



Projeto iPlant:

**“Inovação na identificação e
produção de plantas melhoradas
de eucalipto para enfrentar
desafios atuais”
(2019-2021)**

Inovar no sistema de clonagem de eucalipto

Otimizar as condições para
maximizar a produção de rebentos
e o enraizamento de estacas

RAIZ
Forest and Paper Research Institute



PART OF
THE NAVIGATOR
COMPANY



universidade
de aveiro



ÍNDICE

RESUMO	2
PALAVRAS-CHAVE.	2
INTRODUÇÃO	2
PARTE EXPERIMENTAL	3
<i>Material biológico</i>	<i>3</i>
<i>Sistemas de produção</i>	<i>3</i>
<i>Estacarias</i>	<i>4</i>
<i>Condições ambientais</i>	<i>4</i>
<i>Avaliações</i>	<i>5</i>
<i>Análise de dados</i>	<i>6</i>
RESULTADOS E DISCUSSÃO	7
<i>Critérios de transplantação</i>	<i>7</i>
<i>Sistema aeroponia vs Sistema tradicional</i>	<i>10</i>
<i>Clones de mini-estacaria iPLANT</i>	<i>12</i>
<i>Influência da estação do ano no enraizamento</i>	<i>14</i>
CONCLUSÕES	15
REFERÊNCIAS	16

ENRAIZAMENTO ADVENTÍCIO DE EUCALYPTUS EM AEROPONIA

Adelaide Machado¹, Joana Costa¹, Daniela Ferreira², Nuno M. G. Borralho²

¹ RAIZ, Herdade de Espirra, 2985-270 Pegões, Portugal, adelaide.machado@thenavigatorcompany.com, 265421153.

² RAIZ, Quinta de S. Francisco, Apartado 15, 3801-501 Eixo, Portugal.

RESUMO

Eucalyptus globulus é, em Portugal, a espécie mais importante para a produção de pasta e papel. Os programas de melhoramento em curso para esta espécie são baseados na propagação clonal. Contudo, *E. globulus* é uma espécie difícil de propagar especialmente pela sua susceptibilidade às condições ambientais da estufa e a agentes patogénicos. O sistema de aeroponia é um método alternativo ao sistema tradicional, que permite um controlo mais fácil das condições ambientais e sanitárias, além de ser um sistema modular altamente eficiente. O objectivo deste trabalho foi testar um sistema de propagação alternativo, baseado nos princípios da aeroponia, para a indução radicular e sucesso de enraizamento de miniestacas de eucalipto. As miniestacas foram obtidas nos pés-mãe do jardim-clonal do RAIZ. Depois da aplicação de IBA por mergulhia da base das miniestacas, estas foram plantadas em substrato nos tabuleiros do sistema tradicional e colocadas no sistema de aeroponia. As miniestacas permaneceram 20 dias no sistema de aeroponia, acompanhando-se o desenvolvimento dos *callus* na sua base, após este período foram transplantadas para substrato. O enraizamento foi verificado ao longo de 90 dias nas miniestacas de ambos os métodos de propagação. O acompanhamento do desenvolvimento de *callus* no ambiente de aeroponia permitiu perceber que o período de 20 dias é suficiente para a indução radicular e que uma miniestaca com *callus* mais desenvolvido sobrevive mais facilmente à transplantação tendo também maior probabilidade de emitir raiz. Este estudo mostra também que a indução do enraizamento em aeroponia leva a um aumento de enraizamento comparativamente ao método tradicional (79.1% e 70.8%, respetivamente), embora estatisticamente sem significância. O método de aeroponia deve continuar a ser estudado para que seja possível melhorar as fases iniciais do método de propagação actual, com poupança em bens e trabalho.

PALAVRAS-CHAVE: enraizamento adventício, aeroponia, eucalipto, mini-estaca.

INTRODUÇÃO

Eucalyptus globulus é, em Portugal, a espécie mais importante para a produção de pasta e papel. A sua importância económica conduziu ao desenvolvimento de vários programas de melhoramento genético, assentes em pomares de semente, cruzamentos controlados e na clonagem de genótipos de elite [1]. A clonagem de materiais melhorados tornou-se uma ferramenta de produção em larga escala, por meio das técnicas de propagação, como a macroestacaria e a miniestacaria. Contudo, estas técnicas só permitem a clonagem em escala de apenas, aproximadamente, 5% dos genótipos de elite. Por isso, há um interesse constante no aperfeiçoamento das técnicas já utilizadas, bem como na procura de métodos inovadores para propagação vegetativa em escala.

A miniestacaria é o método mais recente e apresenta vantagens sobre a macroestacaria, nomeadamente em termos de produtividade dos pés-mãe. Possibilita a produção anual de plantas com recurso a controlo ambiental tanto para a produção de rebentos em pés-mãe como para a fase de enraizamento e atempamento das estacas. As estacas são colocadas em substrato e as condições ambientais, favoráveis ao desenvolvimento, são criadas com rega por aspersão e aquecimento noturno da estufa. A sobrevivência nos 30 dias iniciais é fundamental para o sucesso do enraizamento, pois é esperado que nesta fase ocorra a sua indução. Nos 30 dias seguintes deverá ocorrer a emissão radicular e, embora se aliviem as condições de humidade, as estacas mantêm-se na estufa de enraizamento. Com 60 dias, as

estacas são transferidas para um estufa de atempamento ou expostas diretamente às condições climáticas durante as estações mais quentes do ano.

O sistema de aeroponia, ao contrário dos sistemas tradicionais, que recorrem a substratos para o suporte e nutrição da planta, é caracterizado pela suspensão do sistema radicular num reservatório escuro onde é nebulizada água ou solução nutritiva. Neste sistema, o suporte da planta é artificial, mecanismo de suporte que permite também isolar o ambiente molhado da raiz e o ambiente húmido da parte aérea. O controlo ambiental é minucioso, para isso também contribui a campânula, que protege a parte aérea das plantas, criando um ambiente húmido e conservando a temperatura. A vantagem do ponto de vista sanitário é óbvia, uma vez que não há substrato, a parte aérea das plantas mantém-se seca, a exposição ao ambiente envolvente é limitada e a precoce identificação e remoção de material contaminado é simples. Este sistema possui também vantagens de gestão de recursos, pela redução da quantidade de água, substrato, espaço e trabalho [2]. As características deste sistema têm sido avaliadas, para diferentes objetivos, com sucesso, como a produção de plantas [3] e a propagação clonal [4-6]. A comparação do enraizamento adventício através do método tradicional de propagação, com recurso a substrato, e do sistema de aeroponia foi já realizada por alguns autores. Nos seus estudos enunciam como principais vantagens do sistema de aeroponia a emissão radicular mais rápida e a qualidade do sistema radicular [7,8]. Nestes estudos não há uma completa substituição do sistema tradicional de propagação, pois o sistema de aeroponia serve apenas para as fases de indução e emissão da raiz. As plantas já enraizadas são transferidas para substrato, onde posteriormente, sob condições climáticas favoráveis, se desenvolvem completamente.

O objetivo deste trabalho foi testar um sistema de produção alternativo para a indução e sucesso do enraizamento em miniestacas de *Eucalyptus* spp. Isto é, pretendeu-se verificar se a indução do enraizamento de clones de eucalipto pode ser iniciado em aeroponia, numa fase inicial de alteração morfológica, e a emissão radicular, numa fase posterior, já em substrato. Ainda, o estudo teve como objetivo comparar este sistema com o sistema de propagação tradicional, considerando diferentes materiais genéticos para compreender a extensão da aplicabilidade do mesmo.

PARTE EXPERIMENTAL

Material biológico

Os materiais genéticos utilizados no ensaio encontram-se instalados no parque de pés-mãe de mini-estacaria do Programa de Melhoramento do RAIZ e do Projeto nacional iPLANT - "Innovation in the identification and production of improved eucalyptus plants to face current challenges", financiado pelo Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e Programa Operacional Regional de Lisboa. No total, foram utilizados 43 materiais genéticos de *E.globulus* e híbridos (provenientes das espécies *E. benthamii*, *E. dunii*, *E. fastigata*, *E. delegatensis*, *E. darymliana*; e de cruzamentos entre *E. nitens* x *E. trautii*, *E. saligna* x *E. rudis*, *E. saligna* x *E. darymliana*, *E. nitens* x *E. globulus*, *E. darymliana* x *E. globulus*, *E. grandis* x *E. globulus*, *E. viminalis* x *E. globulus*, *E. urograndis* x *E. maideni*), 3 dos quais pertencem aos Viveiros do Furadouro e restantes ao RAIZ. O parque encontra-se nas instalações do RAIZ na Herdade de Espirra, numa estufa de policarbonato alvéolar e cultivados num sistema de hidroponia de areia.

Sistemas de produção

Foram utilizados dois sistemas de produção de plantas clonais. O método tradicional de propagação, que se caracteriza por colocar as miniestacas num substrato de turfa e perlite, na estufa de enraizamento (2000-8000lux e DPV 0.2-0.5kPa) (Figura 1a), e o método de aeroponia, que foi implementado com o sistema X-Stream Aeroponic Propagator (Nutriculture), instalado no interior da estufa de enraizamento. Neste sistema as estacas estão seguras 2cm acima da base, por uma esponja que mantém em ambiente adequado a zona basal e parte aérea da estaca (Figura 1b). Durante o ensaio este sistema funcionou com água da torneira em aspersão contínua e com ventilação da campânula

(DPV médio de 0.02kPa e T média de 22°C). Após 20 dias em aeroponia, as miniestacas foram transplantadas para substrato. O período de 20 dias foi estabelecido com base em testes preliminares, onde se observou que a indução radicular ocorria durante este período. As estacas de ambos os métodos foram transferidas aos 60 dias do ambiente da estufa de enraizamento para a casa de sombra.

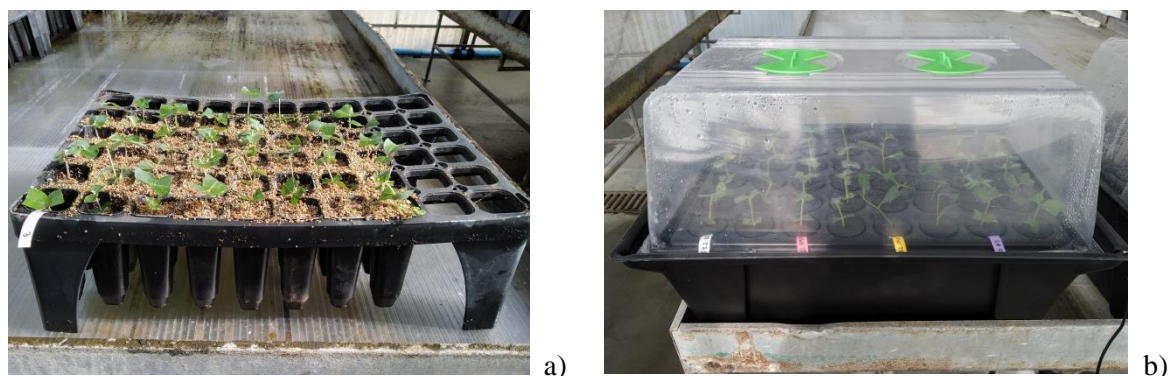


Figura 1. Sistemas de produção de plantas clonais: a) sistema do método tradicional com tubetes e substrato; b) sistema de aeroponia com aspersão e campânula.

Estacarias

A partir de rebentos colhidos no parque de pés-mãe foram preparadas as miniestacas, que foram distribuídas equitativamente pelos dois métodos em comparação, após mergulhar a sua base em 0,25g/l IBA (ácido indol-butírico, Sigma-Aldrich). Em todo o ensaio foram realizadas sete estacarias (Tabela 1), nas duas últimas estacarias houve a disponibilidade de um terceiro sistema de aeroponia e por isso o número de estacas foi superior às estacarias precedentes.

Tabela 1. Calendário e descrição quantitativa (número de miniestacas) e qualitativa (materiais genéticos) das estacarias do estudo.

Estacarias	Miniestacas método tradicional	Miniestacas método aeroponia	Materiais genéticos
22-jul-20	80	80	FG02.842; DUO 03; G74; H582.02; G1202; G1204; H2122.097; GOES
11-ago-20	80	80	TR-01; ML-02; 77368; Estrela; G1202; H1205; Atlas; H197.01
03-set-20	80	80	BT1/1358; MEI 2; FG05; H551.01; G1202; Estrela; H2122.083; Barão
28-set-20	80	80	G2062.014; G2080.013; G2084.003; G2051.028; Barão; GOES; 77000; Atlas
20-out-20	80	80	G1204; G2084.008; G1203; G74; G942.016; 77000; H1205; MEI 1
11-nov-20	120	120	G2090.022; G09; G2062.014; GM2-58; G2090.008; BC-422; G2009.027; G826.049; AC-58; G2053.003; G834.009; G2051.005
02-dez-20	120	120	G09; GM2-58; G1203; BC-422; H2122.083; G2053.012; AC-58; G2009.027; G2053.003; G2090.003; H2122.097; G2051.005

Condições ambientais

As condições ambientais são distintas nos dois métodos em estudo. A temperatura e humidade foram sempre superiores no sistema de aeroponia. No início do outono a temperatura começou a diminuir em ambos os sistemas, mas no sistema de aeroponia manteve-se em média 2°C mais elevada que a estufa de enraizamento (Figura 2).

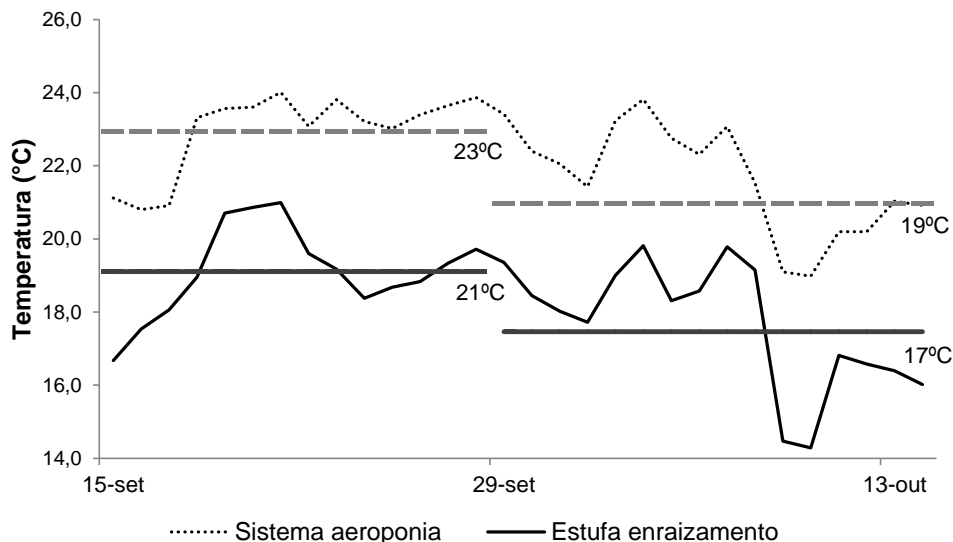


Figura 2. Temperaturas médias diárias nos dois ambientes: sistema de aeroponia e estufa de enraizamento. Está representado o período de transição entre o verão e o outono. As linhas horizontais correspondem à média do período de 15 dias associado às temperatura de verão e de outono.

Avaliações

Todas as estacas, provenientes do método de aeroponia ou tradicional, foram observadas periodicamente com abertura do tubete (aos 20, 35, 45, 60 e 90 dias após a estacaria), para registo do enraizamento e mortalidade até aos 90 dias. As miniestacas do sistema de aeroponia foram avaliadas de forma qualitativa quanto à presença e desenvolvimento de *callus* antes da transplantação para substrato (8, 15 e 20 dias após estacaria). Para isso, foi definida uma escala de estádios de desenvolvimento do *callus*, que consiste em quatro níveis: ausência (I), incipiente (II), evidente com primórdios radiculares (III) e friável (IV). Estes estádios de desenvolvimento são ilustrados pela Figura 3.

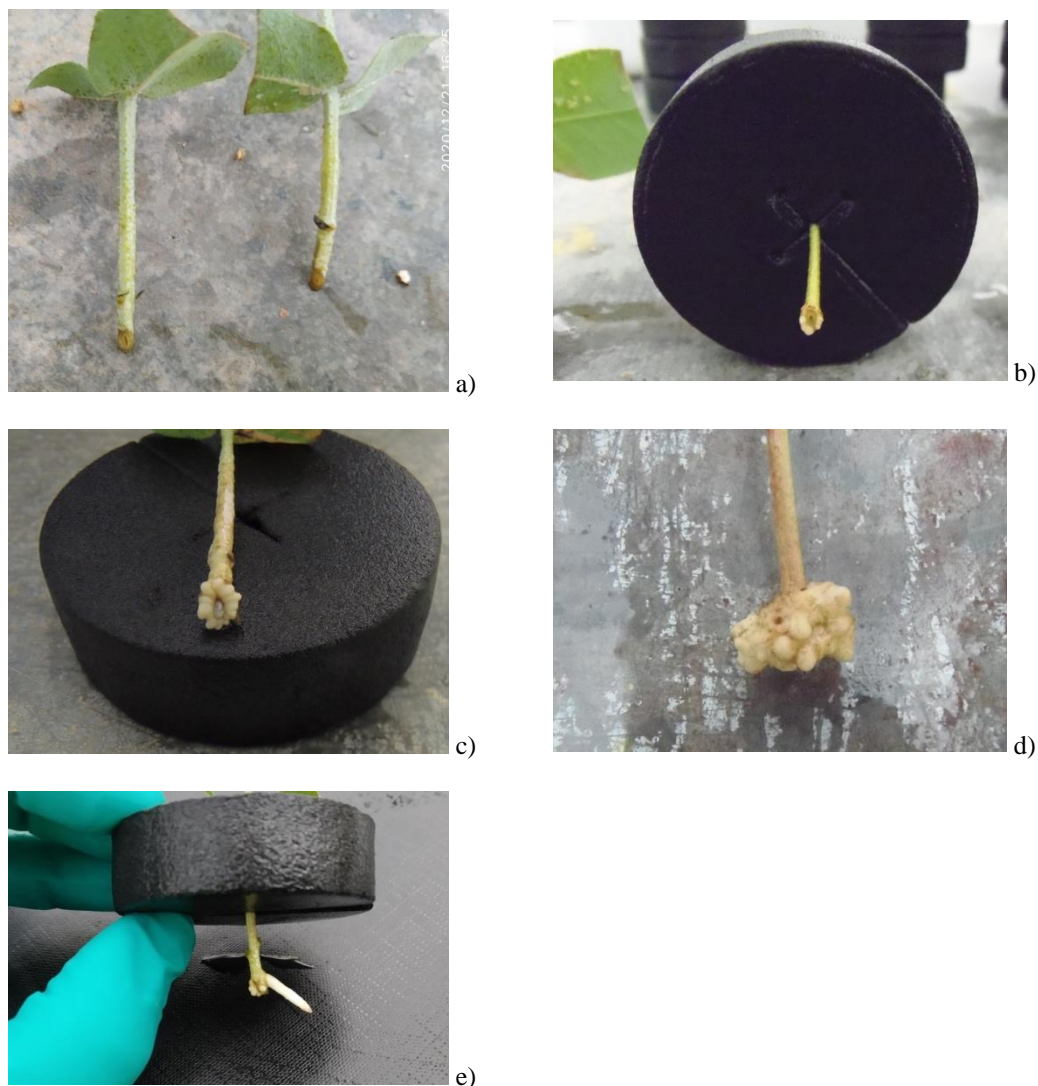


Figura 3. Estádios de desenvolvimento do callus: a) estágio I, callus ausente; b) estágio II, callus incipiente; c) estágio III, callus evidente com primórdios radiculares; d) estágio IV, callus friável; e) estaca enraizada.

Análise de dados

O desenho experimental consistiu em dois tratamentos com 80 miniestacas e sete estacarias (réplicas).

Relativamente ao tema *Critérios de transplantação*, foram utilizados vários parâmetros de avaliação:

- A frequência do tipo de *callus* durante o período de aeroponia foi calculada pela divisão do número de miniestacas em cada tipo de *callus* e o número de miniestacas no sistema de aeroponia em cada estacaria. Os dados apresentados são as médias das várias estacarias.
- A frequência do tipo de *callus* nas estações do ano foi calculada pela soma das frequências médias das miniestacas com *callus* do tipo I e II, e do tipo III e IV das estacarias realizadas em cada estação do ano.
- O enraizamento das miniestacas por tipo de *callus* foi calculado pela divisão do número de miniestacas enraizadas de cada tipo de *callus* em cada avaliação e o número total de miniestacas de cada tipo de *callus* transferidas para substrato após 20 dias no sistema de aeroponia. Os dados apresentados são as médias da diferença do enraizamento para cada data de avaliação.

- A mortalidade das miniestacas por tipo de *callus* foi calculada pela divisão do número de miniestacas mortas de cada tipo de *callus* em cada avaliação e o número total de miniestacas de cada tipo transferidas para substrato após 20 dias no sistema de aeroponia. Os dados apresentados são as médias da diferença do enraizamento para cada data de avaliação.

- O enraizamento e mortalidade finais para cada tipo de *callus* foram calculados pelo número total de miniestacas enraizadas de cada tipo de *callus* aos 90 dias sobre o número total de miniestacas de cada tipo transferidas para substrato após 20 dias no sistema de aeroponia. Os dados apresentados são as médias das várias estacarias.

Os dois sistemas de produção, *Sistema aeroponia vs Sistema tradicional*, foram avaliados pelo enraizamento e mortalidade, que foram calculados pela divisão do número total de miniestacas enraizadas ou mortas até à data de avaliação pelo número total de miniestacas estaqueadas. Os valores apresentados são as médias das estacarias.

Já a *Influência da estação do ano no enraizamento* foi avaliada pelo enraizamento, calculado pela divisão do número de miniestacas enraizadas em cada avaliação pelo número total de miniestacas. Os valores apresentados são as médias das estacarias realizadas em cada estação do ano.

Para os dados expressos em percentagem, foi efetuada a transformação angular pela fórmula arcoseno ($\text{RaizQuadrada}(\text{variável}/100)$) [9]. A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk W e a homogeneidade de variâncias foi verificada com teste de Bartlett. O teste Kruskal-Wallis foi usado para verificar diferenças nas médias de frequência, enraizamento e mortalidade. Para todos os testes descritos, foi utilizado um nível de significância de 5%. A análise estatística foi efetuada com recurso ao software STATISTICA 9.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo está dividido em três secções, onde são apresentados e discutidos os principais resultados deste estudo. Na secção “Critérios de transplantação” é demonstrado qual o momento ideal da transplantação das miniestacas do sistema de aeroponia para substrato (número de dias e estágio de desenvolvimento), que melhor favorece a emissão radicular. Seguidamente, na secção “Método de aeroponia vs Método tradicional” são comparados os dois métodos de propagação e feita a análise para cada método de propagação sobre o comportamento de materiais genéticos mais relevantes (Clones de mini-estacaria iPLANT). Por último, na secção “Influência da estação do ano no enraizamento”, é discutida a influência das condições ambientais, provocadas pela estação do ano, no enraizamento obtido em ambos os métodos de propagação.

Critérios de transplantação

A simplicidade do sistema de aeroponia permite o acompanhamento das alterações morfológicas que levam à emissão de raízes, nomeadamente a formação de *callus*. Em estudos anteriores foi observado que, sob as condições de aeroponia testadas, o surgimento dessas massas de células pluripotentes se inicia, em média, aos 10 dias e a emissão de raízes, em média, aos 17 dias. O registo mais precoce verificado para a emissão radicular foi aos 10 dias.

No presente estudo foi verificado que nos 8 dias iniciais de aeroponia 87,3% das miniestacas ainda não formou *callus* (tipo I) e que existiu emissão radicular, sem formação de *callus* visível, em 0,9% das miniestacas (Figura 4). Ao fim de 15 dias, o número de miniestacas sem *callus* ou com *callus* incipientes ainda é muito elevada (70%) e só após os 20 dias é que esta prevalência baixou dos 50%. Esta diminuição permitiu maximizar, aos 20 dias, o número de miniestacas com *callus* mais desenvolvidos, 35% de *callus* do tipo III e IV (Figura 4). Estes resultados corroboraram os testes preliminares realizados anteriormente a este estudo, inferindo-se que 20 dias de permanência em aeroponia, sob as condições estudadas, é suficiente para a indução e emissão radicular. Contudo, neste estudo verificou-se que aos 20 dias o número de miniestacas enraizadas é superior ao desejável,

23,5 %, o que poderá indicar que em alguns períodos do ano a transferência deve ser antecipada.

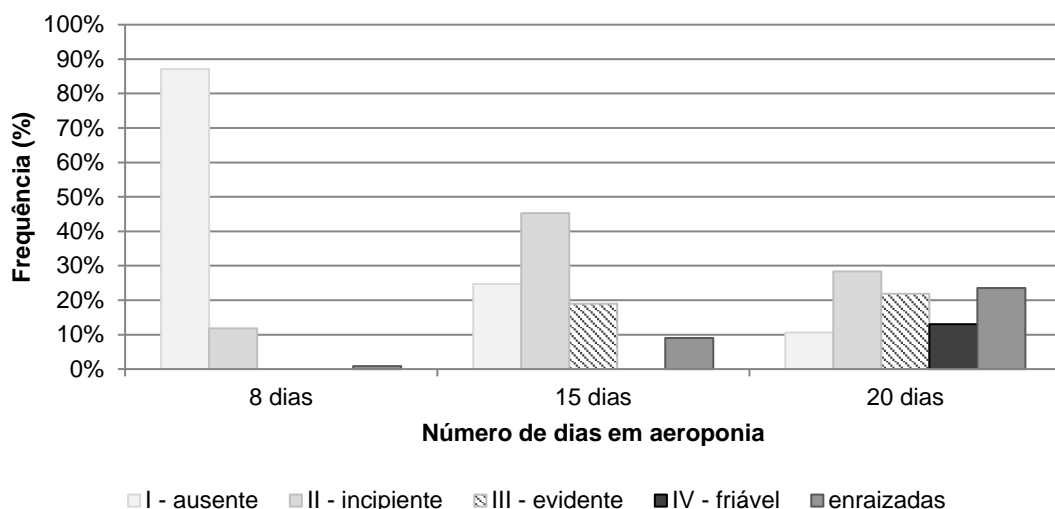


Figura 4 - Frequência dos diferentes estádios de desenvolvimento e tipos de callus durante o período de aeroponia.

No verão, entre os 15 e os 20 dias em aeroponia as miniestacas enraizadas duplicam atingindo os 27%. Neste período do ano parece haver benefício na antecipação da transferência para substrato, evitando-se o aumento da emissão radicular em aeroponia dos últimos 5 dias e o desenvolvimento excessivo dos *callus* até ao tipo IV (*callus* friável e aparentemente senescente). Pelo contrário, na estação do outono, aos 20 dias, 55% das miniestacas ainda está nos estádios de menor desenvolvimento do *callus*. Mas mesmo no outono não será aconselhável estender o período em aeroponia, pois aos 20 dias as miniestacas enraizadas já representam 20,8% (Figura 5).

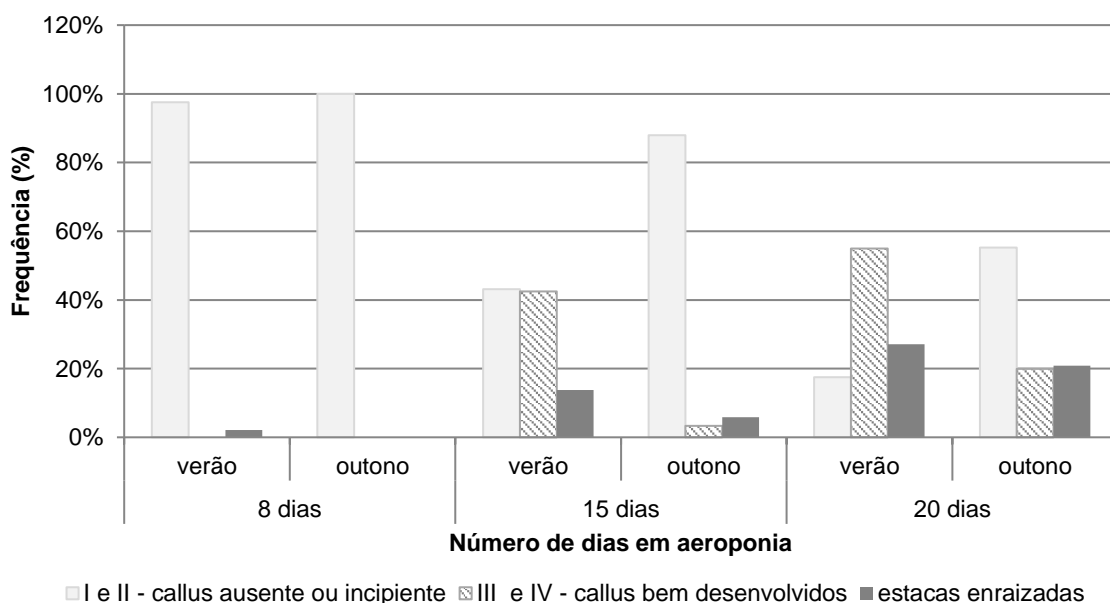


Figura 5 - Frequência dos estádios de desenvolvimento dos de callus nas estacarias de verão e outono. (Estádios de desenvolvimento do callus apresentados na Figura 3).

O momento ideal para a transferência das miniestacas do sistema de aeroponia para substrato deve ser definido, também, pelo estágio de desenvolvimento do *callus* que melhor favorece a emissão de raízes em substrato. A avaliação qualitativa dos *callus* formados em aeroponia e posteriormente a observação regular em substrato permitiu associar a cada tipo de *callus* um comportamento diferente de emissão radicular e sobrevivência.

A emissão radicular associada a cada tipo de *callus* e ocorrida em cada período entre avaliações está representada na Figura 6. Com estes dados é possível distinguir comportamentos diferentes entre as miniestacas que não formaram *callus* em aeroponia e aquelas que formaram *callus* mais ou menos desenvolvidos. Se, por um lado, a maioria das miniestacas que não formaram *callus* (estádio de desenvolvimento I) demoraram mais de 15 dias a emitir raiz, por outro lado, as miniestacas que desenvolveram *callus* (estádios II, III e IV) enraizaram em média 34% das miniestacas nos 15 dias seguintes à transplantação.

Apesar de muitas miniestacas com *callus* terem emitido raízes nos primeiros 15 dias em substrato, o enraizamento final destes três tipos de *callus* não coincidiu e os *callus* mais desenvolvidos deram origem a mais miniestacas enraizadas (82,1% miniestacas do tipo III e tipo IV enraízam até aos 90 dias). Destas miniestacas com *callus* bem desenvolvidos são as do tipo III as que em menor número de dias, 25 dias em substrato, alcançam a maior quantidade de miniestacas enraizadas, 62% do total de 82,1%.

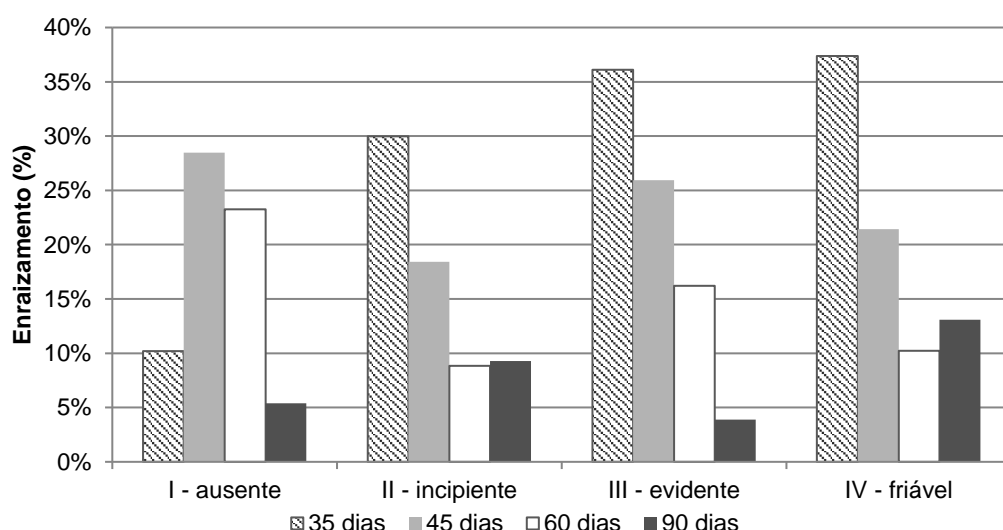


Figura 6 - Enraizamento médio associado ao estágio de desenvolvimento do *callus* em cada período de avaliação (estádios de desenvolvimento do *callus* apresentados na Figura 3).

O enraizamento aos 90 dias foi de 67,3% e 66,5% para as estacas com tipo de *callus* I e II, respetivamente, enquanto as do tipo III e IV obtiveram 82,1%. Não obstante as diferenças no enraizamento, quer na rapidez de ocorrência quer no valor global final obtido, não foram registadas diferenças significativas para este parâmetro (Tabela 2).

A capacidade de sobrevivência à transplantação é também um fator importante para o enraizamento em substrato. Também para este parâmetro, os estádios de maior desenvolvimento dos *callus* apresentaram vantagem, pois a mortalidade que ocorreu foi menor (5,3% para tipo III e IV) e mais tardia, principalmente para o *callus* de tipo III. A mortalidade de estacas neste tipo de *callus* ocorreu entre os 60 e os 90 dias de estacaria (mais de 40 dias após a transplantação) por isso parece estar relacionada com a transferência aos 60 dias para a casa de sombra. Esta transição de ambiente conduz, habitualmente, à morte das estacas sem raiz que sobreviveram até aos 60 dias beneficiando do

ambiente húmido da estufa. A morte das miniestacas sem desenvolvimento de *callus* ou com *callus* incipiente ocorreu principalmente após a transplantação e durante os 30 dias seguintes registaram uma média mais elevada de 16,2% de miniestacas mortas (Figura 7 e

Tabela 2).

Tabela 2 - Avaliação dos estádios de desenvolvimento dos *callus* formados pelas miniestacas em aeroponia quanto aos resultados de enraizamento e mortalidade.

(As médias assinaladas com a mesma letra são estatisticamente iguais, Kruskal-Wallis, estádios de desenvolvimento do *callus* apresentados na Figura 3)

Tipo de <i>callus</i>	Número de estacas	Enraizamento (%)	Mortalidade (%)	Estacas sobreviventes não enraizadas (%)
I - ausente	78	67,3 ^a	16,8 ^a	15,9
II - incipiente	201	66,5 ^a	15,7 ^a	17,8
III - evidente	129	82,1 ^a	5,9 ^a	12,0
IV - friável	73	82,1 ^a	4,8 ^a	13,1

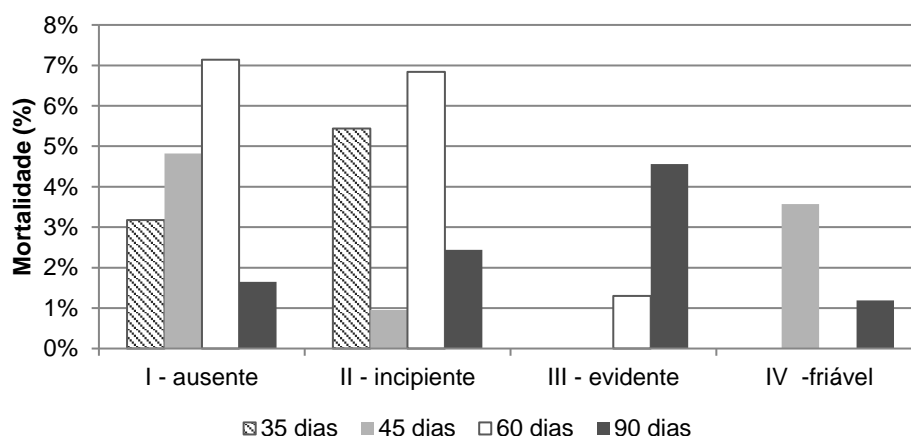


Figura 7 - Mortalidade média associada ao estágio de desenvolvimento do *callus* em cada período de avaliação. (Estádios de desenvolvimento do *callus* apresentados na Figura 3).

De acordo com a informação recolhida neste estudo, é possível concluir que o estágio de desenvolvimento do *callus* com melhores condições para emissão radicular em substrato e sobrevivência na transplantação é o *callus* de tipo III, seguida do *callus* tipo IV. O *callus* do tipo IV embora com bons resultados para o enraizamento e sobrevivência é o tipo de *callus* com a análise menos robusta, pois só ocorreu nas três estacarias realizadas no verão e foi o tipo de *callus* menos frequente. O tipo IV é o estágio de desenvolvimento mais avançado do *callus* cujas características de tamanho, senescência e desagregação celular indicam um desenvolvimento excessivo.

Sistema aeroponia vs Sistema tradicional

A permanência das miniestacas no sistema de aeroponia foi de 20 dias, após esse período as miniestacas que morreram ou emitiram raiz foram contabilizadas e estão incluídas nos dados apresentados em todo o estudo (dados de enraizamento e mortalidade aos 20, 35, 45, 60 e 90 dias). Assumiu-se que as miniestacas enraizadas teriam um desenvolvimento normal, mas foram descartadas pela dificuldade de as transplantar para substrato. As restantes miniestacas foram avaliadas

qualitativamente quanto ao desenvolvimento do *callus* e foram transplantadas para substrato.

As avaliações frequentes das miniestacas, provenientes do sistema de aeroponia e do método tradicional, permitiram acompanhar o seu comportamento e comparar os dois métodos de propagação quanto ao enraizamento e mortalidade (Tabela 3 e Tabela 4). Nos 20 dias após a estacaria, as miniestacas do método tradicional enraizaram mais 2,4% que as miniestacas no sistema de aeroponia. Esta vantagem inverteu-se na avaliação aos 35 dias, pois com apenas 15 dias em substrato as miniestacas provenientes de aeroponia tinham enraizado mais 3,8% que as do método tradicional.

Tabela 3 - Miniestacas enraizadas pelo método de aeroponia (Aero) e pelo método tradicional (Trad). O enraizamento aos 20 dias em aeroponia refere-se ao número de estacas que enraizou no sistema de aeroponia, esse enraizamento está incluído nas datas seguintes de avaliação.

Datas	N	20 dias		35 dias		40 dias		60 dias		90 dias	
		Aero	Trad	Aero	Trad	Aero	Trad	Aero	Trad	Aero	Trad
22-jul-20	80	42,5	65,0	73,8	65,0	73,8	72,5	76,3	72,5	77,5	72,5
11-ago-20	80	21,3	56,3	21,3	56,3	60,0	73,8	60,0	73,8	78,8	86,3
03-set-20	80	17,5	50,0	51,3	57,5	63,8	65,0	67,5	75,0	72,5	76,3
28-set-20	80	40,0	8,8	56,3	40,0	77,5	47,5	86,3	67,5	87,5	72,5
20-out-20	80	20,0	1,3	57,5	33,8	71,3	48,8	77,5	55,0	82,5	60,0
11-nov-20	120	15,8	0,0	35,8	25,8	55,0	45,8	60,0	51,7	66,7	63,3
02-dez-20	120	7,5	0,0	15,8	6,7	40,8	22,5	77,5	59,2	88,3	65,0
Média		23,5	25,9	44,5	40,7	63,2	53,7	72,1	64,9	79,1	70,8

Tabela 4 - Miniestacas mortas no método de aeroponia e pelo método tradicional. A mortalidade aos 20 dias em aeroponia refere-se ao número de miniestacas que morreu no sistema de aeroponia, essa mortalidade está incluída nas datas seguintes de avaliação.

As médias assinaladas com a mesma letra são estatisticamente iguais (Kruskal-Wallis: $p < 0,05$).

Datas	N	20 dias		35 dias		40 dias		60 dias		90 dias	
		Aero	Trad	Aero	Trad	Aero	Trad	Aero	Trad	Aero	Trad
22-jul-20	80	1,3	0,0	5,0	0,0	5,0	0,0	17,5	0,0	17,5	23,8
11-ago-20	80	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,8
03-set-20	80	0,0	0,0	3,8	0,0	10,0	1,3	10,0	2,5	12,5	5,0
28-set-20	80	6,3	6,3	6,3	12,5	6,3	13,8	6,3	13,8	11,3	13,8
20-out-20	80	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	16,3
11-nov-20	120	7,5	0,0	7,5	0,0	13,3	0,8	15,8	3,3	19,2	14,2
02-dez-20	120	2,5	0,0	2,5	0,8	2,5	0,8	2,5	1,7	3,3	3,3
Média		2,5	0,9	3,6	1,9	5,3	2,4	7,4	3,0	9,8^a	11,4^a

A superioridade do método de aeroponia foi consistente em todas as avaliações seguintes e por fim aos 90 dias foi possível obter mais 8,3% de miniestacas enraizadas pelo método de aeroponia do que pelo método tradicional (Figura 8). Este ganho em miniestacas enraizadas pelo método de aeroponia, mesmo não sendo estatisticamente superior, revela maior capacidade e rapidez na emissão radicular.

O enraizamento inicial no sistema de aeroponia nas três últimas estacarias reforçou a vantagem da aeroponia pela maior amplitude da diferença ao método tradicional. Isto parece dever-se ao facto destas miniestacas pelo método tradicional, ao contrário do que aconteceu até este ponto, aos 20 dias não terem ainda iniciado a formação de *callus*. O sistema de aeroponia parece assim apresentar

maiores vantagens em determinadas estações do ano, quando as condições climáticas da estufa, embora controladas, não são tão favoráveis quanto as do sistema de aeroponia.

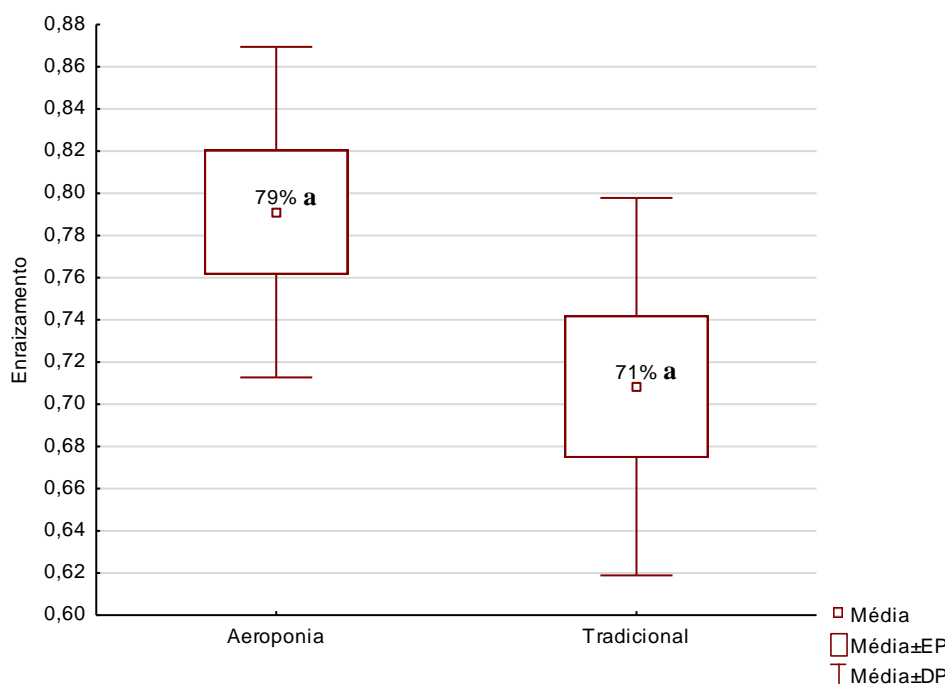


Figura 8 - Enraizamento médio 90 dias após a estacaria para as miniestacas dos dois métodos de propagação em estudo. As médias assinaladas com a mesma letra são estatisticamente iguais.

A morte de miniestacas não foi evitada para nenhum dos métodos de propagação (Tabela 4). No método de aeroponia, foi gradual e crescente ao longo do tempo. Em média houve 2% de miniestacas mortas a cada avaliação, atingindo os 9,8% aos 90 dias. Porém, a maior taxa de mortalidade acabou por se verificar no método tradicional com 11,4% de miniestacas mortas aos 90 dias. A mortalidade das miniestacas do método tradicional foi diminuta ao longo do tempo (em média 2% a cada avaliação) e acentuou-se entre os 60 e os 90 dias. Não houve significância estatística entre os dois tratamentos (Kruskal-Wallis: $p < 0.05$).

Provavelmente esta mortalidade tardia no método tradicional está relacionada com a menor taxa de enraizamento anterior e também a transferência de ambiente. Todas as miniestacas aos 60 dias foram retiradas da estufa de enraizamento, onde o ambiente é mais húmido e a incidência da luz é reduzida, e foram transferidas para uma área de atempamento, com condições ambientais adequadas a plantas completas.

A mortalidade durante a permanência das miniestacas no sistema de aeroponia deveu-se a dois fatores, por um lado, o apodrecimento da base da miniestaca, que detetado precocemente pode ser revertido cortando-se a zona afetada, e, por outro lado, a desidratação que pode ocorrer pelo deslizamento do sistema de aspersão ou pelas temperaturas elevadas que podem ocorrer no interior da campânula nos meses mais quentes.

Clones de mini-estacaria iPLANT

No âmbito do projeto iPLANT os trabalhos em mini-estacaria incidiram principalmente sobre um grupo de materiais genéticos RAIZ e Viveiros do Furadouro. Esses materiais genéticos foram incluídos neste ensaio de comparação entre o sistema de aeroponia e o método tradicional de propagação por mini-estacaria. Na

Tabela 5 estão identificados os materiais genéticos e as datas de estacarias onde estes materiais foram incluídos.

No geral estes clones tiveram um bom comportamento quando aplicado o método de aeroponia, em todos o enraizamento foi superior aos 50%. O híbrido H1205 foi a exceção enraizando mais miniestacas pelo método tradicional e todos os outros clones obtiveram mais miniestacas enraizadas pelo método de aeroponia. Inclusivamente, o enraizamento pelo método de aeroponia foi estatisticamente superior para os clones AC-58, G09, G74 e GM2-58 (

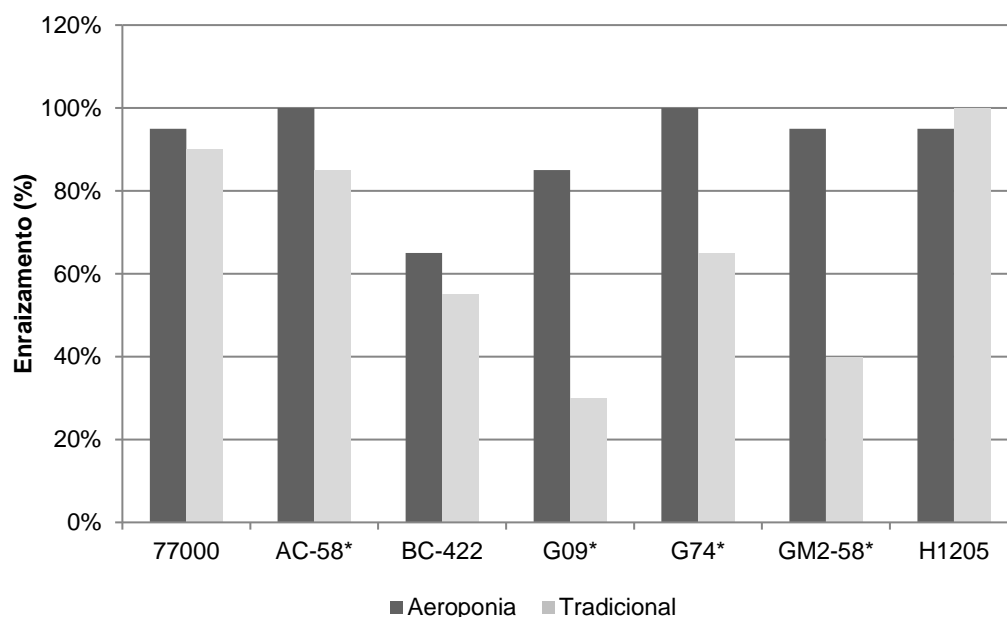


Figura 9). O clone G09 foi o clone onde a amplitude da diferença entre os dois métodos foi mais acentuada, pelo método de aeroponia enraizaram mais 55% das miniestacas que pelo método tradicional.

Tabela 5. Calendário de estacarias e número de estacas em cada tratamento.

Clone	Data de estacaria	Método tradicional	Método aeroponia
77000	28-set-21	10	10
	20-out-21	10	10
AC-58	11-nov-21	10	10
	2-dez-21	10	10
BC-422	11-nov-21	10	10
	2-dez-21	10	10
G09	11-nov-21	10	10
	2-dez-21	10	10
G74	22-jul-21	10	10
	20-out-21	10	10
GM2-58	11-nov-21	10	10
	2-dez-21	10	10

H1205	11-ago-21	10	10
	20-out-21	10	10

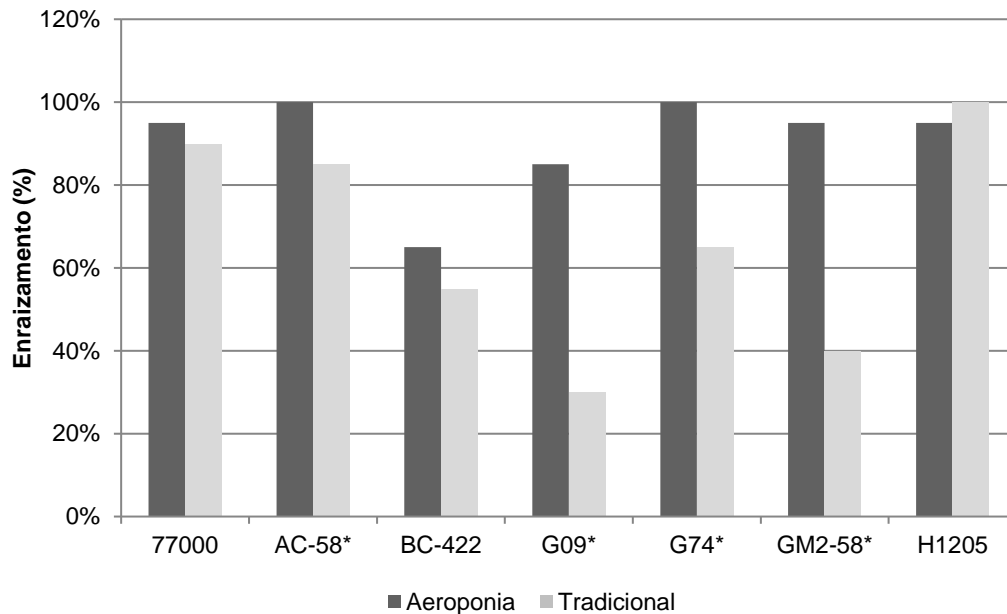


Figura 9 - Enraizamento dos clones trabalhados em mini-estacaria nos dois métodos de propagação em estudo. O enraizamento dos clones assinalados com um asterisco (*) é estatisticamente diferente nos dois tratamentos.

A mortalidade pelo método de aeroponia restringiu-se ao clone BC-422, em nenhum dos outros clones houve miniestacas mortas. Para este clone a mortalidade foi superior no método de aeroponia, mais 10% que no método tradicional. Contudo, esta mortalidade foi tardia, o que se pode associar à falta de enraizamento das miniestacas. Nas miniestacas do método tradicional, a mortalidade foi mais frequente, em quatro dos sete clones houve miniestacas mortas (

Tabela 6).

Tabela 6 - Mortalidade dos clones trabalhados em mini-estacaria nos dois métodos de propagação em estudo.

	77000	AC-58	BC-422	G09	G74	GM2-58	H1205
Aeroponia	0,0	0,0	15,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tradicional	0,0	0,0	5,0	10,0	10,0	40,0	0,0

Influência da estação do ano no enraizamento

A temperatura é um parâmetro ambiental muito importante no processo de enraizamento. Em períodos climaticamente menos favoráveis é necessário recorrer a aquecimento artificial para garantir condições adequadas ao enraizamento e desenvolvimento das miniestacas. O sistema de aeroponia funciona como tampão à diminuição da temperatura e, como consequência, a média do enraizamento

aos 20 dias mantém-se no outono. Pelo contrário, no outono o enraizamento no método tradicional diminuiu drasticamente aos 20 dias e esta tendência decrescente manteve-se em todas as datas de avaliação (Tabela 7).

Os dois métodos de propagação parecem funcionar em contra-ciclo nas duas estações do ano, verão e outono (Tabela 7). O enraizamento pelo método de aeroponia, no outono, representa um ganho, estatisticamente significativo, de 16% em relação ao método tradicional (Figura 10). A diferença entre os dois tratamentos pode estar relacionada com a indução mais rápida e eficaz que ocorre no método de aeroponia, beneficiando estas miniestacas em períodos climatericamente considerados menos favoráveis.

Tabela 7 - Comparação do enraizamento pelo método de aeroponia e pelo método tradicional no verão e outono. As médias assinaladas com * são estatisticamente diferentes (Kruskal-Wallis: $p < 0,05$).

	20 dias		35 dias		45 dias		60 dias		90 dias	
	Aero	Trad	Aero	Trad	Aero	Trad	Aero	Trad	Aero	Trad
Verão	27,1	57,1*	48,8	59,6*	65,8	70,4*	67,9	73,8*	76,3	78,3
Outono	20,8	2,5*	41,4	26,6*	61,1	41,1*	75,3	58,3*	81,3	65,2

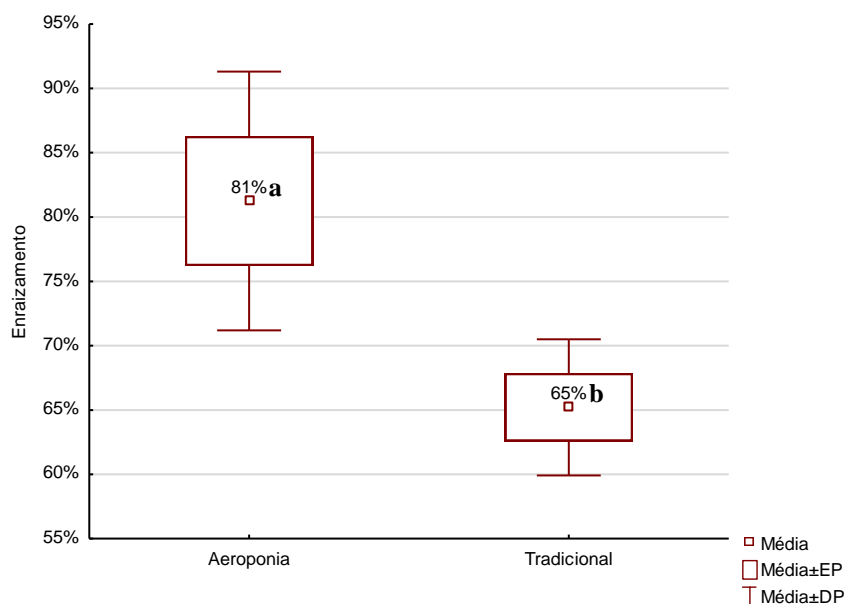


Figura 10 - Enraizamento médio aos 90 dias das estacarias de outono. As médias são estatisticamente diferentes (Kruskal-Wallis: $p < 0,05$).

CONCLUSÕES

A diversidade de espécies e híbridos do género *Eucalyptus* com que o sistema de aeroponia foi testado neste trabalho permitiram confirmar que este sistema permite uma emissão radicular mais célere, induzindo uma taxa de enraizamento superior e, consequentemente, a uma sobrevivência mais elevada.

Um aspeto a ser aprofundado no sistema de aeroponia corresponde às condições ambientais. Será importante melhorar o controlo dos valores de humidade e temperatura para maximizar o sucesso da

emissão radicular. Isto é, a indução radicular deve ser proporcionada pelo estímulo do tratamento com auxina, mas as condições em aeroponia devem favorecer a continuidade desse processo, conduzindo as miniestacas ao enraizamento. O processo de enraizamento é complexo e com diversas variáveis, também dependentes do estado fisiológico do material vegetal. Assim, nunca serão apenas as condições ambientais a determinar o seu sucesso mas poderão, pelo menos, não ser limitantes ao mesmo.

Os resultados até aqui obtidos sugerem que a aeroponia pode apresentar-se como uma otimização do processo da miniestacaria. A otimização das condições do sistema para eucalipto, bem como a simplificação do manuseamento do material vegetal, devem ser o foco dos trabalhos futuros a desenvolver para a eventual aplicação do processo numa escala piloto de produção.

REFERÊNCIAS

1. N. M. G. Borralho. M. H. Almeida. B. M. Potts. O melhoramento do eucalipto em Portugal. in AM Alves and JS Pereira and JMN Silva (eds.). Eucaliptal em Portugal: Impactos Ambientais e Investigação Científica . ISAPress. Lisboa (2007).
2. I. A. Lakhiar. J. Gao. T. N. Syed. F.A. Chandio. N. A. Butta. Modern plant cultivation technologies in agriculture under controlled environment: areview on aeroponics. *Journal of Plant Interactions*. **13**(1): 338-532 (2018).
3. J. Barros. P. Fontes. P. Cecon. J. Ferreira. M. Montgomery. Yield of Potato Minitubers under Aeroponics. Optimized for Nozzle Type and Spray Direction. *HortScience*. **55**(1):14-22 (2020).
4. P. Mehandru. N. S. Shekhawat. M. K. Rai. V. Kataria. H. S. Gehlot. Evaluation of aeroponics for clonal propagation of *Caralluma edulis*, *Leptadenia reticulata* and *Tylophora indica* - three threatened medicinal Asclepiads. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. **20**(3): 365-373 (2014).
5. A. Del Valle-Echevarria. M. Kantar. J. Branca. S. Moore. M. Frederiksen. L. Hagen. T. Hussain. D. Baumler. Aeroponic Cloning of *Capsicum* spp.. *Horticulturae*. **5**: 2-7 (2019).
6. S. Srikanth. T. W. Choong. A. Yan. J. He. Z Chen. An Efficient Method for Adventitious Root Induction from Stem Segments of Brassica Species. *Frontiers in Plant Science*. **7**(943): 1-11 (2016).
7. H. Tokunaga. N. H. Anh. N. Van Dong. L. H. Ham. N. Hanh. N. Hung. M. Ishitani. L. N. Tuan. Y. Utsumi. N. A. V. M. Seki. An efficient method of propagating cassava plants using aeroponic culture. *Journal of Crop Improvement*. **34**(1): 64–83 (2020).
8. U. Sharma. V. Kataria. N. S. Shekhawat. Aeroponics for adventitious rhizogenesis in evergreen haloxerictree *Tamarix aphylla*(L.) Karst.: influence of exogenous auxins and cutting type. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. **24**(1): 167-174 (2018).
9. R. R. Sokal. F.J. Rohlf. Biometry, 2nd ed. San Francisco: Freeman. (1981).