

**EFEITO DO INTERVALO DE IMERSÃO E DE INJEÇÃO DE AR NA MULTIPLICAÇÃO  
IN VITRO DE *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* EM BIORREATOR DE IMERSÃO  
TEMPORÁRIA**EFFECT OF FREQUENCY OF IMMERSION AND AIR INJECTION ON *IN VITRO*  
MULTIPLICATION OF *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* IN TEMPORARY IMMERSION  
BIOREACTORMila Liparize de Oliveira<sup>1</sup> Aloisio Xavier<sup>2</sup> Ricardo Miguel Penchel Filho<sup>3</sup> Jocemar Palauro dos Reis<sup>4</sup>**RESUMO**

Os objetivos do presente estudo foram avaliar diferentes intervalos de imersão (2, 4, 8 e 16 horas) e suportes de apoio (papel-filtro e espuma) dos explantes de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* dentro dos recipientes de imersão temporária automatizada (RITA<sup>®</sup>), assim como um sistema de ventilação com entrada de ar acoplado ao recipiente dos biorreatores. Foram avaliadas as características: massa fresca, número de brotos e hiper-hidricidade dos explantes, na fase de multiplicação de gemas axilares. As imersões a cada duas e quatro horas e o suporte papel-filtro proporcionaram maior crescimento e multiplicação dos explantes, porém, ocasionaram maior percentual de brotos hiper-hídricos. No sistema e nas condições testadas, a injeção de ar ao recipiente do biorreator RITA<sup>®</sup> não influenciou o crescimento das culturas.

**Palavras-chave:** Propagação *in vitro*; clonagem; atmosfera gasosa; hiper-hidricidade.

**ABSTRACT**

The objectives of this study were to evaluate different immersion frequencies (2, 4, 8 and 16 h) and explants supports (filter paper and foam) of a *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* clone inside RITA<sup>®</sup> bioreactors; and a ventilation system with additional air input coupled to the bioreactor containers. It was evaluated the explants fresh weight, number of shoots and hyperhydricity and *in vitro* axillary bud multiplication. The immersions every two and four hours and the filter paper showed higher growth and number of shoots, but caused a greater percentage of hyperhydric shoots. Under the conditions and system tested, the additional air injection in the RITA<sup>®</sup> bioreactor did not influence the culture growth.

**Keywords:** *In vitro* propagation; cloning; gaseous atmosphere; hyperhydricity.

**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 mais acessível comercialmente, principalmente, com o desenvolvimento de equipamentos como os biorreatores que permitem 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).

1 Engenheira Florestal, Msc., Líder Técnica de Pesquisa da Empresa Fibria Celulose S/A, Rod. Euryale de Jesus Zerbine, s/n, Km 84, CEP 12340-010, Jacareí (SP), Brasil. [mila.liparize@fibria.com.br](mailto:mila.liparize@fibria.com.br)

2 Engenheiro Florestal, Dr., Professor Adjunto do Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Av. Ph. Rolfs, s/n, CEP 36571-000, Viçosa (MG), Brasil. [xavier@ufv.br](mailto:xavier@ufv.br)

3 Engenheiro Agrônomo, PhD., Pesquisador Sênior da Empresa Fibria Celulose S/A, Empresa Fibria Celulose S/A, Rod. Euryale de Jesus Zerbine, s/n, Km 84, CEP 12340-010, Jacareí (SP), Brasil. [rp@fibria.com.br](mailto:rp@fibria.com.br)

4 Biólogo, Técnico de Pesquisa de Laboratório da Empresa Fibria Celulose S/A, Empresa Fibria Celulose S/A, Rod. Euryale de Jesus Zerbine, s/n, Km 84, CEP 12340-010, Jacareí (SP), Brasil. [jpdreis@fibria.com.br](mailto:jpdreis@fibria.com.br)

Recebido para publicação em 28/01/2010 e aceito em 28/11/2012

Muitos fatores interferem na micropropagação de plantas, principalmente no que se refere ao uso de biorreatores e ao uso de meio de cultura líquido. Entre estes, as condições do cultivo *in vitro* como 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, pois afeta a multiplicação de gemas, o vigor da cultura e também impossibilita a aclimatização das plantas nas condições *ex vitro*. A hiper-hidricidade, também denominada vitrificação, é morfologicamente caracterizada por brotos alongados e espessos em diâmetro, entrenós mais curtos do que as plantas normais, folhas espessadas, frequentemente alongadas, enrugadas ou enroladas e quebradiças, com aspecto vítreo (GASPAR, 1991; ZIV, 1991). É considerado 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 paliádico, 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., 1997).

O manejo da cultura, como a determinação do intervalo 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 plantas (ETIENNE e BERTHOULY, 2002). Alguns estudos focaram o manejo dos intervalos e a duração da imersão em espécies do gênero *Eucalyptus* spp. (Myrtaceae) (CASTRO e GONZÁLEZ, 2002; McALISTER et al., 2005), em *Heliconia champneiana* (Heliconiaceae) (RODRIGUES et al., 2006), *Musa sapientum* (Musaceae) (banana cv. Terra) (LEMOS et al., 2001) e *Ananas comosus*

(Bromeliaceae) (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 na remoção do etileno, CO<sub>2</sub> e outros componentes voláteis acumulados nos frascos de cultivo para obtenção de brotações não hiper-hídricas. Gaspar (1991) cita diversos fatores como indutores da hiper-hidricidade, entre eles a atmosfera do frasco 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 *Malus* sp. (Rosaceae) (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 intervalo de imersão e suportes de apoio dos explantes dentro de biorreatores RITA<sup>®</sup>, assim como um sistema de ventilação com entrada de ar adicional acoplado ao recipiente do biorreator, quanto ao desenvolvimento dos explantes e ocorrência de vitrificação, na fase de multiplicação de gemas axilares de um clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Fonte, meio de cultura e condições de cultivo dos explantes

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia, do Centro de Tecnologia, da Fibria Celulose S.A. (ex-Aracruz Celulose), localizada no município de Aracruz, Espírito Santo.

O material vegetal utilizado para introdução nos biorreatores foi um clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* da Fibria, pré-es-

tabelecido *in vitro* em meio de cultura semissólido, cultivado em placas de Petri estéreis e descartáveis (Pleion Bioplasm<sup>®</sup>) de 90 mm (D) x 15 mm (H). Estas continham 25 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) modificado, contendo 100 mg L<sup>-1</sup> de mioinositol (Sigma<sup>®</sup>), 10 mg L<sup>-1</sup> de tiamina-HCl (Sigma<sup>®</sup>), 0,50 mg L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico (Sigma<sup>®</sup>), 0,50 mg L<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl (Sigma<sup>®</sup>), 100 mg L<sup>-1</sup> de L-glutamina (Sigma<sup>®</sup>), 1,5 µM L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina (Sigma<sup>®</sup>), 0,05 µM L<sup>-1</sup> de ANA (ácido naftalenoacético (Sigma<sup>®</sup>), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Vetec<sup>®</sup>) e 7 g L<sup>-1</sup> de bactoágar (BD<sup>®</sup>). 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 PAR média de 20 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, medida no aparelho Optic Science - Modelo DQM.

### Intervalos 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 8 segundos, e dois sistemas de suporte de apoio para os explantes, somente papel-filtro qualitativo (Nº 1 - Qualy<sup>®</sup>) e o uso de disco de esponja polimérica (Bulpren S 28133, densidade 30 Kg m<sup>-3</sup>) sob o papel-filtro, em biorreator RITA<sup>®</sup> (Vitropic S.A.).

Como explantes iniciais foram utilizados brotos apicais estabelecidos *in vitro*, com massa fresca e tamanho uniformes. Os explantes foram pré-cultivados por, aproximadamente, sete dias antes de sua utilização nos biorreatores RITA<sup>®</sup> para experimentação, permanecendo em placas de Petri contendo meio MS como descrito no experimento anterior, sem adição de reguladores de crescimento.

O meio de cultura utilizado foi o MS descrito acima sem adição de glutamina, ANA e bactoágar, com 0,5 µM L<sup>-1</sup> de BAP. 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 PAR média de 20 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

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<sup>®</sup> contendo oito explantes.

Para avaliação de massa fresca (MF), foi realizada pesagem dos explantes aos 0, 21 e 28 dias de idade da cultura. O número de brotos (NB) 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 (BH) em cada explante aos 0, 21 e 28 dias de idade da cultura.

### Injeção de ar aos recipientes

Este experimento avaliou a influência da injeção de ar no compartimento superior do recipiente do biorreator RITA<sup>®</sup>, através do filtro de saída original de ar, possibilitada pela criação de uma saída alternativa de ar na tampa do frasco. O volume de ar adicionado foi de 0,8 L min<sup>-1</sup>, medido por meio do aparelho rotâmetro, e o fluxo controlado automaticamente em intervalos de quatro horas com duração de um minuto.

Foram utilizados brotos apicais, com massa fresca e tamanho uniformes, como explantes iniciais. Estes foram pré-cultivados por, 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 foi o MS modificado descrito acima sem adição de glutamina, ANA e bactoágar, com 0,5 µM L<sup>-1</sup> de BAP. 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 PAR média de 20 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Foi realizada renovação do meio de cultura aos 21 dias de idade da cultura. O manejo de imersão utilizado foi de 2 horas, por um período de 8 segundos. Como suporte de apoio para os explantes, utilizou-se papel-filtro qualitativo (Nº 1 - Qualy<sup>®</sup>). A umidade relativa e a temperatura, dentro dos recipientes dos biorreatores RITA<sup>®</sup>, foram medidas e registradas

por meio de termo-higrômetro modelo HOBO®, da marca Onset Computer.

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

Para avaliação de massa fresca (MF), 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 (NB) 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 (BH) em cada explante aos 0, 7, 21 e 28 dias de idade da cultura.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Intervalos de imersão e suportes de apoio dos explantes

As características massa fresca e número de brotos (Figura 1) apresentaram diferença significativa ( $P < 0,05$ ) para os fatores intervalo de imersão e suporte, não havendo interação significativa entre os dois fatores, nas duas idades de avaliação (21 e 28 dias). Os intervalos de 2 e 4 horas foram su-

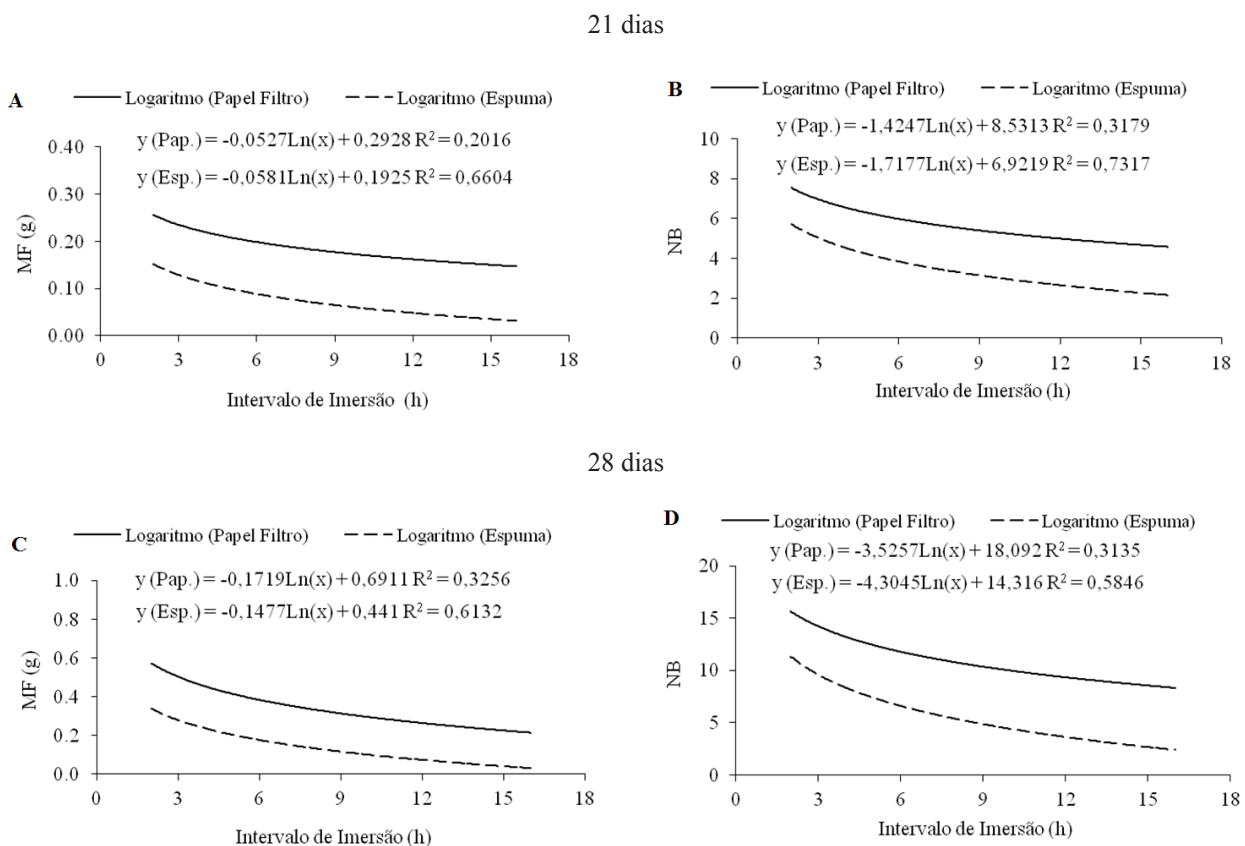


FIGURA 1: Curvas de tendência para massa fresca (MF) e número de brotos (NB) aos 21 (A e B) e 28 dias (C e D), para dois suportes de apoio dos explantes (papel-filtro e espuma), em quatro intervalos de imersão (2, 4, 8 e 12 h), em biorreatores de imersão temporária RITA®, em cultura clonal de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*.

FIGURE 1: Tendency curves for fresh weight (MF) and number of shoots (NB) at 21 (A and B) and 28 days (C and D) for two explant supports (filter paper and foam), at four immersion intervals (2, 4, 8 and 12 h) in RITA® temporary immersion bioreactors for clonal culture of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*.



periores aos demais apresentando média geral (para os dois tipos de suportes) de massa fresca de 0,22 g e 0,16 g aos 21 dias e de 0,49 g e 0,31 g aos 28 dias, respectivamente. O número de brotos foi de 6,95 e 5,27 aos 21 dias e 14,37 e 9,85 aos 28 dias, respectivamente. Os intervalos de 8 e 16 horas promoveram menor crescimento dos explantes, com médias iguais em massa fresca 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 número de brotos, foram obtidas médias de 4,08 e 3,72 aos 21 dias, e de 7,29 e 6,17 aos 28 dias, respectivamente.

Para o fator suporte de apoio dos explantes (Figura 1), o papel-filtro apresentou-se superior ( $P < 0,05$ ) nas duas idades avaliadas em relação à espuma, com médias de massa fresca 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. O papel-filtro também foi 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.

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 (Figura 2). Assim como observado neste trabalho, McAlister et al. (2005) obtiveram a maior taxa de multiplicação de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* e de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus nitens* em biorreator RITA<sup>®</sup> no menor intervalo

testado (10 minutos com duração de 30 segundos). Alta incidência de explantes hiper-hídricos foi também observada no trabalho de Reis et al. (2003), em que foram obtidos incrementos de 8 vezes na massa fresca e 2,5 vezes no comprimento dos brotos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* cultivados em biorreator RITA<sup>®</sup> sob manejo de imersão de 2 horas. Ao contrário dos resultados do presente estudo, Castro e González (2002) consideraram como melhor tratamento em termos de taxa de multiplicação dos explantes de *Eucalyptus grandis* um dos maiores intervalos de imersão estudados (12 horas com duração de 3 minutos) em comparação com os menores intervalos (3 e 6 horas).

Comparando os tratamentos de manejo de imersão do cultivo em biorreator com o cultivo convencional em meio semissólido em jarras de vidro, observou-se ganho de 2,5 vezes em massa fresca dos explantes cultivados no sistema de imersão a cada 2 horas, sendo o crescimento dos explantes no meio solidificado com ágar semelhante ao obtido em biorreator com intervalo de 8 e 16 horas, nas duas idades avaliadas. Em híbridos de *Eucalyptus globulus*, Correia (2009) observou maior incremento em massa fresca e multiplicação usando biorreatores RITA<sup>®</sup> com manejo de imersão de 10 segundos a cada 3 horas. Na micropropagação de *Heliconia champneiana*, os menores intervalos entre as imersões de 15 min (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,

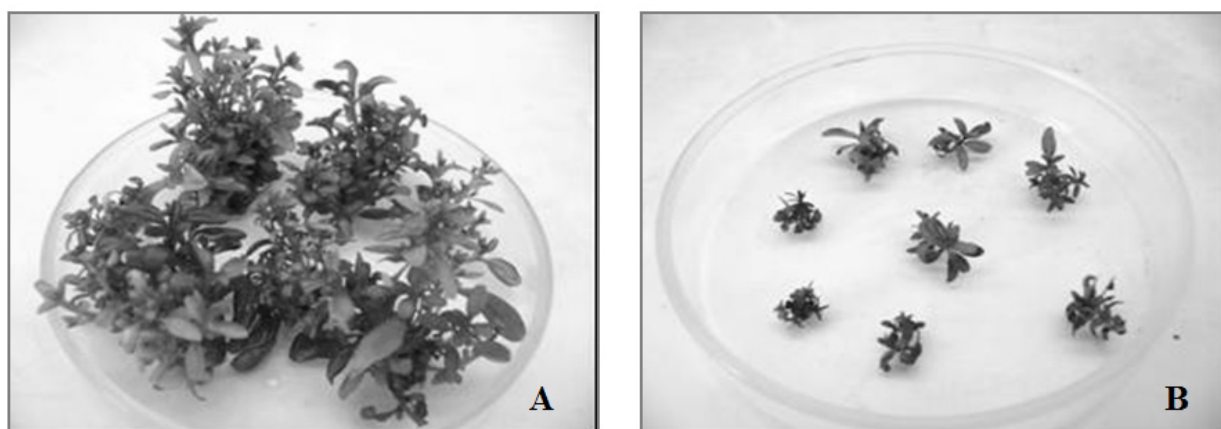


FIGURA 2: Aspecto do clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* cultivado em biorreatores de imersão temporária RITA<sup>®</sup> aos 28 dias, com intervalo de imersão de 2 (A) e 16 horas (B).

FIGURE 2: Aspect of the culture of *Eucalyptus grandis* x *urophylla* shoots grown in RITA<sup>®</sup> temporary immersion bioreactor for 28 days, under immersion interval of 2 (A) and 16 hours (B).

onde o ciclo de imersão de quatro horas durante 10 minutos proporcionou maior aproveitamento do meio de cultura em comparação com 12 horas (LEMOS et al., 2001). Os dois trabalhos relataram vantagens do sistema de imersão temporária em comparação com o cultivo em ágar, como maior eficiência na produção de brotos, aclimatização e crescimento dos explantes.

Para percentual de brotos hiper-hídricos por explante, houve diferença significativa entre os tratamentos somente para o fator intervalo de imersão, que foi significativo ( $P < 0,05$ ) aos 21 dias, enquanto que aos 28 dias não houve diferença entre os tratamentos (Tabela 1). No entanto, foi observado decréscimo do percentual de brotos hiper-hídricos com o aumento dos intervalos entre as imersões. Assim como neste trabalho, Castro e González (2002) observaram menor ocorrência desta desordem em *Eucalyptus grandis* nos maiores intervalos de imersão (12 e 24 horas) em comparação com os menores intervalos (3 e 6 horas). Acredita-se que esta desordem está associada às 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 (MAJADA et al., 2000). Com o uso 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).

Neste experimento, houve clara correlação entre as características massa fresca e número de

brotos produzidos, assim como relatado por Yadav et al. (2003), que 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.

### Injeção de ar aos recipientes

Os dois tratamentos estudados, sem e com injeção 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 3). Apesar de diversos estudos relatarem os benefícios do manejo do ambiente gasoso para as culturas em biorreatores, na condição de fluxo de ar estudada não foi observada diferença entre o tratamento de injeção e ausência de injeção de ar dentro do biorreator para nenhuma das características de crescimento avaliadas, assim como para a hiper-hidricidade. Quanto à massa seca obtida aos 28 dias, esta correspondeu a 7,4% da massa fresca nos dois tratamentos, confirmando a semelhança entre eles.

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 ao sistema de imersão temporária, por 3 minutos a cada 6 horas, o que permitiu a renovação da atmosfera dos recipientes e a diminuição da

TABELA 1: Percentual de hiper-hidricidade para os dois suportes de apoio dos explantes em quatro intervalos de imersão, aos 21 e 28 dias de cultivo em biorreatores de imersão temporária RITA<sup>®</sup>, em culturas clonais de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. Tratamentos com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo Teste Tukey.

TABLE 1: Percentage of hyperhydricity for two explant supports in four immersion intervals, at 21 and 28 days of culture in RITA<sup>®</sup> temporary immersion bioreactor in clonal cultures of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. Treatments with same letters are not significantly different at 5% probability by Tukey test.

Intervalo 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

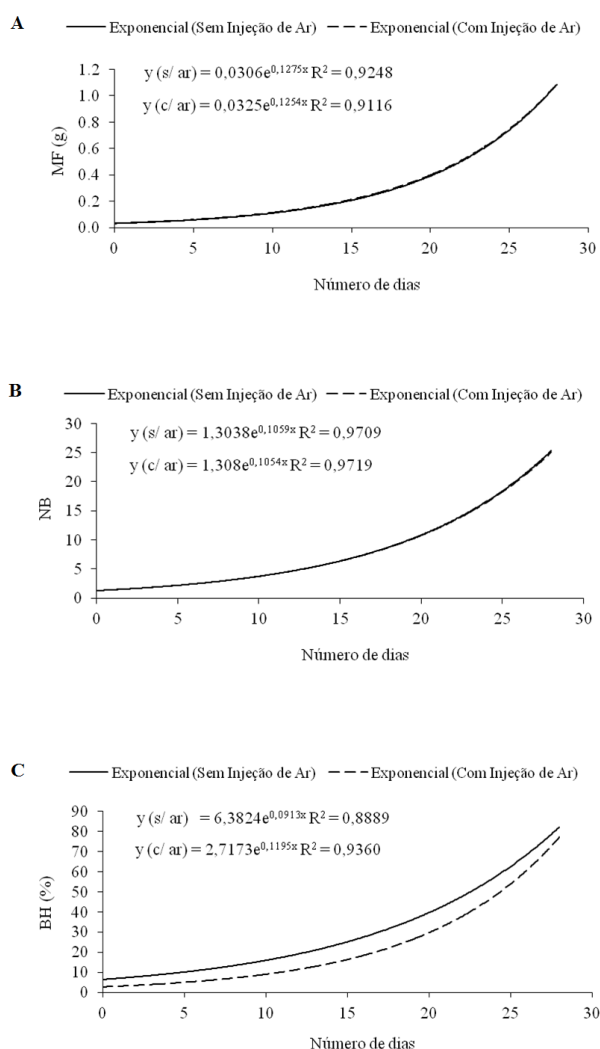


FIGURA 3: Curvas de tendência para as características massa fresca (A), número de brotos (B) e hiper-hidricidade (C) dos explantes, nos dois tratamentos de manejo do ar estudados (sem e com injeção de ar ao recipiente RITA<sup>®</sup>), durante 28 dias de cultivo do clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em biorreatores de imersão temporária RITA<sup>®</sup>.

FIGURE 3: Tendency curves for the characteristics fresh weight (A), number of shoots (B) and hyperhydricity (C) of explants in both air management treatments studied (with or without air additional injection in RITA<sup>®</sup>), during 28 days of culture of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* shoots in RITA<sup>®</sup> bioreactors.

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 (redução da hiper-hidricidade) com o uso da ventilação pela remoção do parafilme dos recipientes em culturas de *Scrophularia yoshimurae* (Scrophulariaceae).

Saher et al. (2005) reduziram a hiper-hidricidade com o uso de fundo de resfriamento dos frascos em culturas de cravo, sendo a diminuição de 3-4 °C dentro do frasco de cultura 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 de hiper-hidricidade nos explantes cultivados nos biorreatores, que junto com outros fatores induz maior ocorrência desta desordem fisiológica (GASPAR, 1991).

A composição da atmosfera gasosa dos recipientes de cultivo influencia o desenvolvimento das culturas pelo acúmulo de substâncias, 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<sup>®</sup>) (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.

Pode-se observar que a massa fresca, o número de brotos e a hiper-hidricidade dos explantes aumentaram a partir do 14<sup>o</sup> dia de cultivo (Figura 3), indicando que, nas condições estudadas, o maior desenvolvimento das culturas ocorreu a partir deste momento.

## CONCLUSÕES

Os menores intervalos entre as imersões (2 e 4 horas) e o suporte de papel-filtro propor-

cionaram maior crescimento em massa fresca e número de brotos formados por explante, porém, ocasionaram maior tendência ao aparecimento da hiper-hidricidade.

Quanto à injeção adicional de ar ao recipiente do biorreator RITA®, o fluxo de ar de 0,8 L min<sup>-1</sup> (a cada 4h com duração de 1 mim) adicionado aos frascos foi insuficiente e não influenciou o desenvolvimento das culturas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLI, M.; MOIENI, A.; DEGHANI, H. Effects of cultivar and agar concentration on *in vitro* shoot organogenesis and hyperhydricity in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Pakistan Journal of Botany**, Islamabad, 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**, Dordrecht, 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**, Chillán, v. 62, p. 68-78, 2002.

CHAKRABARTY, D. et al. Micropropagation of apple root stock 'M9 EMLA' using bioreactor. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 78, p. 605-609, 2003.

CHAKRABARTY, D. et al. Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. **Tree Physiology**, v. 26, p. 377-388, 2005.

CORREIA, A. C. G. **Micropropagação em biorreatores de imersão temporária e enraizamento de miniestacas e microestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus***. 2011, 62 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

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

GASPAR, T. et al. 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. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 6th ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. 770 p.

LAI, C. et al. 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.

LEMOES, E. E. P. et al. Micropropagação de clones de banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 482-487, dez., 2001.

MAJADA, J. P. et al. Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, 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**, Dordrecht, v. 49, p. 1-5, 1997.

MAYOR, M. L. et al. A. Reduction of hyperhydricity in sunflower tissue cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 72, p. 99-103, 2003.

McALISTER, B. et al. Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forest (SA). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 81, p. 347-358, 2005.

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

PARK, S. W. et al. Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, p. 199-205, 2004.

PICOLI, E. A. T. et al. Ultrastructural and biochemical aspects of normal and hyperhydric eucalypt. **International Journal of Horticultural Science**, Budapest, v. 14, n. 3, p. 61-69, 2008.

REIS, J. P. et al. Micropropagação de eucalipto no sistema de imersão temporária. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA/FAEPE, 2003. 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**, Campinas, v. 65, n. 1, p. 29-35, 2006.
- SAHER, S. et al. Prevention of hyperhydricity in micropropagated carnation shoots by bottom cooling: implications of oxidative stress. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 81, p. 149-158, 2005.
- SILVA, A. B. et al. Métodos de propagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 9, p. 1257-1260, set. 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, 2006. p. 83-100.
- 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**, Dordrecht, 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**, Dordrecht, 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.