

Pré-aclimatização e aclimatização em cultivo hidropônico de plantas micropropagadas de *Eucalyptus saligna* Sm.

Pre-acclimatization and hydroponic acclimatization of micropropagated plants of Eucalyptus saligna Sm.

André Luís Lopes da Silva^[a], Yohana de Oliveira^[b], Jefferson da Luz Costa^[c], Gessiel Newton Scheidt^[d], Dayse Cristina de Carvalho^[e], José Darcy dos Santos^[f], Edson Perez Guerra^[g]

^[a] Biólogo, Doutorando em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR - Brasil, e-mail: clonageinvitro@yahoo.com.br

^[b] Engenheira agrônoma, Doutoranda em Agronomia (Produção Vegetal), Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR - Brasil, e-mail: yoyohana@hotmail.com

^[c] Engenheiro agrônomo, Mestrando em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR - Brasil, e-mail: jeff.biotec@gmail.com

^[d] Docente da Universidade Federal do Tocantins (UFT), Gurupi, TO - Brasil, e-mail: gessielscheidt@yahoo.com.br

^[e] Engenheira agrônoma, Pós-Doutoranda em Agronomia, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR - Brasil, e-mail: daysecristy@yahoo.com.br

^[f] Engenheiro agrônomo, Doutorando em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR - Brasil, e-mail: darcy@itaway.com.br

^[g] Docente da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, PR - Brasil, e-mail: e.guerra@pucpr.br

Resumo

A aclimatização é a fase mais crítica da micropropagação em razão de vários fatores que podem impactar a sobrevivência das plantas. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de pré-aclimatização seguido de aclimatização em hidroponia para plantas micropropagadas de *Eucalyptus saligna*. A pré-aclimatização consistiu nos tratamentos: 1) controle (frascos cobertos com tampas de polipropileno rígido); 2) frascos cobertos com filme de PVC contendo 10 furos (4 mm²/furo); e 3) frascos de cultura totalmente descobertos. Foram adicionados 10 mL de água destilada e autoclavada nos frascos dos tratamentos 2 e 3. Após 72h as plantas foram cultivadas em areia grossa em bandeja de polietileno expandido, que flutuava sobre a solução nutritiva constituída do meio de cultura MS modificado líquido (sais com ½ e FeEDTA com ¼ da concentração original e sem os constituintes orgânicos) dentro de uma bacia de plástico. As bacias do cultivo hidropônico permaneceram em sala de crescimento por cinco dias e em seguida foram transferidas para a casa de vegetação. O cultivo hidropônico teve duração de 14 dias e as plantas foram então transferidas para substrato Plantmax[®] HT. Ao fim da hidroponia foi observado que a sobrevivência das mudas do tratamento 3 atingiu 90%, sendo significativamente superior ao 1 e 2, com 40% e 60%, respectivamente. Após 14 dias de cultivo em Plantmax[®] HT não houve variações no percentual de sobrevivência das plantas.



A pré-aclimatização realizada com os frascos descobertos seguidos de 14 dias em hidroponia permite uma eficiente aclimatização de plantas micropropagadas de *E. saligna*.

Palavras-chave: Espécie lenhosa. Hidroponia. Micropropagação. Produção de mudas.

Abstract

Acclimatization is the most difficult stage of the micropropagation process due to several factors that can affect plant survival. The aim of this work was to develop a protocol for acclimatization of Eucalyptus saligna in hydroponics following a pre-acclimatization stage. The pre-acclimatization consisted of the treatments: 1) control (flasks covered with rigid polypropylene caps); 2) flasks covered with PVC film perforated with 10 holes (4 mm²/hole); and 3) uncapped culture flasks. Ten mL of distilled autoclaved water were added into the flasks of treatments 2 and 3. After 72 hours, plants were cultivated in thick sand in an expanded polyethylene tray floating on a nutritive solution consisting of modified liquid MS medium (salts and FeEDTA with one-half and one-quarter of the original concentration, respectively, and without organic constituents) inside a plastic tray. Trays containing the hydroponic culture were placed in a growth room for 5 days and then transferred to a greenhouse. Hydroponic culture lasted 14 days, then the plants were transferred to Plantmax™ HT substrate. At the end of the hydroponic cultivation the survival rate of the plants under treatment 3 reached 90%, which was significantly higher than the rates observed for treatments 1 and 2, with 40% and 60%, respectively. After 14 days of culture in Plantmax™ HT substrate, there was no variation in plant survival. Pre-acclimatization in uncapped flasks followed by 14 days of hydroponic cultivation allows an efficient acclimatization of micropropagated plants of E. saligna.

Keywords: Hydroponics. Micropropagation. Seedling production. Woody species.

Introdução

A espécie *Eucalyptus saligna* é natural da Austrália, onde ocupa uma faixa costeira extensa. Ocorre desde o nível do mar até 1.000 m de altitude, em clima temperado ao sul e subtropical ao norte (GONZAGA, 1983). Essa espécie pertence à seção Transversaria, que também engloba as espécies *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus grandis* (PRYOR, 1976). Ela é muito utilizada para a produção de moirões, dormentes, madeira serrada e celulose para a fabricação de papel (FERREIRA et al., 1997).

A propagação *in vitro* tem demonstrado grandes vantagens em relação às técnicas convencionais de produção de mudas, como redução do tempo, espaço e custos, além de permitir a obtenção de grande número de plantas geneticamente homogêneas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1999). Entretanto, o maior problema que restringe o amplo uso comercial da micropropagação é a baixa taxa de sobrevivência das mudas durante a aclimatização *ex vitro*, que é resultante de uma alta perda de água pela transpiração (DÍAZ-PÉREZ et al., 1995).

A água perdida pela planta por evapotranspiração pode ser repostada diretamente pela solução nutritiva em um cultivo hidropônico (SILVA et al., 2007). Desse modo, o uso da hidroponia poderá elevar as taxas de sobrevivência e diminuir o tempo de aclimatização das mudas. Por exemplo, a aclimatização convencional de plantas micropropagadas de *Dyckia maritima* (Bromeliaceae) já foi estabelecida com sucesso, contudo esse processo é relativamente demorado, necessitando de 120 dias para conclusão dessa fase (SILVA et al., 2006a), enquanto 15 dias são suficientes quando se realiza a aclimatização com o uso da hidroponia (SILVA et al., 2007).

Comparando os processos de aclimatização convencional e hidropônico em *Colocasia esculenta* (L.) Schott. (Araceae), foi constatado que o processo hidropônico foi superior ao convencional, apresentando, após 30 dias de cultivo, maior taxa de sobrevivência, maior número de folhas e altura das plantas (NHUT et al., 2004). Um breve cultivo hidropônico durante a aclimatização de *Cattleya tigrina* A. Rich. Ex Beer (Orchidaceae) permitiu aumento de 40% na taxa de sobrevivência das mudas em comparação ao

processo não hidropônico (SILVA et al., 2006b). Por essas razões, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de aclimatização em hidroponia para plantas micropropagadas de *E. saligna*, além de estudar os efeitos de uma prévia pré-aclimatização.

Materiais e métodos

Pré-aclimatização

Plantas micropropagadas de *E. saligna* com 3 cm de altura, obtidas a partir de explantes cotiledonares e micropropagadas conforme o protocolo estabelecido por Dibax (2007) foram utilizadas nos experimentos.

Frascos de cultivo com 5 cm de diâmetro e 8,5 cm de altura foram utilizados. As plantas foram cultivadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com redução de 50% da concentração dos sais, adicionando-se 30 g L⁻¹ de sacarose, 2,5 g L⁻¹ de carvão ativado e solidificado com 7 g L⁻¹ de Agar (Vetec®). O pH foi ajustado para 5,8. A pré-aclimatização consistiu nos tratamentos: 1) controle (frascos cobertos com tampas de polipropileno rígido); 2) frascos cobertos com filme de PVC (polivinilcloreto) contendo 10 furos (4 mm² cada furo); e 3) frascos de cultura totalmente descobertos. Quando os frascos foram abertos foram adicionados 10 mL de água destilada e autoclavada nos frascos dos tratamentos 2 e 3. Após 48h foram adicionados mais 5 mL de água destilada e autoclavada no tratamento 3. Cada frasco continha três plântulas. A pré-aclimatização teve duração de 72h. As plantas cultivadas antes e durante os tratamentos de pré-aclimatização permaneceram em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa de 30 ± 5% e fotoperíodo de 16h, sob intensidade luminosa de 30 μM m⁻² s⁻¹ obtida de lâmpadas fluorescentes brancas. A perda de água (mL) do meio de cultura e das plantas contidas nos frascos foi quantificada 24h, 48h e 72h após a instalação dos tratamentos de pré-aclimatização. A quantificação do teor de água foi realizada considerando as massas iniciais e finais dos frascos de cultivo.

Aclimatização *ex vitro* em hidroponia

As plantas foram retiradas das condições *in vitro* após os tratamentos de pré-aclimatização e suas

raízes foram lavadas com água corrente para remoção dos resíduos do meio de cultura. As plantas foram cultivadas em areia grossa (≥ 1 mm) contida nos alvéolos de uma bandeja de isopor. Essa bandeja flutuava sobre uma solução constituída pelos sais do meio MS reduzidos à metade de suas concentrações originais e o ferro a um quarto de sua concentração original. As vitaminas e o mio-inositol não foram adicionados. Essa solução ficou contida no interior de uma bacia de plástico e o pH foi ajustado em 5,8 a cada três dias, juntamente com o nível da solução que foi completado para um litro com água destilada. Foram usados 80 mL de solução para cada planta. Durante os cinco primeiros dias as bandejas permaneceram na sala de crescimento, após esse período foram transferidas para casa de vegetação por nove dias, totalizando 14 dias de cultivo em hidroponia. Após o cultivo hidropônico, as plantas foram cultivadas em substrato Plantmax® HT contido em tubetes de polipropileno (40 mm de diâmetro e 125 mm de altura e preenchidos com 50 cm³ de substrato) e irrigadas diariamente. A massa fresca das plantas (g), o número médio de raízes, a altura da parte aérea (cm) e a sobrevivência das mudas (%) foram avaliadas após 14 dias de cultivo hidropônico e após 14 dias de cultivo em substrato (28º dia).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com três tratamentos e cinco repetições de cinco plantas. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de comparação múltipla de médias de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os dados oriundos de porcentagem foram transformados para $\arcsen \sqrt{x/100}$ e os de contagem para $\sqrt{x + 0,5}$. Os dados foram processados com auxílio do programa computacional GENES (CRUZ, 2001).

Resultados e discussão

A perda de água pelas plantas e pelo meio de cultura variou entre os tratamentos (Tabela 1), entretanto a perda de água do tratamento controle (vedado com tampa de polipropileno) foi considerada insignificante. A perda de água das plantas e dos substratos (evapotranspiração) foi de 0,84 mL e 5,34 mL por dia nos frascos cobertos com filme PVC e descobertos, respectivamente. A informação a respeito da perda de água dos frascos de cultivo é de

extrema relevância para o sucesso da pré-aclimatização com base na transpiração das plantas, simplesmente por predizer a quantidade de água que deverá ser adicionada aos frascos para evitar a desidratação da planta e do meio de cultivo.

A remoção da tampa do frasco sem adição de água resultou na desidratação das plantas e do meio de cultura em 24 h, o que conseqüentemente impediu a sobrevivência das plantas (dados não apresentados). Entretanto, a remoção da tampa dos frascos com adição de água manteve as plantas e o meio de cultura hidratados, o que permitiu que essas plantas se mantivessem visualmente inalteradas. A perda de água favorecida pela remoção da tampa do frasco foi de 5,34 mL por dia, sendo 6,3 vezes mais que a observada no tratamento com filme PVC contendo 10 furos (Tabela 1).

Durante os três primeiros dias de cultivo hidropônico, observou-se que algumas plantas já estavam em processo de reidratação, pois apresentaram folhas dos ápices sem murchar enquanto as demais folhas estavam murchas. No quinto dia observou-se que essas plantas estavam em processo de reidratação, queima e secamento das extremidades distais das folhas do ápice, possivelmente pelo excesso de umidade do substrato. Aos 12 dias a solução nutritiva apresentou coloração esverdeada, possivelmente pelo desenvolvimento de algas, o que promoveu

alteração do pH para um valor próximo a 5,0. Os tratamentos de pré-aclimatização indicam que a maior evapotranspiração em condições *in vitro* favorece o percentual de sobrevivência das plantas (Tabela 2), como encontrado nos frascos sem tampa. No final do cultivo hidropônico esse tratamento possibilitou 90% de sobrevivência das plantas, sendo significativamente superior ao tratamento com filme PVC com 60% seguido pelo tratamento com tampa com 40%.

Tabela 1 - Efeitos do tipo do fechamento do frasco na perda de água de plantas de *Eucalyptus saligna* cultivadas *in vitro* e do meio de cultura em função do tempo (horas)

Tipo de tampa ¹	24 h	48 h	72 h	Perda diária
Filme de PVC com 10 furos	0,83 mL	1,70 mL	2,53 mL	0,84 mL
Sem tampa	5,40 mL	10,73 mL	15,83 mL	5,34 mL

Legenda: ¹ = Frascos de cultura mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 °C ± 2, umidade relativa de 30 ± 5% e fotoperíodo de 16 horas, sob lâmpadas fluorescentes brancas com intensidade luminosa de 30 mM m⁻² s⁻².

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 2 - Características de plantas micropropagadas de *Eucalyptus saligna* aclimatizadas *in vitro* por três dias, cultivadas em hidroponia por 14 dias e em substrato Plantmax® HT por 14 dias

Característica	Frascos com tampa	Frascos com 10 furos	Frascos sem tampa	CV (%)
Sobrevivência (%)	40,0 c ¹	60,0 b	90,0 a	22,1
Massa fresca (g)	0,15 c	0,21 b	0,25 a	6,7
Altura da PA (cm)	3,40 a	3,70 a	3,40 a	5,7
Número de raízes	5,22 b	7,22 ab	7,75 a	19,3
<i>Aos 14 dias de cultivo em substrato Plantmax® HT</i>				
Característica	Frascos com tampa	Frascos com 10 furos	Frascos sem tampa	CV (%)
Sobrevivência (%)	40,0 c ¹	60,0 b	90,0 a	22,1
Massa fresca (g)	0,30 b	0,35 b	0,45 a	10,8
Altura da PA (cm)	4,20a	4,20 a	4,20 a	5,6
Número de raízes	6,67 b	10,3 a	8,15 ab	7,4

Legenda: ¹ = Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Fonte: Dados da pesquisa.

Apenas o cultivo hidropônico de 14 dias das plantas sem pré-aclimatização (controle) não foi eficiente para a aclimatização de *E. saligna*, pois promoveu apenas 40% de sobrevivência das mudas, porém em bromélias da espécie *Dyckia maritima* foram observadas taxas de 80% de sobrevivência em 15 dias de cultivo hidropônico (SILVA et al., 2007). No entanto, a dificuldade que o *E. saligna* apresentou nessas condições pode ser em função de que suas folhas são muito tenras se comparadas com as folhas carnosas de *D. maritima*. Além disso, plantas do gênero *Dyckia* apresentam metabolismo CAM (CRAYN et al., 2004), o qual é uma estratégia eficiente contra a desidratação.

A altura da parte aérea não apresentou diferenças significativas. O maior número de raízes foi obtido nas plantas pré-aclimatizadas em frascos sem tampa, porém sem diferenças significativas em relação aos frascos cobertos com PVC (Tabela 2). O maior número de raízes observado para esse tratamento, ao final do cultivo hidropônico, pode também ter favorecido maior ganho de massa fresca em função de permitir maior absorção de nutrientes da solução.

A massa fresca das plantas pré-aclimatizadas em frascos sem tampa foi quase o dobro da obtida nos frascos com tampa, 0,25 g e 0,15 g, respectivamente (Tabela 2). A maior perda de água observada nesse tratamento pode ter favorecido maior translocação nos tecidos durante as condições *ex vitro*, além de ter favorecido maior acumulação de cera epicuticular e o funcionamento normal dos estômatos (HAZARIKA, 2003).

A taxa de sobrevivência das plantas após 14 dias de cultivo em substrato Plantmax® HT não foi alterada, indicando que as plantas já estavam aclimatizadas no fim do período hidropônico. Entretanto, a massa fresca permaneceu significativamente superior nas plantas pré-aclimatizadas em frascos sem tampa. A altura da parte aérea também não demonstrou diferenças significativas entre os tratamentos durante esse período e o número de raízes apresentou valores semelhantes aos encontrados no cultivo hidropônico (Tabela 2).

Apesar da espécie *E. saligna* não tolerar excesso de umidade, esses resultados são bastante interessantes, pois o excesso de umidade normalmente reduz o crescimento da planta, causando anaerobiose, o que leva ao encarquilhamento, clorose, geotropismo negativo das raízes, queima e secamento do ápice (ALFENAS et al., 2004). O sistema hidropônico usado

nesse trabalho não possui sistema de aeração da solução, conseqüentemente o uso de areia com granulometria superior a que foi usada nesse experimento poderia permitir maior taxa de sobrevivência das mudas, graças ao fato de permitir maior aeração. Durante a aclimatização em hidroponia de *Dyckia maritima* foi observado que o substrato influencia a taxa de sobrevivência das mudas e que substratos que permitem maior aeração promovem maiores índices de sobrevivência (SILVA et al., 2007).

A pré-aclimatização em frascos sem tampa possibilitou maior rustificação nas mudas, o que refletiu na sobrevivência *ex vitro* e no ganho de massa fresca (Tabela 2). Processos de pré-aclimatização que permitam desenvolver mudas mais adaptadas para condições *ex vitro* são extremamente importantes, em razão de que diferentes clones de uma mesma espécie apresentam taxas diferentes de sobrevivência durante a aclimatização (ROGALSKI et al., 2003). Essas diferenças entre clones podem resultar em diferentes taxas de sobrevivência das mudas em um mesmo protocolo de aclimatização. Contudo, processos de pré-aclimatização podem elevar as taxas de sobrevivência para clones que apresentam dificuldade de serem aclimatizados.

Conclusões

A aclimatização *ex vitro* realizada somente por meio da hidroponia não é suficiente para promover altas taxas de sobrevivência de plantas de *Eucalyptus saligna*, porém se torna bastante eficiente quando combinada com uma prévia pré-aclimatização feita por meio da remoção da tampa do frasco por três dias e com adição de água.

Agradecimentos

Agradecemos imensamente à professora Dra. Marguerite Quoirir, por ter cedido o laboratório para a realização desta pesquisa.

Referências

ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, MG: UFV; Imprensa Universitária, 2004.

- CRAYN, D. M.; WINTER, K.; SMITH, J. A. C. Multiple origins of crassulacean acid metabolism and epiphytic habit in the Neotropical family Bromeliaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 10, p. 3703-3708, 2004.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes**: versão Windows: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG: UFV; Imprensa Universitária, 2001.
- DÍAZ-PÉREZ, J. C.; SUTTER, E. G.; SHACKEL, K. A. Acclimatization and subsequent gas exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. **Physiologia Plantarum**, v. 95, n. 2, p. 225-232, 1995.
- DIBAX, R. **Transformação e expressão do gene PCSF 129-A em Eucalyptus saligna**. 2007. 113 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- FERREIRA, G. W. et al. Qualidade da celulose kraft-antraquinona de Eucalyptus dunnii plantado em cinco espaçamentos em relação ao Eucalyptus grandis e Eucalyptus saligna. **Ciência Florestal**, v. 7, n. 1, p. 41-63, 1997.
- GONZAGA, J. V. **Qualidade da madeira e da celulose kraft de treze espécies de Eucalyptus**. 1983. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1983.
- GRATTAPAGLIA, D. E.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPq, 1999. p. 183-260.
- HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, v. 85, p. 1704-1712, 2003.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NHUT, D. T.; HUONG, N. T. D.; VAN KHIEM, D. Direct micro-tuber formation and enhanced growth in the acclimatization of in vitro plantlets of taro (*Colocasia esculenta* spp.) using hydroponics. **Scientia Horticulturae**, v. 101, p. 207-212, 2004.
- PRYOR, L. D. **The biology of Eucalyptus**. London: Edward Arnold, 1976.
- ROGALSKI, M. et al. Aclimatização de porta-enxertos de Prunus sp. micropropagados. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 2, p. 279-281, 2003.
- SILVA, A. L. L. da et al. Aclimatização de clones de Dyckia maritima Baker em diferentes substratos – Bromeliaceae. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 12, n. 4, p. 495-498, 2006a.
- SILVA, A. L. L. da et al. Aclimatização de mudas de Cattleya tigrina A. Rich. Ex Beer (Orchidaceae) em sistema hidropônico. **Caderno de Pesquisa Série Biologia**, v. 18, n. 1, p. 129-139, 2006b.
- SILVA, A. L. L. da et al. Aclimatização de Dyckia maritima Baker em hidroponia (Bromeliaceae). **Caderno de Pesquisa Série Biologia**, v. 19, n. 3, p. 16-23, 2007.

Recebido: 29/06/2010
Received: 06/29/2010

Aprovado: 24/08/2011
Approved: 08/24/2011