06	93,69	6,31	0,00	0,00
----- 21 dias -----						
RITA [®]	0,86	25,63	81,06	13,15	5,05	0,00
BIT [®]	1,95	36,56	80,52	17,87	1,68	0,00
POTE	1,84	44,63	89,58	7,44	2,64	0,31
----- 28 dias -----						
RITA [®]	0,90	29,38	61,35	11,02	4,44	0,00
BIT [®]	1,87	35,63	71,38	18,91	2,96	0,00
POTE	2,53	39,69	82,89	18,26	3,13	0,31
----- 35 dias -----						
RITA [®]	0,67	28,81	83,54	13,76	1,49	1,21
BIT [®]	2,90	42,06	60,51	22,01	15,40	2,08
POTE	5,12	54,00	76,64	14,74	7,73	0,88

Os brotos alongados apresentaram caule fino, poucos pares de folhas e estas com tamanho reduzido (Figura 3). A hiper-hidricidade não foi um obstáculo para o alongamento

dos brotos, não ocorrendo sintomas deste distúrbio fisiológico nas plantas nesta fase do cultivo.

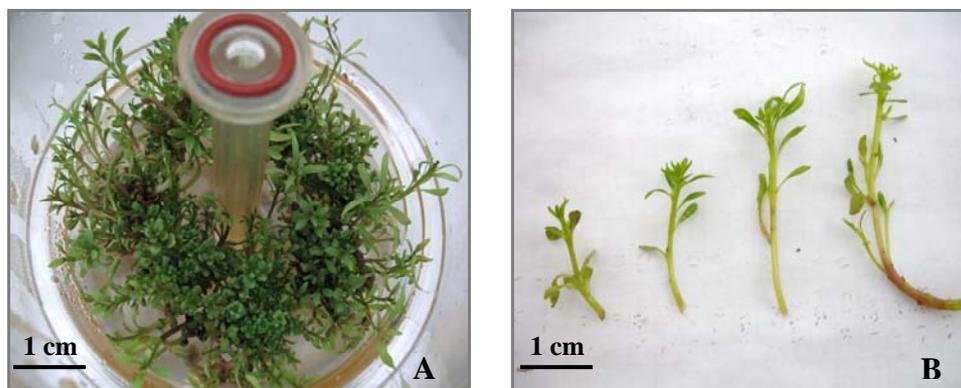


Figura 3 – Explantes alongados aos 28 dias da cultura em biorreator de imersão temporária RITA[®] (A) e diversidade no padrão de alongamento dos brotos (B) do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (C1).

4. DISCUSSÃO

As características de crescimento, ganho em massa fresca e número final de brotos, mostraram-se positivamente relacionadas, sendo que a maioria dos brotos não atingiu mais do que 2,0 cm de comprimento. Os brotos alongados apresentaram caule fino, poucas e pequenas folhas, provavelmente em decorrência da presença de GA₃ no meio de cultura. Santos et al. (2004) observaram alta mortalidade de brotações de *Eucalyptus urophylla* cultivadas em meio com GA₃. Brondani (2008) encontrou melhores resultados de alongamento de brotos em sistema ágar, utilizando o meio MS diluído à metade da composição salina, assim como utilizado neste experimento. Este mesmo autor encontrou brotações alongadas muito finas e frágeis, quando o GA₃ foi adicionado ao meio de cultura na ausência de BAP.

Deformações foliares e menor área foliar também foram relatadas por Calderon-Baltierra (1994) no alongamento de brotos de *Eucalyptus globulus* em meio de cultura contendo GA₃. Glocke et al. (2006) observaram maior comprimento dos brotos na presença de GA₃ no meio de cultura, porém não houve diferença para número de brotos na presença ou ausência deste regulador em *Eucalyptus erythronema* x *E. stricklandii*. A giberelina tem como função na planta promover o alongamento de brotos através do aumento da divisão e do alongamento celular (HARTMANN et al., 2002). Nas condições estudadas, a concentração

alta do GA₃ pode ter ocasionado o menor vigor das plantas. E algumas condições essenciais à sobrevivência *ex vitro* são plantas com parte aérea bem desenvolvida e vigorosa e caules alongados (SOUZA et al., 2006), tornando as plantas obtidas nas condições deste estudo pouco recomendadas para o transplântio *ex vitro*.

Uma das alternativas que podem aumentar a sobrevivência das plântulas é promover sua aclimatização ainda *in vitro* com mudanças nos componentes do meio de cultura e a facilitação de trocas gasosas do frasco de cultivo com o ambiente externo (CAMPOSTRINI e OTONI, 1996). Servem, ainda, como fase de pré-adaptação das plantas as condições autotróficas promovendo condições de cultivo em que a planta possa iniciar a fotossíntese, como a redução ou eliminação do açúcar e aumento da irradiância (SOUZA et al., 2006). Explantes provenientes da micropropagação apresentam baixas taxas fotossintéticas, quando comparados com mudas na casa de vegetação, sendo a taxa fotossintética altamente dependente do ambiente *in vitro* (GROUT e ASTON, 1978, citados por INOUE et al., 1998). Inoue et al. (1998) observaram que plântulas de *Eucalyptus tereticornis* cultivadas na presença de sacarose apresentaram taxa fotossintética menor do que plântulas cultivadas na ausência deste açúcar.

Em vista da importância dos fatores que influenciam o cultivo de eucalipto durante o alongamento em biorreatores para a obtenção de explantes sadio, que alcancem sucesso nas etapas de aclimatização e sobrevivência, há necessidade de mais estudos focando esta fase, a fim de garantir o desenvolvimento vigoroso das plantas *in vitro* para obtenção do máximo enraizamento e sobrevivência das plantas *ex vitro*.

5. CONCLUSÕES

O biorreator BIT[®] e o cultivo em ágar nos potes plásticos promoveram maiores médias de ganho em massa fresca e número final de brotos em todas as idades de avaliação. O sistema RITA[®] proporcionou o menor ganho em massa fresca e número final de brotos em todos os períodos de cultivos avaliados.

O alongamento dos brotos não foi satisfatório, sendo a maior parte deles (>60%) classificada na classe de tamanho de 0,0-2,0 cm.

Há necessidade de ajuste do manejo da cultura na fase de alongamento para a obtenção de brotos com maior vigor aptos a enraizar em condições *ex vitro*.

6. REFERÊNCIAS

ARAÚJO, A. G. de; COSTA, F. C.; NUNES, C. F.; BRAGA, F. T.; PASQUAL, M.; FERREIRA, K. S. BAP e GA₃ no estiolamento *in vitro* de abacaxi – IAC “gomo de mel”. In: XX Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2008, Vitória-ES, **Anais...**

BRONDANI, G. E. **Miniestaquia e micropropagação de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 2008. 118 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CALDERON-BALTIERRA, X. V. Influencia del cálcio y ácido giberélico em el alargamiento de brotes adventícios *in vitro* de *Eucalyptus globulus*. **Bosque**, n.15, v.1, p. 33-38, 1994.

CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W. C. Aclimação de plantas: abordagens recentes. In TORRES, A. C.; LACORTE, C. (Eds.). **Boletim da Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas**, 1996. n. 25.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 6. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. 770 p.

GLOCKE, P.; DELAPORTE, K.; COLLINS, G.; SEDGLEY, M. Micropropagation of juvenile tissue of *Eucalyptus erythronema* x *Eucalyptus stricklandii* cv. ‘Urrbrae Gem’. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 42, p. 139-143, 2006.

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. v. 1, p. 183-260.

GUPTA, P. K.; TIMMIS, R. Mass propagation of conifer trees in liquid cultures-progress towards commercialization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 339-346, 2005.

INOUE, M. T.; GRAÇA, M. E. C.; CORREA, G. Capacidade fotossintética de plântulas micropropagadas e de mudas de *Eucalyptus tereticornis* SM. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 36, p. 71-77, 1998.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

PENCHEL, R. M.; OTONI, W. C.; XAVIER, A. Tecnologia de biorreatores e propagação fotoautotrófica *in vitro*. In: Borém, A. (Ed.). **Biotechnology Florestal**. Viçosa: UFV, 2007. cap. 4, p. 75-92.

SANTOS, D. C. dos; WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; FRACARO, L. C. Alongamento *in vitro* de *Eucalyptus urophylla*. **Comunicado Técnico**, Embrapa – Colombo, n. 120, , 2004.

SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. P. de C.; SILVA NETO, H. P. da. Aclimação. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. (Eds.). **Introdução à micropropagação de plantas**. 1 ed. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006, v. , p. 131-140.

TAKAYAMA, S.; AKITA, M. Bioengineering aspects of bioreactor application in plant propagation. In: GUPTA, S. D.; IBARAKI, Y. **Plant tissue culture engineering**. Dordrecht: Springer. p. 83-100, 2006.

XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia Florestal**. Viçosa: Suprema, 2007. p. 55-74.

4. CONCLUSÕES GERAIS

Com base nas condições estudadas para os clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* conclui-se que:

Na fase de multiplicação, os resultados dos experimentos individuais demonstraram que o meio de cultura MS, a combinação 1,0 μM de BAP com 0,5 μM de ANA, a relação 3:1 de $\text{N}(\text{NO}_3^-):\text{N}(\text{NH}_4^+)$, os menores intervalos entre as imersões (2 e 4 horas) e o suporte papel filtro promoveram maior massa fresca e número de brotos por explante, sendo o cultivo em biorreator RITA[®] superior ao ágar para estas características. E a injeção adicional de ar ao recipiente do biorreator RITA[®] não influenciou o desenvolvimento das culturas. No geral, as culturas apresentaram alto percentual de hiper-hidricidade, sendo esta desordem um fator limitante nas condições deste estudo para o cultivo de *Eucalyptus* em biorreatores, não sendo percebida nas plantas cultivadas em meio semissólido.

No alongamento, o biorreator BIT[®] e o cultivo em ágar nos potes plásticos promoveram maiores ganhos em massa fresca e número final de brotos, porém o alongamento não foi satisfatório, sendo a maior parte dos brotos (>60%) classificada na classe de tamanho de 0,0-2,0 cm.

De maneira geral, o cultivo de *Eucalyptus* em biorreatores de imersão temporária mostrou-se promissor, no entanto, há necessidade de ajuste do manejo da cultura nas fases de multiplicação e alongamento para a obtenção de brotos com maior vigor aptos a enraizar em condições *ex vitro*, a fim de que esta técnica possa se tornar viável em larga escala.