

Colombo, PR / Novembro, 2024

Micropropagação de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage

Juliana Degenhardt⁽¹⁾, Ana Carolina dos Santos de Melo⁽²⁾, Bruna Zanatta Pereira⁽³⁾ e Paulo Eduardo Telles dos Santos⁽¹⁾

⁽¹⁾Pesquisadores da Embrapa Florestas, Colombo, PR. ⁽²⁾Estudante de graduação, Universidade Positivo, Curitiba, PR. ⁽³⁾Estudante de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

Introdução

A cultura de tecidos abrange varias tecnicas, utilizadas para propagar plantas sob condições controladas, capaz de produzir um grande número de plantas geneticamente idênticas, e tem sido utilizada com sucesso para espécies do gênero *Eucalyptus*. Esta técnica de clonagem in vitro é realizada em condições de laboratório, em frascos contendo meio de cultura com concentrações determinadas de macro e micronutrientes, uma fonte de carboidrato e um agente solidificante, podendo ainda conter ou não reguladores de crescimento vegetal, vitaminas e outros componentes.

A micropropagação envolve várias etapas, incluindo o estabelecimento dos explantes (partes da planta) no cultivo in vitro, a regeneração de brotos e sua multiplicação, e o enraizamento que pode ser feito in vitro ou ex vitro, em casa-de-vegetação. O processo tem início com a seleção de uma planta doadora saudável da qual os explantes (partes da planta) são retirados. Após serem esterilizados, estes são introduzidos no meio de cultura para dar início ao processo.

A clonagem por micropropagação oferece várias vantagens, especialmente no contexto da silvicultura comercial. Uma das principais é a possibilidade de produção em larga escala de mudas geneticamente idênticas, o que garante uniformidade nas plantações, resultando em árvores com características desejáveis, como tolerância a pragas, rápido crescimento e alta

produtividade de madeira. Além disso, a micropropagação permite a multiplicação de genótipos superiores que, de outra forma, poderiam ser perdidos devido à baixa disponibilidade de sementes ou à dificuldade de propagação por métodos convencionais. Isso é particularmente relevante na clonagem de plantas com características superiores, selecionadas em programas de melhoramento. Outro benefício importante é a possibilidade de realizar um controle rigoroso das condições de cultivo in vitro, o que minimiza a contaminação por fungos, bactérias e leveduras.

Eucalyptus benthamii é uma espécie nativa da Austrália que tem atraído a atenção devido ao seu rápido crescimento, tolerância a geadas e às propriedades da sua madeira, adequadas para diversas aplicações, tais como fins energéticos e obtenção de peças roliças para diversos usos. Esta espécie é relativamente nova em plantações florestais, havendo limitações na produção de sementes e mudas; e quando as sementes estão disponíveis, os preços costumam ser altos. A ausência de protocolos eficientes de clonagem tem limitado avanços nos programas de melhoramento utilizando esta espécie (Brondani et al., 2012). Embora seja um componente importante de plantações florestais em regiões frias, sua utilização é limitada pela dificuldade em se obter plantas clonais, especialmente devido à baixa capacidade de enraizamento (Brondani et al., 2012).

A multiplicação de *E. benthamii* por propagação vegetativa é essencial, especialmente quando se busca a produção em larga escala e a manutenção das características desejáveis da planta, e pode ser realizada por meio de vários métodos, incluindo estaquia e micropropagação. A estaquia vem sendo aplicada para a propagação vegetativa desta espécie, no entanto, as taxas de enraizamento variam muito dependendo da época do ano, da idade da estaca, do genótipo, das condições ambientais e da presença de hormônios de crescimento.

A micropropagação é bastante explorada para o gênero *Eucalyptus*. No entanto, existem poucos relatos na literatura sobre a utilização desta técnica para *E. benthamii* (Brondani et al., 2009, 2011, 2012; Baccarin et al., 2015) e para o gênero (Oliveira et al., 2015, 2016; Gallo et al., 2017; Di Gaudio et al., 2020). Nestes trabalhos, entre os parâmetros avaliados, estão o meio de cultura e os reguladores de crescimento vegetal. O enraizamento costuma ser um gargalo mesmo utilizando esta técnica, sendo necessárias etapas de alongamento e enraizamento, com reguladores de crescimento específicos, além daqueles já utilizados na etapa de multiplicação.

Otimizar os meios e as condições de cultivo pode se complexo e exigir extensiva tentativa e erro. Diferenças entre espécies e até variedades/clones podem levar a respostas variáveis exigindo a otimização de meios para cada genótipo. A etapa de enraizamento, assim como na estaquia, costuma ser um gargalo. A etapa de aclimação também pode representar um desafio.

Além disso, a fidelidade genética das plantas regeneradas pode ser uma preocupação, já que a variação somaclonal — variações genéticas que ocorrem em cultura de tecidos — pode levar a diferenças em relação ao genótipo original, podendo afetar a uniformidade e a qualidade do material plantado. Esse fator normalmente é diminuído com o manejo adequado do sistema, mantendo-se o controle rigoroso do número máximo de subcultivos (tempo no meio de multiplicação) e utilizando-se a menor quantidade de reguladores de crescimento vegetal, antes de enraizar o material e levá-lo para a casa-de-vegetação.

Vale ressaltar que a técnica de micropropagação exige equipamentos especializados, ambiente controlado e conhecimento técnico, o que pode resultar em altos custos iniciais e operacionais.

O presente estudo apresenta um protocolo de micropropagação de *E. benthamii*, no qual o alongamento e o enraizamento das microestacas

ocorrem no mesmo meio de multiplicação, com a adição de carvão ativado.

Materiais, equipamentos e reagentes necessários

O protocolo de micropropagação descrito nesta metodologia necessita da estrutura básica de um laboratório de cultura de tecidos, com os seguintes equipamentos: capela de fluxo laminar, balança, pHmetro, agitador magnético, autoclave, BOD ou sala climatizada. São necessárias vidrarias e outros materiais, como: pipetas, beakers, provetas, tubos de ensaio, potes de vidro autoclavável com tampa, placas de Petri, pinças e bisturis.

Os materiais devem ser previamente limpos e autoclavados, com exceção das tampas dos potes de vidro e as vidrarias graduadas. Para a esterilização, as tampas são lavadas com água e sabão e imersas em água clorada 5% (50 mL de hipoclorito de sódio comercial para 1.000 mL de água) por, pelo menos, 2–3 horas. É recomendado que as tampas sequem em capela de fluxo laminar, sob luz UV. Para o preparo dos meios de cultura utilizados neste protocolo, são necessários os seguintes reagentes: sais e vitaminas do meio Woody Plant Medium (WPM; Lloyd e Mc Cown, 1981), (Tabela 1), sacarose, 6-Benzilaminopurina (BAP), ácido naftaleno acético (ANA), carvão ativado, ágar e água destilada autoclavada. Para a assepsia, são necessários também: hipoclorito de sódio e etanol 70%.

Tabela 1. Concentração final dos reagentes no meio de cultura WPM.

Reagentes	Concentração (mg/L)
Microelementos	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,25
FeNaEDTA	36,70
H ₃ BO ₃	6,20
MnSO ₄ ·H ₂ O	22,30
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,60
Macroelementos	
CaCl ₂	72,50
Ca(NO ₃) ₂ ·2H ₂ O	471,26
KH ₂ PO ₄	170,00
K ₂ SO ₄	990,00
MgSO ₄	180,54
NH ₄ NO ₃	400,00
Vitaminas	
Glicina	2,00

Continua...

Tabela 1. Continuação.

Reagentes	Concentração (mg/L)
Vitaminas	
Mio-inositol	100,00
Ácido nicotínico	0,50
Piridoxina HCl	0,50
Tiamina HCl	1,00

Preparo do meio de cultura de germinação de sementes (para 1 L de solução)

Adicionar os macro e microelementos e as vitaminas do meio WPM (Tabela 1) em um Becker de 2 L. Adicionar 30 g de sacarose e dissolver, sob agitação, em 700 mL de água destilada. Ajustar o pH em 5,6–5,8 e, em seguida, adicionar 7 g de ágar e completar para 1 L com água deionizada, utilizando-se uma proveta ou balão volumétrico. Após o preparo, distribuir o meio em tubos de ensaio. A quantidade dependerá da capacidade do frasco, respeitando a proporção de aproximadamente $\frac{1}{4}$ do volume com meio de cultura. Tampar os frascos e autoclavá-los sob temperatura de 120 °C e 1 atm de pressão, por 20 minutos, antes do uso.

Observação – ao invés de sementes, podem ser usadas microestacas de casa-de-vegetação introduzidas no cultivo in vitro.

Preparo do meio de cultura de multiplicação (para 1 L de solução)

Em um Becker de 2 L, adicionar os macro e microelementos e as vitaminas do meio WPM (Tabela 1). Acrescentar 30 g de sacarose, 0,1 g de mio-inositol, 2,2 μM de 6-Benzilaminopurina (BAP), 0,27 μM de ácido naftaleno acético (ANA) e dissolver, sob agitação, em 700 mL de água destilada. Na sequência, o pH deve ser ajustado em 5,6–5,8. Em seguida, adicionar 7 g de ágar e completar para 1 L com água deionizada, utilizando-se uma proveta ou balão volumétrico. Verter o meio em frascos de cultivo, com 30 mL/frasco, fechar e autoclavar sob temperatura de 120 °C e 1 atm de pressão, por 20 minutos.

Preparo do meio de cultura de alongamento e enraizamento (para 1 L de solução)

Os procedimentos para o preparo deste meio são os mesmos do meio anterior. No entanto, antes de adicionar os 700 mL de água, adicionar 1,5 g/L de carvão ativado.

É importante que os meios estejam frescos e que sejam usados em até duas semanas. Devem ser mantidos em local fresco, sob temperatura ambiente e preferencialmente no escuro.

Protocolo de micropropagação

Assepsia e inoculação de sementes

Para a desinfestação das sementes de *E. benthamii*, deixá-las em um Becker coberto com uma peneira e mantê-las sob água corrente por 30 minutos. Em seguida, levar as sementes à câmara de fluxo laminar onde são imersas em um Becker contendo 250 mL de etanol 70%, por 50 segundos. Em seguida, as sementes são imersas em um Becker contendo 250 mL de uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 5%, por 20 minutos, agitando-se a cada 1 minuto. Finalmente, as sementes devem ser lavadas por três vezes, em frascos contendo 250 mL de água deionizada autoclavada, para eliminar o resíduo do NaOCl. Após a assepsia, as sementes devem ser inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura de micropropagação. Após a inoculação, os tubos de ensaio devem ser monitorados diariamente, para a retirada e descarte de sementes contaminadas. As culturas devem ser mantidas sob temperatura de 23°C \pm 2°C, com fotoperíodo de 16 horas e intensidade de luz de 40 $\mu\text{mol m}^2/\text{s}$, em equipamento BOD ou em sala climatizada.

Nos estudos realizados no laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação da Embrapa Florestas, utilizando-se este protocolo de assepsia, a contaminação por fungos e bactérias foi inferior a 7%.

Multiplicação in vitro

Após a germinação in vitro, as raízes das plântulas devem ser cortadas em capela de fluxo laminar, com auxílio de pinça e bisturi, sobre placa de Petri, previamente esterilizada por autoclavagem. As partes aéreas (microestacas) devem ser, então,

colocadas no meio de cultura de micropropagação. Após um mês será observado o surgimento de novas brotações. Para a clonagem, as brotações (microestacas) devem ser individualizadas, se tiverem comprimento maior que 0,5 cm. Caso ainda não tenham atingido este tamanho, não deverão ser individualizadas, mas repicadas para meio fresco de mesma composição. A repicagem (transferência para meio de cultura novo, de mesma composição) deverá ser realizada a cada 30 dias, sendo sempre

individualizados os explantes de aproximadamente 0,5 cm de comprimento. Para as repicagens, tanto a parte apical quanto as porções inferiores das microestacas podem ser utilizadas, mantendo-se um comprimento mínimo de 0,5 cm (Figuras 1A e 1B).

No caso de serem utilizadas miniestacas de casa-de-vegetação para a introdução do material no cultivo in vitro, após aproximadamente um mês, das estacas que tiverem a formação de novas brotações, estas deverão ser retiradas e colocadas no

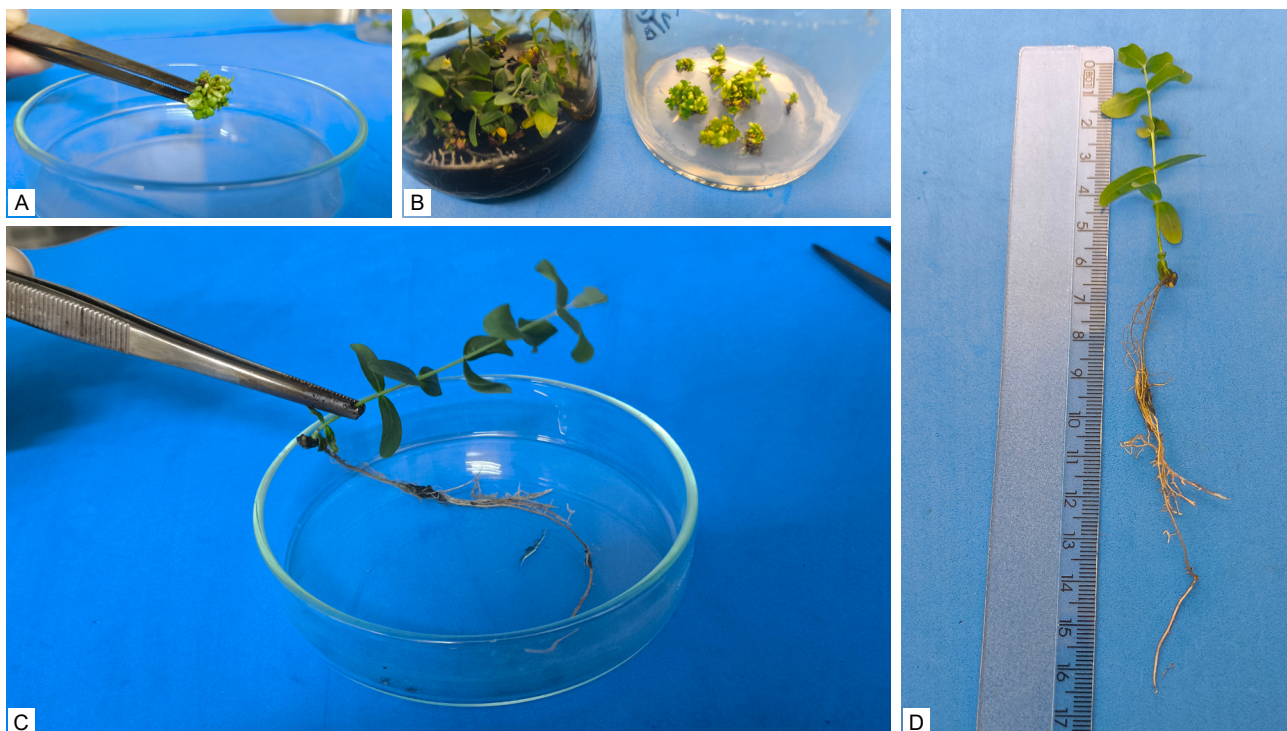


Figura 1. Etapas da micropropagação de *Eucalyptus benthamii*. Fase de multiplicação in vitro mostrando brotações múltiplas em um explante após 1 mês de cultivo (A); fase de multiplicação e de alongamento e enraizamento in vitro (B); explante no meio de alongamento, após 1,5 mês de cultivo (C); detalhe do comprimento do explante em meio de alongamento e enraizamento (D).

meio de multiplicação, conforme descrito no parágrafo anterior. A partir de então, seguir com o protocolo conforme descrito.

Alongamento e enraizamento

Após a obtenção de um número suficiente de brotações no meio de multiplicação, as brotações com comprimento mínimo de 0,5 cm devem ser individualizadas e colocadas no meio de alongamento e enraizamento. Após transferidas para este meio, podem permanecer entre um e dois meses até que sejam observados o alongamento e enraizamento das microestacas (Figuras 1B, 1C e 1D).

Todo o protocolo deverá ser conduzido em sala de crescimento sob temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$,

com fotoperíodo de 16 horas e intensidade de luz de $40 \mu\text{mol m}^{-2}/\text{s}$.

Resultados prévios obtidos nos estudos básicos para este protocolo indicaram que é possível manter as plantas sem subcultivos e sem perda de viabilidade do material vegetal, por até dois meses, sem repicagem para o novo meio de cultura de multiplicação. Utilizando-se este protocolo, foi observada a formação de novas brotações em 95% dos brotos iniciais já no primeiro subcultivo. Em relação ao número médio de brotações por explante e altura média das brotações em três subcultivos, foi observada uma taxa de multiplicação de até 6,67 brotações por mês e um comprimento médio de 0,82 cm por brotação, a cada subcultivo.

O alongamento e o enraizamento das brotações ocorreram no meio de multiplicação acrescido de carvão ativado. Após um mês no meio, as brotações apresentaram até 2,35 cm de comprimento em até 35% dos explantes.

No protocolo de micropropagação aqui apresentado é possível, em poucos passos e com a utilização de reagentes de menor custo, como o carvão ativado, obter o alongamento e o enraizamento de *E. benthamii* sem a adição de reguladores de crescimento extras, como o ácido giberélico e o ácido indol-butírico, utilizados em protocolos convencionais. Além disso, o protocolo não necessita de uma etapa de alongamento, uma vez que o alongamento e o enraizamento ocorrem no mesmo meio de cultura.

Esse trabalho apresenta uma metodologia de clonagem in vitro de eucalipto, que pode ser usada para atingir níveis mais elevados de produtividade desta cultura, indicando o uso eficiente dos recursos naturais, com forte alinhamento à uma das metas do ODS 12 (Objetivo de Desenvolvimento Sustentável estabelecidos pela Agenda 2030 das Nações Unidas (ONU)).

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por conceder bolsa do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (Pibic) à Ana Carolina Melo dos Santos.

Referências

BACCARIN, F. J. B.; BRONDANI, G. E.; DE ALMEIDA, L. V.; VIEIRA, I. G.; OLIVEIRA, L. S.; ALMEIDA, M. Vegetative rescue and cloning of *Eucalyptus benthamii* selected adult trees. **New Forests**, v. 46, p. 465–483, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11056-015-9472-x>.

BRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, J. Estabelecimento, multiplicação e alongamento in vitro de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage × *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, v. 33, n. 1, p. 11–19, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-67622009000100002>.

BRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; GROSSI, F. Micropropagation of an *Eucalyptus* hybrid (*Eucalyptus benthamii* × *Eucalyptus dunnii*). **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 33, n. 4, p. 655–663, 2011. DOI: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v33i4.8317>.

BRONDANI, G. E.; ONDAS, H. W.; BACCARIN, F.; GONÇALVES, A.; ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v. 48, n. 5, p. 478–487, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-012-9449-9>.

DI GAUDIO, A.; TUBERT, E.; LAINO, L.; CHAÍN, J.-M.; PITTA, S.; AMODEO, G.; REGALADO GONZALEZ, J. J. A new and rapid micropropagation protocol for *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. **Forest Systems**, v. 29, n. 1, eSC04, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.5424/fs/2020291-15965>.

GALLO, R.; XAVIER, A.; MOURA, L. C.; OLIVEIRA, B. A.; NASCIMENTO, H. R.; OTONI, W. C. IBA and microcutting collections in the micropropagation of *Eucalyptus* spp. hybrids clones. **Revista Árvore**, v. 41, n. 6, e410605, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1806-90882017000600005>.

LLOYD, G.; MC COWN B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendro* spp. **HortScience**, v. 15, n. 3, p. 416, 1981.

OLIVEIRA, C. de; DEGENHARDT-GOLDBACH, J.; BETTENCOURT, G. M. F.; AMANO, E.; FRANCISCON, F.; QUOIRIN, M. Micropropagation of *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* AEC 224 clone. **Journal of Forestry Research**, v. 28, p. 29–39, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11676-016-0282-6>.

OLIVEIRA, L. S. de; BRONDANI, G. E.; BATAGIN-PIOTTO, K. D.; CALSAVARA, R.; GONÇALVES, A. N.; DE ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus cloeziana* mature trees. **Australian Forestry**, v. 78, n. 4, p. 219–231, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1080/00049158.2015.1073211>.

Embrapa Florestas

Estrada da Ribeira, Km 111, Guaraituba
Caixa Postal 319
83411-000 Colombo, PR
Fone: (41) 3675-5600
www.embrapa.br/florestas
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Patrícia Póvoa de Mattos*

Vice-presidente: *José Elidney Pinto Júnior*

Secretário-executivo: *Elisabete Marques Oaida*

Membros: *Annete Bonnet, Cristiane Aparecida Fioravante Reis, Elenice Fritzsos, Guilherme Schnell e Schühli, Marilice Cordeiro Garrastazú, Sandra Bos Mikich, Susete do Rocio Chiarello Penteado, Valderés Aparecida de Sousa*

Comunicado Técnico 505

ISSN 1517-5030 / e-ISSN 1980-3982
Novembro, 2024

Edição executiva e revisão de texto: *José Elidney Pinto Júnior*

Normalização bibliográfica: *Francisca Rasche*
(CRB-9/1204)

Projeto gráfico: *Leandro Sousa Fazio*

Diagramação: *Celso Alexandre de O. Eduardo*

Publicação digital: PDF



**Ministério da Agricultura e
Pecuária**

Todos os direitos reservados à Embrapa.