

CAPACIDADE FOTOSSINTÉTICA DE PLÂNTULAS MICROPROPAGADAS E DE MUDAS DE *Eucalyptus tereticornis* SM.

Mario Takao Inoue^{*}
Maria Elisa Cortezzi Graça^{**}
Gabriel Correa^{***}

RESUMO

A baixa sobrevivência durante a aclimatização de plântulas regeneradas através da micropropagação tem sido atribuída, entre outros fatores, à baixa capacidade fotossintética. O presente estudo teve como objetivo comparar a fotossíntese líquida entre plântulas micropropagadas e mudas de *Eucalyptus tereticornis* Sm., sob diferentes condições de cultivo. O meio de cultura utilizado foi o MS básico, sendo as suplementações feitas de acordo com os seguintes tratamentos: T₁ = Mudas cultivadas em sacarose 3% (p/v) e ágar a 0,6% (p/v); T₂ = Plântulas micropropagadas cultivadas somente em ágar; T₃ = com sacarose e vermiculita; e T₄ - com ágar e sacarose. Após dois meses de cultivo, as mudas realizaram cerca de três vezes mais fotossíntese líquida que as plântulas micropropagadas, independente da suplementação utilizada. Embora não houvesse diferença significativa entre o ágar e a vermiculita no cultivo de plântulas micropropagadas, plântulas cultivadas em vermiculita apresentaram 62% mais fotossíntese que as cultivadas em ágar. O fato das plântulas micropropagadas cultivadas sem sacarose apresentarem maior taxa fotossintética que as com sacarose sugere que algum mecanismo enzimático de absorção de CO₂ possa vir a ser inibido ou que a presença de uma concentração maior de açúcares solúveis nas folhas impeça maior absorção de CO₂. Esses resultados indicam, também, que plântulas micropropagadas apresentam maior capacidade heterotrófica ou fotomixotrófica que autotrófica. Isto implica na necessidade de condições que permitam o desenvolvimento de uma capacidade mais fotoautotrófica, ainda *in vitro*, que conseqüentemente diminuirão a necessidade de cuidados durante a transferência para condições de casa de vegetação, até que estas reassumam a capacidade autotrófica plena.

PALAVRAS-CHAVE: fotossíntese, micropropagação, eucalipto.

* Professor do Curso de Engenharia Florestal da Universidade Federal do Paraná, CREA nº 3083, 7ª Região.

** Eng.- Agrônoma, Doutora, CREA nº 14659/D 7ª Reg., Pesquisadora da Embrapa - Centro Nacional de Pesquisas de Florestas.

*** Eng.- Agrônomo, Mestre, CREA nº 995-D, 20ª Reg., Pesquisador da Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Florestas.

PHOTOSYNTHETIC RATES OF MICROPROPAGATED PLANTLETS AND SEEDLINGS OF *Eucalyptus tereticornis* SM.

ABSTRACT

The low survival of micropropagated plantlets during acclimatization is attributed to several factors, including the low photosynthetic rates in micropropagated systems. Net photosynthetic rates among plantlets regenerated through micropropagation and seedlings of *Eucalyptus tereticornis* Sm. were compared under different culture conditions. The medium used was the basic MS with additions according to the following treatments: T₁ = seedlings grown on sucrose at 3% (w/v) and agar at 0.6% (w/v); T₂ = plantlets regenerated through micropropagation grown on agar only; T₃ = plantlets grown on vermiculite and sucrose; and T₄ = plantlets grown on agar and sucrose. Net photosynthetic rates in seedlings were about three times greater than in micropropagated plantlets, regardless of additions made. There was no significant difference between photosynthetic rates in micropropagated plantlets on agar as compared to those grown on vermiculite, although the latter showed 62% more photosynthesis than the former. The higher net photosynthesis of micropropagated plantlets grown without sucrose suggests that some synthesis and/or activity of enzymatic mechanisms for CO₂ absorption is inhibited or that the accumulation of sugars in the leaves in the presence of sucrose inhibits photosynthesis. This suggests that micropropagated plantlets exhibit heterotrophic or photomixotrophic growth, and that conditions during *in vitro* culture need to be improved for more photoautotrophic growth to reduce requirements during acclimatization period.

KEY WORDS: photosynthesis, micropropagation, eucalypts.

1. INTRODUÇÃO

Plântulas e brotações micropropagadas são normalmente referidas como de crescimento heterotrófico ou fotomixotrófico. Este hábito de crescimento é devido à baixa capacidade fotossintética (Grout & Aston, 1978; Pierik, 1987), a qual gera um balanço negativo de carbono, requerendo um carboidrato como fonte de carbono e de energia, desde as fases de indução até a de enraizamento.

Mais recentemente, estudos têm revelado que a baixa taxa fotossintética em plântulas micropropagadas é devida a baixas concentrações de CO₂ presentes sob o fotoperíodo comumente utilizado (16h. luz/ 8h. escuro). Kozai et al. (1990) verificaram que plântulas micropropagadas de *Cymbidium* sp. apresentam maiores taxas fotossintéticas líquidas e, conseqüentemente, maiores crescimentos quando os frascos são enriquecidos com CO₂, e cultivados sob intensidade luminosa alta. Esses mesmos autores concluíram que o fornecimento de condições favoráveis à fotossíntese resultam em um crescimento autotrófico para o cultivo *in vitro*.

Além das condições ambientais de cultivo, o crescimento fotoautotrófico, é também favorecido pela ausência de sacarose no meio (Kozai et al., 1991^b). Altos níveis de sacarose, com acúmulo de açúcares solúveis, podem resultar em um decréscimo na taxa de regeneração da carboxilase ribulose 1,5-bifosfato e/ ou na inibição da síntese ou atividade da mesma, resultando em baixos níveis fotossintéticos (Capellades et al., 1991).

Em virtude do processo em que se desenvolvem, plântulas ou brotações cultivadas *in vitro* são, anatômica e fisiologicamente, diferentes de mudas produzidas sob condições de casa de vegetação ou no campo, inclusive quanto à taxas e aparato fotossintético (Cassels, 1989; Mohammed & Vidaver, 1990; Roberts & Smith, 1990). Grout & Aston (1978) verificaram que mudas micropropagadas de couve-flor, recém transplantadas para casa de vegetação, apresentavam baixos níveis de clorofila e de fixação de CO₂, comparadas com mudas da mesma idade produzidas por sementes. Por outro lado, as taxas líquidas de fotossíntese e de crescimento foram similares entre mudas micropropagadas e mudas por sementes de couve chinesa (*Brassica campestris* L.) sob as mesmas condições de cultivo (Kozai et al., 1991^a). Além do estresse hídrico, fatores que afetam a fotossíntese têm um importante papel na aclimação e sobrevivência das plântulas micropropagadas.

No desenvolvimento da metodologia de micropropagação de duas espécies de *Eucalyptus*, Pinedo (1989) obteve cerca de 80% de sobrevivência em *E. citriodora*, mas não teve êxito na transferência de *E. tereticornis*. Este resultado é devido não só às diferenças entre as espécies, mas também nas diferenças de cultivo, cujos fatores necessitam ser determinados. Esses fatores devem ser otimizados durante a fase *in vitro*, como também durante a aclimatização na casa de vegetação, a fim de garantir a máxima sobrevivência das plântulas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Fonte de material

2.1.1. Plântulas micropropagadas

Brotações de *E. tereticornis* Sm. multiplicadas e subcultivadas *in vitro* provenientes de sementes da procedência Brasilândia-MG foram alongadas no meio básico de MS (Murashige & Skoog 1962) suplementado com 0,9 µM de BAP (6-benzilaminopurina) e 0,5 µM de ANA (ácido naftaleno acético) e enraizadas no meio básico MS acrescido de 2,7 µM de ANA. Ambos os meios foram acrescidos de sacarose a 3% (p/v) solidificados com ágar a 0,6% (p/v). O pH do meio foi ajustado em 5,8, antes da autoclavagem, a 120°C por 15 minutos. As brotações enraizadas permaneceram no meio de enraizamento até atingirem a altura de 2,0 cm, quando foram transferidas aos tratamentos especificados no item 2.2.

2.1.2. Mudras

Sementes de *E. tereticornis* Sm., da procedência Brasilândia, MG, foram primeiramente desinfestadas em uma solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,5% (v/v), por 5 minutos, lavadas por três vezes em água bidestilada e esterilizadas, e inoculadas no meio MS suplementado com sacarose a 3% (p/v). Ao atingirem cerca de 2,0 cm de altura, as mudras foram transferidas aos respectivos tratamentos descritos no item 2.2.

2.2. Tratamentos

O experimento foi constituído de quatro tratamentos inteiramente casualizados com sete repetições, como segue: T₁ = mudas, oriundas de sementes, cultivadas em meio de cultura suplementado com ágar e sacarose; T₂ = plântulas micropropagadas cultivadas em meio de cultura suplementado com ágar somente; T₃ = plântulas micropropagadas cultivadas em vermiculita com meio de cultura contendo sacarose; e, T₄ = plântulas micropropagadas cultivadas em ágar suplementada com sacarose. O meio de cultivo utilizado foi o MS básico. As suplementações, quando realizadas, foram feitas com ágar 0,6% (p/v) e sacarose 3% (p/v). As plântulas e as mudas foram cultivadas durante um período de 45 dias, sob a luminosidade de 1000 lux, com regime fotoperiódico de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, na temperatura de 25°C ± 2°C.

A troca de CO₂ foi determinada, através de uma adaptação na tampa dos frascos em que as plântulas e mudas foram cultivadas. Esta adaptação permitiu que cada frasco se constituísse em uma câmara de medição, sem manipulação das plântulas ou do ambiente dentro dos frascos. Estes foram acoplados a uma câmara climática com temperatura constante de 25°C. A radiação fotossintética ativa, obtida por lâmpada de vapor de mercúrio, foi mantida a 23 µE/ m².s², correspondendo à intensidade luminosa de cultivo das plântulas (1000 lux). O frasco e a câmara foram acoplados a um analisador de gás infra-vermelho, para medir a troca de CO₂. A área foliar foi determinada através de um medidor ótico- eletrônico de área foliar.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Geralmente, plântulas cultivadas *in vitro* são anatômica e fisiologicamente diferentes de mudas produzidas em casa de vegetação ou campo. Elas se comportam diferentemente, devido ao ambiente especial em que são cultivadas (Donnelly & Vidaver, 1984). Os resultados deste estudo corroboram essa afirmativa, pois as plântulas de *E. tereticornis* originárias de sementes, mesmo quando germinadas e cultivadas *in vitro* por dois meses realizaram cerca de três vezes mais fotossíntese líquida que as plântulas micropropagadas (Figura 1). Este resultado está conflitante com os relatados por Kozai et al., (1991^a) onde houve similaridades no crescimento, desenvolvimento e taxas fotossintéticas entre mudas e plântulas micropropagadas de *Brassica campestris*, mas está de acordo com os encontrados por Grout & Aston (1978) no qual as plântulas micropropagadas apresentaram baixas taxas fotossintéticas quando comparadas com mudas durante o transplante na casa de vegetação. Esses autores afirmam que as taxas fotossintéticas das plântulas micropropagadas e de mudas são altamente dependentes do ambiente *in vitro*. Portanto, o período em que permanecem em cultivo deve ser fundamental para a perda da capacidade fotoautotrófica das mesmas. Isto pode auxiliar na explicação das diferenças entre ambas e também das discrepâncias nos resultados dos diferentes trabalhos. No primeiro caso, o período de cultivo *in vitro* foi relativamente longo, permitindo que as mudas se assemelhassem com as micropropagadas; no segundo, os sistemas de produção foram diferentes e, conseqüentemente, também as taxas fotossintéticas. Para *E. tereticornis*, o período de dois meses de cultivo *in vitro* não foi suficiente para que as mudas perdessem a capacidade fotoautotrófica ou

para que se equivalessem às plântulas micropropagadas, em sua capacidade fotossintética.

As plântulas cultivadas com sacarose exibiram uma fotossíntese significativamente menor que aquelas cultivadas na ausência desse carboidrato (Figura 1). Apesar do balanço de carbono negativo de plântulas cultivadas na ausência de sacarose, estudos têm mostrado que a adição de sacarose no meio resulta em uma taxa fotossintética menor que na ausência desta (Capellades et al., 1991; Kozai et al., 1990). Como mencionado anteriormente, essa redução da fotossíntese pode ser atribuída à inibição de algum mecanismo enzimático envolvido na assimilação de carboidratos ou de um acúmulo de amido em virtude da alta concentração de carboidrato no meio, ou do aparato fotossintético ineficiente, característico do hábito heterotrófico das plântulas micropropagadas.

Em relação ao suporte físico, apesar de não ter sido observada diferença significativa entre as plântulas cultivadas em vermiculita e as cultivadas em ágar (Tabela 1), as primeiras apresentaram uma taxa fotossintética cerca de 62% maior do que as últimas (Figura 1). Apesar da superioridade da vermiculita em relação ao ágar em promover mais fotossíntese, aliada ao baixo custo comparado ao ágar, o uso de vermiculita torna a técnica ainda mais laboriosa. Há necessidade de futuros estudos sobre suportes físicos para meios de cultura visando aumentar a eficiência da técnica.

Tabela 1 - Análise de variância da taxa fotossintética líquida de mudas e plântulas de *E. tereticornis* submetidas a diferentes tratamentos.

Fonte de Variação	GL	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	3	77.14	25.71	64.29**
Resíduo	24	9.60	0.4	
Total	27	86.74		

Coef. Var. Médio 0.47

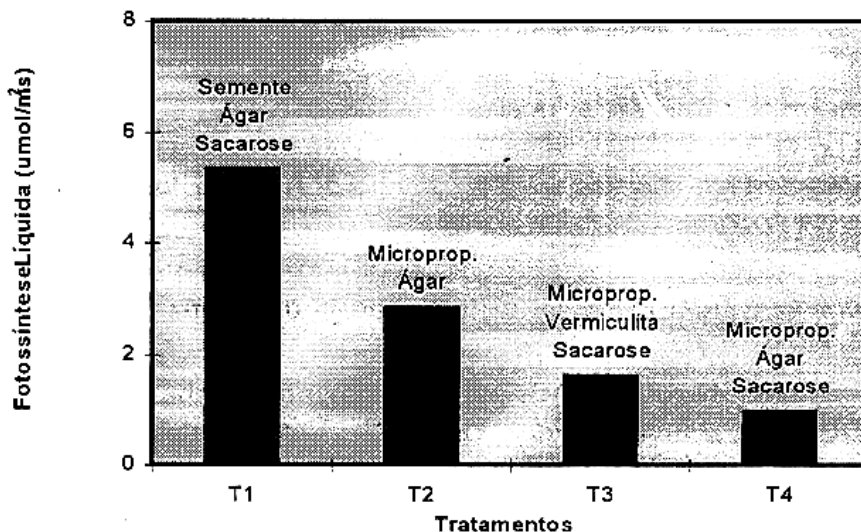


Figura 1. Fotossíntese líquida de mudas e plântulas micropropagadas de *E. tereticornis* Sm. sob vários tratamentos. Contraste ortogonal T1 vs T2, T3, T4 significativo a $p < 0,001$; T3 vs T4 n.s.; T2 vs T3, T4 significativo a $p < 0,001$.

4. CONCLUSÕES

Em *Eucalyptus tereticornis*, a taxa fotossintética das plântulas micropropagadas é menor que a de mudas produzidas *in vitro* via sementes, confirmando o hábito mixotrófico das mesmas. Plântulas cultivadas em meio de cultura contendo sacarose tiveram uma menor taxa fotossintética do que as cultivadas sem sacarose. Tratamentos ou técnicas que permitam aumentar a fotossíntese durante o cultivo *in vitro* necessitam ser estudadas para se obter um maior desenvolvimento da capacidade autotrófica das plântulas ainda *in vitro*, possibilitando uma maior sobrevivência durante a transferência para a casa de vegetação. O enriquecimento do ambiente do frasco de cultura com CO₂, a redução gradual das fontes de carboidrato do meio durante o cultivo *in vitro* e outros tratamentos que maximizem a fotossíntese *in vitro* devem ser estudados para um maior sucesso durante a aclimatização das mesmas.

5. REFERÊNCIAS

CAPELLADES, M.; LEMEURE, R.; DEBERGH, P. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.25, n.1, p.21-26, 1991.

- CASSELS, A. C. Pitfalls in micropropagation and how to avoid them. **Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society**, v.38, p.240-246, 1989.
- DONNELLY, D. J.; VIDAVER, W.E. Pigment content and gas exchange of red raspberry *in vitro* and *ex vitro*. **Journal of America for Horticultural Science** , v.109, p.177-181, 1984.
- GROUT, B.; ASTON, J. Modified leaf anatomy of cauliflower plantlets regenerated from meristem culture. **Annals of Botany**, v.42, p.993-995, 1978.
- KOZAI, T.; OKI, H.; FUJIWARA, K. Photosynthetic characteristics of *Cymbidium* plantlet *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.22, n.3, p.205-211, 1990.
- KOZAI, T.; OHDE, N.; KUBOTA, C. Similarity of growth patterns between plantlets and seedlings of *Brassica campestris* L. under different *in vitro* environmental conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.24, n.3, p.181-186, 1991^a.
- KOZAI, T.; IWABUCHI, K.; WATANABE, K.; WATANABE, I. Photoautotrophic and photomixotrophic growth of strawberry plantlets *in vitro* and changes in nutrient composition of the medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.25, n.2, p.107-115, 1991^b.
- MOHAMMED, G.H. ; VIDAVER, W.E. The influence of acclimatization treatment and plantlet morphology on early greenhouse-performance of tissue-cultured Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.21, n.2, p.111-117, 1990.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- PIERIK, R.L.M. **In Vitro Culture of Higher Plants**. Holanda, Martinus Nijhoff Publishers, 1987. 344p.
- PINEDO, D.N.H. **Micropropagação de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus tereticornis***. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1989. 63p. Tese de Mestrado.
- ROBERTS, A.V.; SMITH, E.F. The preparation *in vitro* of *Chrysanthemum* for *transplantation to soil.1*. Protection of roots by cellulose plugs. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.21, n.2, p.129-132, 1990.