

Nota técnica

APLICAÇÕES DA MICROPROPAGAÇÃO NA CLONAGEM DE *EUCALYPTUS* NO BRASIL

*Aloisio Xavier**, *Wagner Campos Otoni***

Palavras chave: Micropropagação, propagação in vitro, clonagem, silvicultura clonal.
Palabras clave: Micropropagación, propagación in vitro, clonación, silvicultura clonal.
Keywords: Micropropagation, in vitro propagation, cloning, clonal forestry.

Recibido: 29/06/09

Aceptado: 18/08/09

RESUMO

Atualmente no Brasil, dentre as várias técnicas de propagação in vitro, a micropropagação tem sido aquela de maior interesse científico e econômico, e na área florestal, a micropropagação é a técnica mais difundida e com aplicações práticas comprovadas. Os primeiros trabalhos foram desenvolvidos na década de 50, com a criação de vários laboratórios de cultura de tecidos no período de 1970 a 1980. Assim, este artigo visa levantar e fazer uma síntese das informações sobre as aplicações da micropropagação na clonagem de *Eucalyptus* nos programas de silvicultura clonal do Brasil.

RESUMEN

Aplicaciones de la micropropagación en la clonación de *Eucalyptus* en Brasil. Actualmente, en Brasil, dentro de las diversas técnicas de propagación in vitro, la micropropagación ha sido la que mayor interés científico y económico ha despertado en el campo forestal. De hecho, es la técnica más difundida por sus aplicaciones prácticas. Los primeros estudios fueron realizados en la década de los 50's. Entre 1970 y 1980 fueron establecidos algunos laboratorios de cultivo de tejidos. El presente trabajo es una revisión y una síntesis de la información de las aplicaciones de la micropropagación en la clonación de *Eucalyptus* en los programas de silvicultura clonal de Brasil.

ABSTRACT

Applications of micropropagation of *Eucalyptus* in clonal silviculture in Brazil. Presently, in Brazil, among several other in vitro propagation techniques, micropropagation has increased in scientific and economic interest for forestry. Actually, is the most used technique, due its proven practical applications. The first studies were carried out in the 50's; tissue culture laboratories were established during 1970-1980. This article is a review and a synthesis of information on micropropagation applications in *Eucalyptus* clonal silviculture in Brazil.

1. Autor para correspondência. Correio eletrônico: xavier@ufv.br

* Engenheiro Florestal, M.S., D.S. e Professor do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, Brasil.

** Engenheiro Agrônomo, M.S., D.S. e Professor do departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, Brasil.

INTRODUÇÃO

Entre as aplicações da propagação *in vitro* pela micropropagação na área florestal, destacam-se aquelas relacionadas com a: (1) conservação de germoplasma *in vitro*; (2) a aceleração dos programas de melhoramento pela multiplicação de clones superiores, visando à produção de mudas, ao rejuvenescimento de clones selecionados e ao potencial de obtenção de sementes sintéticas (embriões somáticos); (3) a limpeza clonal, na obtenção de culturas livres de microrganismos patogênicos, visando atender à demanda por um processo de propagação clonal sustentável; (4) a possibilidade de patenteamento de processos/materiais obtidos por meio da biotecnologia; (5) servirem como base para outras técnicas biotecnológicas, como a transformação genética (Penchel et al. 2007, Xavier et al. 2009).

Em vista da potencialidade da aplicação das técnicas de propagação *in vitro* em espécies florestais, inúmeros trabalhos têm sido desenvolvidos no intuito de tornar esta tecnologia acessível e economicamente viável. No entanto, algumas desvantagens e dificuldades deste processo podem ser enumeradas, como o alto investimento em instalações e treinamento de pessoal, a necessidade de desenvolvimento de protocolos diferenciados para diferentes espécies ou grupos de clones, a recalcitrância das culturas à propagação *in vitro* de espécies lenhosas e os riscos da contaminação acidental das culturas por microrganismos (Xavier et al. 2007). Além desses fatores, devido ao fato de as espécies florestais serem relativamente pouco domesticadas, avanços biotecnológicos relativos à propagação *in vitro* têm sido pouco expressivos, se comparados com outras culturas de expressão agrícola; entretanto, é reconhecido o grande potencial de impacto da utilização desta biotecnologia na silvicultura clonal e na indústria de base florestal (Penchel et al. 2007, Xavier et al. 2009).

Todos os envolvidos com a propagação *in vitro* reconhecem que o desenvolvimento desta técnica requer conhecimento multidisciplinar, além desta ser visualizada em conjunto com as técnicas convencionais de propagação de plantas

na condição *ex vitro*, como a clonagem pela técnica por miniestaquia.

MICROPROPAGAÇÃO

Nos esquemas-padrão da micropropagação, os estádios de desenvolvimento da propagação *in vitro* são constituídos de fases que incluem a seleção do explante e obtenção de culturas livres de contaminantes, a multiplicação dos propágulos vegetativos, o enraizamento e a aclimatização na condição *ex vitro* das plantas obtidas *in vitro*. De acordo com a espécie e os objetivos a serem alcançados, algumas dessas fases podem ser mais prolongadas e, ou, uma fase pode ser adicionada, bem como outras podem não ser necessárias. A experiência, a estrutura disponível, entre outros fatores, são determinantes na definição da estratégia mais adequada para se alcançar o sucesso desejado. Assim, em algumas situações, um estágio preliminar correspondente ao tratamento destinado à planta matriz torna-se necessário para o fornecimento de explantes mais adequados e responsivos ao cultivo *in vitro*. Em outras situações, o sistema de micropropagação pode também ser simplificado pela eliminação da fase de enraizamento *in vitro*. Neste caso, as gemas alongadas são enraizadas diretamente no substrato em condições *ex vitro*, como é feito na micropropagação de mudas de clones de *Eucalyptus*, visando atender à demanda de mudas rejuvenescidas para o sistema de propagação por microestaquia (Xavier et al. 2009).

Nos esquemas-padrão de micropropagação, de acordo como o explante utilizado e sua subsequente manipulação, tem-se adotado a multiplicação por meio da proliferação de gemas axilares, mediante indução de gemas adventícias por organogênese e a proliferação via embriogênese somática. A utilização de uma técnica em detrimento de outra varia com a espécie, os objetivos a serem alcançados, o domínio da técnica e a disponibilidades estruturais e orçamentárias. No entanto, a micropropagação mediante a proliferação de gemas axilares tem sido a mais utilizada e com respostas satisfatórias na propagação *in vitro*.

vitro, visto sua aplicabilidade em espécies lenhosas. Os outros dois sistemas de micropropagação, apesar de suas potencialidades na área florestal, ainda carecem de desenvolvimento científico que possibilite seu uso rotineiro.

Micropropagação pela proliferação de gemas axilares

Esta técnica se baseia na proliferação de gemas pré-formadas, reproduzindo in vitro um fenômeno natural, levando a um sistema com grande facilidade de controle, além de possibilitar fidelidade genética muito alta. As gemas pré-formadas, pelo fato de possuírem determinação para o crescimento vegetativo, se satisfeitas as necessidades nutricionais, irão se desenvolver naturalmente em plantas. De forma geral, este sistema de micropropagação é mais simples que outros dois sistemas, além de a taxa de propagação ser relativamente rápida e as plantas resultantes desse processo apresentarem bom crescimento, provavelmente devido ao rejuvenescimento promovido por sucessivos subcultivos do material.

A micropropagação pela proliferação de gemas axilares constitui-se num sistema de propagação in vitro, que compreende as fases de iniciação e estabelecimento da cultura in vitro, multiplicação e alongamento, enraizamento e a aclimação ex vitro. Para as espécies lenhosas, entre os meios de cultura básicos mais utilizados nas diferentes fases da propagação in vitro estão o MS (Murashige e Skoog 1962), o JADS (Correia et al. 1995), o WHITE (White 1943), o B5 (Gamborg et al. 1968), o QLP (Quoirin e Lepoivre 1977) e o WPM (Lloyd e McCown 1981).

Vale salientar que, dependendo dos objetivos da micropropagação, deve-se atentar para o tempo e o número de subcultivos necessários na multiplicação, em cada cultura, para que as alcancem estádios vegetativos com reatividade das gemas de acordo com os interesses da propagação. Para *Eucalyptus* se o objetivo é o rejuvenescimento de clones selecionados na idade adulta, visando o melhoramento da capacidade

de enraizamento, tem sido recomendado, no mínimo, a realização de 12 subcultivos na fase de multiplicação (Xavier et al. 2009).

Da mesma forma, na busca de otimização do processo de micropropagação, para algumas espécies e situações, a fase de enraizamento in vitro pode ser eliminada pelo enraizamento de brotos alongados diretamente na condição ex vitro. Para clones de *Eucalyptus* spp., o enraizamento ex vitro de brotos alongados in vitro em casa de vegetação climatizada apresenta certas vantagens, como o desenvolvimento de um sistema radicular mais completo e funcional, com maior número de raízes secundárias, formação da raiz sem a passagem intermediária de calo, eliminação de uma etapa da micropropagação, além da redução de gastos em mão-de-obra, infra-estrutura e tempo de formação da muda. Além dessas vantagens, o enraizamento ex vitro é vantajoso por: evitar a manipulação de plantas com a raiz nua, reduzir o tempo de formação da muda, aumentar a capacidade produtiva do laboratório e eliminar uma fase no desenvolvimento da pesquisa (rizogênese in vitro).

A micropropagação pela proliferação de gemas axilares provenientes de plântulas, assim como de material adulto, tem sido uma das mais utilizadas, com sucesso em várias espécies vegetais, inclusive em espécies lenhosas, como *Eucalyptus*. No entanto, entre os principais problemas neste método de micropropagação, aparece a recalcitrância de várias espécies ao cultivo in vitro e a contaminação do material por microrganismos, principalmente bactérias endógenas, representando sérias limitações no estabelecimento das culturas (Xavier et al. 2009).

Na silvicultura clonal de *Eucalyptus*, a micropropagação pela proliferação de gemas axilares tem sido utilizada com êxito no rejuvenescimento de clones selecionados, visando à melhoria do processo de propagação de mudas por microestaquia. Além desta aplicação principal, também tem sido adotada como método de limpeza clonal e como base outras técnicas biotecnológicas como a transgenia.

Micropropagação via organogênese

O processo de micropropagação via organogênese in vitro é considerado complexo, com a atuação de múltiplos fatores externos e internos, envolvendo interação entre a fonte de explante, o meio de cultura e fatores do ambiente. Depende, ainda, da ação de reguladores de crescimento, em particular auxinas e citocininas, como também da habilidade do tecido em responder a essas mudanças hormonais durante o período de cultivo. Ainda, há outros fatores que influenciam esse processo e aos quais não se dedica a devida atenção, como a posição das culturas na prateleira, o tipo de frasco de cultivo, a fase gasosa, dentre outros.

Na área florestal, este sistema de micropropagação tem potencialidade de utilização na conservação de germoplasma in vitro, nos programas de propagação clonal auxiliando no desenvolvimento de protocolos eficientes de regeneração para diversas espécies, como também na obtenção de plantas transgênicas, via transformação genética (Alves et al. 2004). No entanto, diante da escassez de informações referentes à organogênese in vitro, ainda se faz necessário a adequação de protocolos de regeneração visando tornar esta técnica com alguma importância aplicável comprovada nos programas de silvicultura clonal de *Eucalyptus*. (Alves et al. 2004, Xavier et al. 2007).

Micropropagação via embriogênese somática

Esforços para induzir embriogênese somática em muitas espécies, incluindo *Eucalyptus*, têm sido relatados. As metodologias utilizadas envolvem mudanças no meio de cultura, estabelecimento de diferentes tipos ou concentrações de reguladores de crescimento e, ou, controle de outras condições de cultura, como a densidade de células, os nutrientes ou a iluminação. A característica notável da embriogênese somática é que simples manipulações podem desencadear séries de eventos que levem à formação do embrião. Comparativamente às demais técnicas de micropropagação, a embriogênese somática apresenta

vantagens como a obtenção de grande quantidade de propágulos (embriões somáticos), permite um elevado grau de automação, baixando os custos por unidade produzida, por exemplo com a utilização de biorreatores; os embriões somáticos podem ser produzidos de forma sincronizada; pode ser utilizada como uma ferramenta integrada em programas de melhoramento genético florestal, em especial quando associada à técnica de criopreservação e produção de metabólitos secundários (Penchel et al. 2007).

Entre as várias aplicações da embriogênese somática in vitro na área florestal, esta é tida como potencial na multiplicação clonal de plantas: por meio da embriogênese repetitiva, teoricamente, uma cultura iniciada de um único explante pode produzir um número ilimitado de embriões, tornando o processo altamente atrativo para a produção massiva de plantas. Aliado a isso, tem-se a possibilidade de produção de sementes sintéticas pelo encapsulamento dos embriões somáticos, com um mínimo de manipulação e espaço físico de laboratório.

Com o desenvolvimento desta tecnologia, a embriogênese somática in vitro constitui-se numa alternativa na propagação de plantas, principalmente de clones selecionados num programa de silvicultura clonal. Alternativamente, a embriogênese somática apresenta-se como uma técnica capaz de superar alguns problemas na propagação em massa, especialmente no caso de certas plantas lenhosas de difícil enraizamento. Outras aplicações da embriogênese somática in vitro dizem respeito à sua utilização como ferramenta na transformação genética, hibridação somática e criopreservação.

Entre as limitações apresentadas pela embriogênese somática, dificultando sua utilização como sistema de micropropagação, menciona-se: a necessidade de obtenção de um sistema de embriogênese reproduzível em larga escala, a variabilidade genética indesejável introduzida pelo processo, a perda da capacidade regenerativa, devido aos subcultivos sucessivos, e a dificuldade ou impossibilidade de se estabelecer um sistema de indução por embriogênese

somática em algumas espécies/genótipos (Titon et al. 2007).

Nos últimos anos, vários trabalhos têm sido publicados para um grande número de espécies, incluindo algumas do gênero *Eucalyptus*. Porém, esta tecnologia ainda se encontra em fase de desenvolvimento, limitando a sua aplicação na área florestal a um processo comercial de produção de mudas. Um dos principais entraves encontrados para a propagação clonal via embriogênese somática é a baixa taxa de conversão de embriões somáticos em plantas. No entanto, aliada à técnica de clonagem de *Eucalyptus*, utilizada atualmente em escala comercial, a embriogênese somática apresenta grande potencial para rejuvenescimento de materiais selecionados de difícil enraizamento, assim como na regeneração de plantas transformadas geneticamente (Titon et al. 2007). Uma vez obtidas essas plantas, o material pode ser multiplicado em grande escala pela técnica de microestaquia, já difundida nas empresas florestais.

Considerações sobre a micropropagação

Várias empresas florestais brasileiras, principalmente aquelas envolvidas com a silvicultura clonal de *Eucalyptus*, fizeram investimentos nesta área na década de 80, porém muitos laboratórios foram fechados posteriormente, principalmente por problemas metodológicos na cultura de tecidos e adequação técnica e econômica nos processos de produção comercial. Atualmente, com o advento da microestaquia, a micropropagação tem merecido atenção especial para a propagação clonal de *Eucalyptus*, visando atender a fase de rejuvenescimento in vitro, limpeza clonal e como ferramenta básica para a transgenia.

Ao decidir pela micropropagação deve-se primeiramente avaliar o valor genético do clone a ser propagado, os objetivos a serem alcançados com a técnica, assim como a disponibilidade de infra-estrutura, orçamentária e de pessoal especializado. Deve-se estar ciente da variabilidade no processo de micropropagação entre diferentes clones da mesma espécie e entre as espécies, pois não existe uma receita única, onde deverá ser ajustada uma metodologia ao clone em questão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES E.C.S.C., XAVIER A., OTONI W.C. 2004. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 39:421-430.
- CORREIA D., GONÇALVES A.N., COUTO H.T.Z. do, RIBEIRO M.C. 1995. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação in vitro. IPEF 48/49:107-116.
- GAMBORG O., MILLER R., OJIMA K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research 50:148-151.
- LLOYD G., MCCOWN B. 1981. Micropropagation of mountain laurel, *Kalsmia latifolia*, by use of shoot tip culture. International Plant Propagators' Society 30:421-427.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497.
- PENCHEL R.M., OTONI W.C., XAVIER A. 2007. Tecnologia de biorreatores e propagação in vitro, pp. 75-92. In: A. BORÉM (ed). Biotecnologia Florestal, Viçosa: UFV.
- QUORIN M., LEPOIVRE P. 1977. Étude de milieux adaptes aux cultures in vitro de *Prunus* sp. Acta Horticulture 78:437-442.
- TITON M., XAVIER A., OTONI W.C., MOTOIKE S.Y. 2007. Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram na embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. Revista Árvore 28:643-654.
- WHITE P.R. 1943. Further evidence on the significance of glycine, pyridoxine and nicotinic acid in the nutrition of excised tomato roots. American Journal of Botany 30:33-36.
- XAVIER A., OTONI W.C., PENCHEL R.M. 2007. Micropropagação e enxertia in vitro de espécies florestais, pp. 55-74. In: A. BORÉM (ed). Biotecnologia Florestal. Viçosa: [s.n.].
- XAVIER A., WENDLING L., SILVA R.L. 2009. Silvicultura clonal: princípios e técnicas. Viçosa, MG: Ed. UFV 272 p.

