



Ápices Caulinares como Alternativa para o Resgate de Matrizes Adultas de *Eucalyptus benthamii* Diretamente do Campo - Resultados Preliminares

Fabício Augusto Hansel¹
Leonardo Ferreira Dutra²
Ivar Wendling³

Introdução

Com o crescimento da demanda por produtos de origem florestal, tem-se uma maior procura por florestas plantadas. Dentre as espécies exóticas, as do gênero *Eucalyptus* estão difundidas por mais de 58 países, demonstrando seu potencial como matéria-prima de produtos florestais como celulose e madeira (KHUSPE et al., 1987). Entretanto, nem todas as espécies de *Eucalyptus* adaptam-se a climas com baixas temperaturas. Entre as que mostram tolerância ao frio, como *Eucalyptus macarthurii*, *E. smithii* e *E. benthamii*, este último tem mostrado excelente potencial em plantios experimentais realizados pela *Embrapa Florestas*, Colombo, PR, principalmente devido ao seu rápido crescimento (PALUDZYSZYN FILHO, 2003).

Entre as vantagens da adoção da propagação vegetativa como método de produção de mudas de espécies florestais, Hartmann et al. (1997) citam a fixação de genótipos selecionados, uniformidade de propagação, facilidade de propagação, antecipação do período de florescimento, combinação de mais de um genótipo numa

planta matriz e maior controle das fases de desenvolvimento. A propagação vegetativa é vista como de vital importância para programas de melhoramento genético. Entretanto, as técnicas convencionais de propagação vegetativa, como a estaquia e a miniestaquia, nem sempre permitem o rejuvenescimento necessário para a recuperação de material adulto, no qual as suas potencialidades já estão reconhecidas. Desse modo, a propagação clonal por meio da cultura de tecidos tem o potencial necessário para promover o rejuvenescimento e, conseqüentemente, o resgate vegetativo de indivíduos adultos selecionados (LE ROUX & VAN STADEN, 1991).

Um dos obstáculos da micropropagação na recuperação de plantas adultas é o estabelecimento do material. Os principais problemas com os explantes, na fase de estabelecimento, são a oxidação e a contaminação por fungos e/ou bactérias. Os propágulos vegetais comumente utilizados para a introdução *in vitro* são provenientes de mudas formadas por enxertia ou estaquia, na eventual busca de menores taxas de contaminação. Os explantes normalmente utilizados são os segmentos nodais que se constituem de uma porção

¹ Químico, Doutor, Técnico de Nível Superior da *Embrapa Florestas*. hansel@cnpf.embrapa.br

² Engenheiro-Agrônomo, Doutor, Pesquisador da *Embrapa Florestas*. leo@cnpf.embrapa.br

³ Engenheiro Florestal, Doutor, Pesquisador da *Embrapa Florestas*. ivar@cnpf.embrapa.br

da brotação, abaixo do ápice, contendo uma gema com aproximadamente 1 cm de comprimento de entrenó (Figura 1). Os segmentos nodais de *Eucalyptus* recuperados em campo apresentam grande taxa de contaminação na fase de estabelecimento, ocasionando, às vezes, a perda total do material introduzido. A utilização de métodos severos de desinfestação, como o tratamento com hipoclorito de cálcio saturado [$\text{Ca}(\text{ClO})_{2(\text{sat})}$] por 75 min., seguido de quatro horas de luz ultravioleta, reduzem a contaminação, mas podem inviabilizar a regeneração de novas brotações (HOLDEN & PATON, 1981).

Sendo a fase de estabelecimento do explante uma das etapas preponderantes para a proliferação e produção de mudas *in vitro*, tem-se como alternativa de fonte de explante, o ápice caulinar, que é menos suscetível à contaminação, mesmo quando os explantes são recuperados de matrizes estabelecidas em campo. Este consiste do meristema apical com primórdios foliares subjacentes que, em algumas situações, inclui as folhas emergentes (TORRES et al., 1998) (Figura 1 e 3H). A estrutura física, na qual o ápice caulinar está protegido por folhas emergentes, dificulta a contaminação por agentes como fungos e bactérias, que são difíceis de serem eliminados por tratamentos desinfestantes. Desse modo, a desinfestação do material não precisa ser severa, viabilizando o explante para a proliferação e produção de mudas.

Esse trabalho tem por objetivos demonstrar a viabilidade do sistema de estabelecimento de ápices caulinares, frente ao uso dos tradicionais segmentos nodais, no resgate de matrizes adultas de *E. benthamii* diretamente do campo e ilustrar os passos do procedimento para a introdução *in vitro* dos ápices caulinares.

Metodologia

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso com dez repetições, tendo dez explantes por repetição.

Os explantes foram retirados de brotações originárias de decepta de plantas matrizes de *E. benthamii*, com 17 anos de idade, localizadas no campo experimental da *Embrapa Florestas*, Colombo, PR. No laboratório, os explantes foram desinfestados da seguinte maneira: imersão em álcool 70% (1 min) e NaClO 2% (10 min) para o segmento nodal e NaClO 2% (5 min) para o ápice caulinar. Posteriormente, ambos foram enxaguados com água autoclavada três vezes, e introduzidos em meio de cultura WPM (McCOWN & LLOYD, 1981) acrescido de

50 mg L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP 40000); 0,05 μmol L⁻¹ de ácido-1-naftaleno acético (ANA) e 0,9 μmol L⁻¹ de 6-benzil-aminopurina (BAP) (Tabela 1).

Tabela 1. Composição do meio de cultura WPM utilizado no estabelecimento e na fase de proliferação dos ápices caulinares de *E. benthamii*.

Compostos	WPM (mg L ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	400
CaCl ₂ .2H ₂ O	96
Ca(NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	556
K ₂ SO ₄	990
KH ₂ PO ₄	170
H ₃ BO ₃	6,2
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
MnSO ₄ .H ₂ O	22,3
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,6
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27,8
Tiamina.HCl	1,0
Glicina	2,0
Ácido nicotínico	0,5
Piridoxina.HCl	0,5
Mio-inositol	100
Sacarose	20000
Ágar	7000
PVP 40000	50
Ácido-1-naftaleno acético (ANA)	0,05 μmol L ⁻¹
6-benzil-aminopurina (BAP)	0,90 μmol L ⁻¹
pH	5,8

Resultados e discussão

Aos 30 dias de cultivo, a taxa de contaminação por fungos ou bactérias nos segmentos nodais (SN) foi de 95% contra somente 3% nos explantes de ápice caulinar (AC) (Figura 1). Com relação à oxidação, esta foi maior nos AC (20%). Isto era esperado, uma vez que, na sua excisão, esses sofrem ferimentos, onde ocorre a oxidação imediata. A oxidação nos SN foi baixa (3%) devido à rusticidade dos tecidos e à desinfestação branda. Conseqüentemente, a proporção de explantes sadios foi superior nos AC (77%), contra somente 2% nos SN. Todos estes resultados são significativos pelo teste F ao nível de $p < 0,01$.

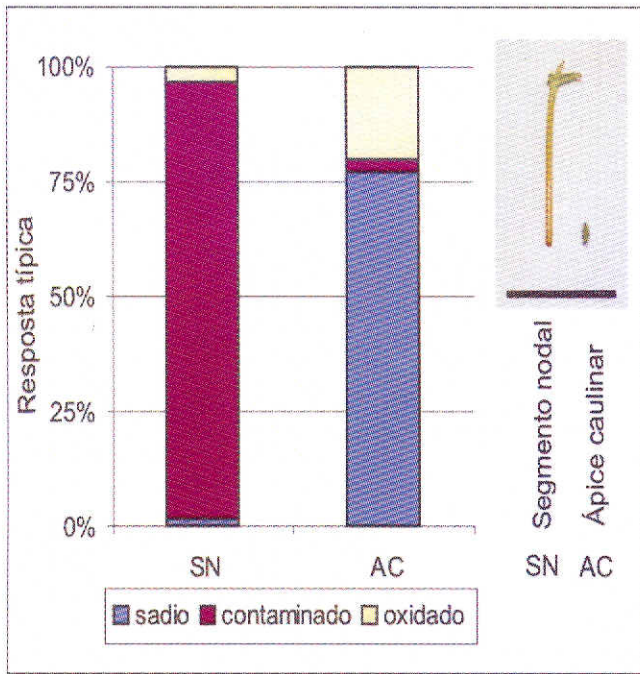


Figura 1. Percentagens de explantes saudáveis, contaminados e oxidados originários de uma árvore adulta de *E. benthamii* após 30 dias de estabelecimento. São mostrados em detalhe os tipos de explantes utilizados. A barra indica 1 cm.

Os ápices caulinares que sobreviveram seguiram para a etapa de proliferação, constatando-se a viabilidade de cultivo *in vitro* por um período de 11 meses, com um sub-cultivo por mês. A resposta aos fitorreguladores BAP e ANA na proliferação foi nula até o sexto mês, quando ocorreu uma elevação na produção de novas brotações, 4 brotos por explante. No mês seguinte essa diminuiu para 1 broto por explante, aumentando gradativamente nos subcultivos seguintes para 1,5 e 2,0 brotos por explante, aproximadamente, quando no 11º mês ocorreu o estacionamento na produção de novos brotos (Figura 2). Esses resultados demonstraram a estabilização do material *in vitro* por período aproximado de um ano, e apontaram que os ápices caulinares são melhores fontes de explantes do que os segmentos nodais, no que tange à contaminação, e que o seu sub-cultivo *in vitro*, na fase de

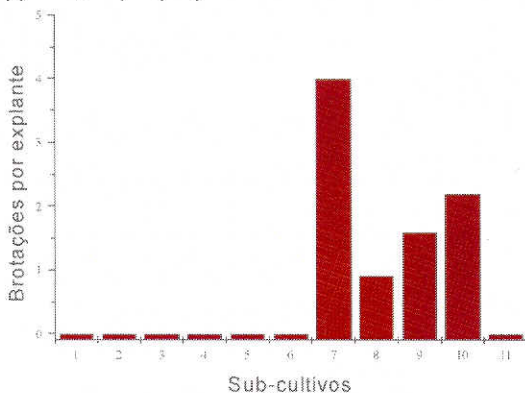


Figura 2. Razão da produção de brotações de ápice caulinar durante a fase de proliferação do material. Sub-cultivos a cada 30, dias aproximadamente

Considerando o estabelecimento do explante uma etapa determinante do processo e, sendo esse bem sucedido, as etapas subsequentes de proliferação, alongamento, enraizamento e aclimatização poderão ser devidamente estudadas com o objetivo final de criar um protocolo para o resgate de material adulto selecionado e produção de mudas de *Eucalyptus benthamii*.

A utilização do ápice caulinar no resgate de árvores adultas de *E. benthamii* diretamente do campo apresentou-se promissora para a produção de mudas via micropropagação. Embora sejam resultados preliminares, nada existe em relação a esta espécie e nem tampouco à técnica de cultivo de ápices caulinares na literatura.

Passos para o estabelecimento dos ápices caulinares *in vitro*

Após a seleção da planta matriz que se deseja resgatar, a brotação apical é seccionada e acondicionada em um frasco com tampa contendo água autoclavada (Figuras 3A, B e C). No laboratório, as brotações são transferidas para câmara de fluxo laminar, onde a desinfestação superficial é realizada (Figura 3D). Durante o manuseio do material na câmara de fluxo laminar, devem ser tomados cuidados extras para evitar contaminações no material, como o uso de máscaras de pó e a higiene das mãos (lavagem com sabonete e assepsia com álcool 70%).

Após a desinfestação, o primeiro corte da brotação apical é feito na base (Figuras 3E e F). Sucessivos cortes são realizados, sendo normalmente, três suficientes para se obter o ápice caulinar (Figura 3G). O terceiro corte é feito com o auxílio de uma lupa para facilitar a visualização do material e diminuir os danos ao explante, o que poderia causar perdas por oxidação no estabelecimento. Após o terceiro corte, o ápice caulinar (Figuras 3G e H) é introduzido em placas de Petri (dez explantes por placa, Figura 3I) contendo 10 mL do meio de cultura WPM com adição de polivinilpirrolidona (PVP) e fitorreguladores. Após a inoculação dos ápices caulinares, as placas de Petri são transferidas para sala de crescimento, sendo acondicionadas com a base voltada para cima, na ausência de luz, por um período de cinco dias. Nos cinco dias subsequentes, as placas são gradativamente expostas à luz (foto-período de 16 horas com intensidade luminosa de 84 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de 27 °C). A transferência de meio é feita a cada 15 dias e, após a segunda transferência (30 dias), os explantes são retirados das placas e introduzidos em tubos de ensaio (10 mL de meio WPM + fitorreguladores + PVP) para a fase de proliferação, na qual a transferência e/ou repicagem é realizada a cada 30 dias, aproximadamente.

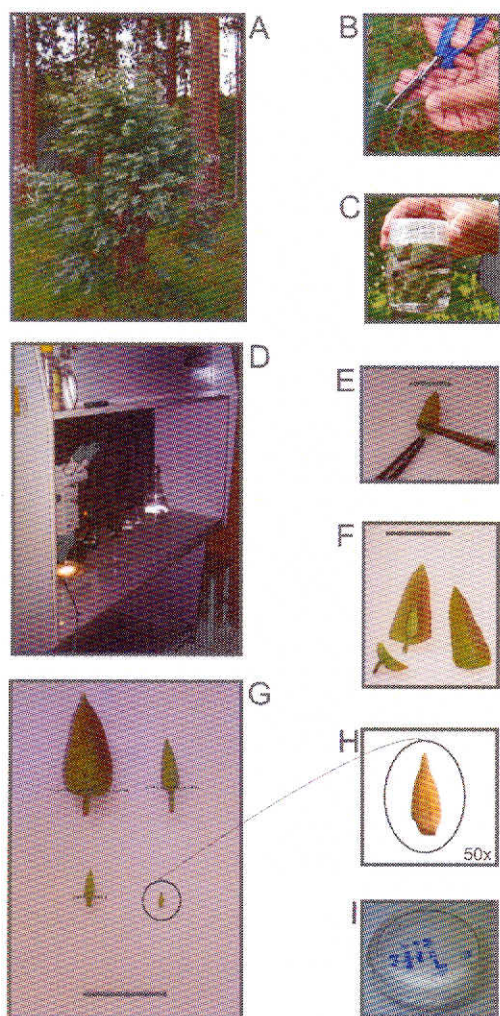


Figura 3. Esquema da introdução *in vitro* do ápice caulinar de uma árvore adulta de *E. benthamii*. (A) matriz selecionada; (B) corte da brotação apical; (C) acondicionamento em água autoclavada; (D) câmara de fluxo laminar; (E) primeiro corte da brotação apical; (F) detalhe da brotação após a primeira excisão; (G) três cortes sucessivos da brotação apical; (H) ápice caulinar aumentado 50 vezes; (I) placa de Petri com os explantes introduzidos. A barra nas fotos E, F e G indica 1 cm.

Agradecimentos

Os autores agradecem à equipe do Laboratório de Biotecnologia da empresa Suzano Papel e Celulose (Itapetininga, SP), a qual proporcionou o treinamento ao técnico Fabricio Augusto Hansel, e a Luiz Carlos Fracaro, pelo apoio técnico.

Referências

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 6. ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1997. 770 p.

HOLDEN, P. G.; PATON, D. M. Sterilization of field grown *Eucalyptus* for organ culture. **Journal of the Australian Institute of Horticulture**, v. 3, p. 5-7, 1981.

KHUSPE, S. S.; GUPTA, P. K.; KULKARNI, D. K.; MEHTA, U.; MASCARENHAS, A. F. Increased biomass production by tissue culture of *Eucalyptus*. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 17, p. 1361-1363, 1987.

LE ROUX, J. J.; VAN STADEN, J. Micropropagation and tissue culture of *Eucalyptus*: a review. **Tree Physiology**, v. 9, p. 435-477, 1991.

McCOWN, B. H.; LLOYD, C. Woody Plant Medium (WPM): a revised mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. **Hortscience**, v. 3, p. 453-453, 1981.

PALUDZYSZYN FILHO, E. Indicação de espécies para plantio. In: SANTOS, A. F. dos; SILVA, H. D. da; FERREIRA, C. A.; AUER, C. H.; BELLOTE, A. F. J.; FERRARI, M. P.; RIBASKI, J.; PALUDZYSZYN FILHO, E.; DOSSA, D.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; SANTANA, D. L. de Q.; ANDRADE, G. de C.; MEDRADO, M. J. S.; HIGA, R. C.; RESENDE, M. D. V. de. **Cultivo do eucalipto**. Colombo: Embrapa Florestas, 2003. (Embrapa Florestas. Sistemas de produção, 4). Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Eucalipto/CultivodoEucalipto/O2_indicacao_de_especies.htm>. Acesso em: 17 nov. 2005.

TORRES, A. C.; TEIXEIRA, S. L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CNPq, 1998. v. 1, p. 133-146.

Comunicado Técnico, 153

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na: **Embrapa Florestas**

Endereço: Estrada da Ribeira km 111 - CP 319

Fone / Fax: (0***) 41 3675-5600

E-mail: sac@cnpt.embrapa.br

Para reclamações e sugestões *Fale com o*

Ouvidor: www.embrapa.br/ouvidoria

1ª edição

1ª impressão (2005): conforme demanda



Comitê de publicações

Presidente: Luiz Roberto Graça
Secretária-Executiva: Elisabete Marques Oaida
Membros: Álvaro Figueredo dos Santos
Edilson Batista de Oliveira / Honorino R. Rodigheri
/ Ivar Wendling / Maria Augusta Doetzer Rosot /
Patrícia Póvoa de Mattos / Sandra Bos Mikich /
Sérgio Ahrens

Expediente

Supervisor editorial: Luiz Roberto Graça
Revisão texto: Mauro Marcelo Berté
Normalização bibliográfica: Elizabeth Câmara
Trevisan / Lidia Woronkoff
Fotos: Fabricio Augusto Hansel