

COMUNICADO
TÉCNICO

447

Colombo, PR
Maio, 2020

Embrapa

Micropropagação de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barr. & Golf.

Juliana Degenhardt
Regina Quisen
Giovana Bomfim de Alcântara

Micropropagação de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barr. & Golf.

Juliana Degenhardt, Engenheira-agrônoma, doutora em Biotecnologia, pesquisadora da Embrapa Florestas, Colombo, PR; **Regina Quisen**, Engenheira Florestal, doutora em Morfogênese e Biotecnologia de Plantas, pesquisadora da Embrapa Florestas, Colombo, PR; **Giovana Bomfim de Alcântara**, Bióloga, doutora em Agronomia, professora adjunta da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR

O setor florestal brasileiro conta atualmente com uma área de 7,84 milhões de hectares de florestas plantadas, o que representa cerca de 1% do território nacional. No ano de 2016 sua arrecadação representou 6,2% do PIB Industrial no País (Ibá, 2017).

A área de florestas plantadas é responsável pela produção de 91% de toda a madeira produzida para fins industriais no País. Em termos de produtividade, em 2016 o Brasil liderou o ranking global, com uma média anual de 35,7 m³/ha para os plantios de eucalipto e 30,5 m³/ha aos plantios de pinus, principais espécies plantadas (Ibá, 2017). No entanto, a demanda por commodities e bioenergia está em franca expansão. Projeções indicam que, em 2050, serão necessários 250 milhões de hectares adicionais de florestas plantadas no mundo (Ibá, 2017), o que demonstra a necessidade de aumento de área e, ou produtividade por área plantada.

As espécies de *Pinus* ocupam uma área de aproximadamente 1,6 milhão de hectares no Brasil, com presença desde a Bahia até o Rio Grande do Sul, sendo

os principais produtores o Paraná (42%) e Santa Catarina (34%) (Ibá, 2017).

Dentre as espécies subtropicais de *Pinus* plantadas atualmente no mundo, uma das mais importantes é *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barr. & Golf., originário da América Central. A espécie não tolera geada, sendo plantada em regiões com altitudes desde o nível do mar até 700 m, com precipitações pluviométricas anuais de 2.000 mm a 3.000 mm (Aguiar et al., 2013). A sua madeira apresenta rápido e vigoroso desenvolvimento inicial e tem cor clara e amarelada (Lorenzi et al., 2003), com produção variando de 21 m³/ha a 43 m³/ha até o terceiro ano após o plantio, além de produzir resina em escala comercial (Wrege et al., 2014).

Atualmente, a maioria dos plantios comerciais de pinus são propagados por via seminal. As mudas utilizadas comercialmente vêm de pomares de sementes por mudas ou clonais de primeira e segunda geração de melhoramento. Estes pomares de sementes são formados por famílias selecionadas em testes de progênies.

A clonagem de árvores selecionadas em programas de melhoramento, por sua maior produtividade ou resistência a estresses bióticos e abióticos, pode aumentar o rendimento de áreas plantadas, pela captura imediata dos ganhos genéticos obtidos mediante seleção. Várias técnicas de clonagem, como a estaquia, o enraizamento de acículas e a micropropagação podem ser usadas com esta finalidade. No entanto, as espécies de *Pinus* são de difícil clonagem, por apresentarem envelhecimento fisiológico, o que leva a baixas taxas de enraizamento de estacas e microestacas dos indivíduos adultos selecionados.

Devido a este gargalo, o número de protocolos de micropropagação in vitro para espécies de *Pinus* na literatura é bastante limitado. Estes protocolos representam a primeira etapa para a clonagem de *Pinus*, por multiplicação in vitro, técnica que permite a obtenção de várias plantas idênticas geneticamente a partir de uma microestaca. A micropropagação in vitro é feita em condições de laboratório, em frascos contendo meio de cultura com concentrações determinadas de macro e micronutrientes, uma fonte de carboidrato, um agente solidificante e pode ou não ainda conter reguladores de crescimento vegetal, além de vitaminas e outros componentes.

A presente publicação tem como objetivo apresentar um protocolo eficiente de micropropagação in vitro para *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, a partir de

sementes, que possibilite a clonagem e conservação de germoplasma in vitro.

Materiais, equipamentos e reagentes necessários

A micropropagação conforme a metodologia aqui descrita exige a estrutura básica de um laboratório de cultura de tecidos. Para tanto, são necessários os equipamentos: capela de fluxo laminar, balança, pHmetro, agitador magnético, autoclave, BOD ou sala climatizada, além de vidrarias e outros materiais, como: pipetas, beakers, provetas, tubos de ensaio, potes de vidro autoclavável com tampa, placas de Petri esterilizadas, pinças e bisturis esterilizados. Todos estes 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 procedimento, são necessários os seguintes reagentes: sais e vitaminas do meio WV5 (Coke, 1996) (conforme descrito no Anexo 1), sacarose, 6-Benzilaminopurina (BAP), ácido naftaleno acético (ANA), carvão ativado, ágar, hipoclorito de sódio, etanol 70% e água destilada autoclavada.

Preparo dos meios de cultura

Meio de germinação (para 1 L de solução)

Adicionar em um Becker de 1 L, 30 g de sacarose 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 tubos de ensaio, fechar e autoclavar sob temperatura de 120 °C e 1 atm de pressão, por 20 minutos, antes do uso. É importante que os meios estejam frescos e que sejam usados em até uma semana. Devem ser mantidos em local fresco, sob temperatura ambiente e preferencialmente no escuro.

Meio de cultura para micropropagação (para 1 L de solução)

Adicionar os macro e microelementos do meio WV5 (Coke, 1996), conforme as soluções preparadas no anexo I. Além disso, para 1 L de meio de cultura adicionar 30 g de sacarose, 0,1 g de mio-inositol, 4,4 µM de 6-Benzilaminopurina (BAP), 0,2 µM de Ácido naftaleno acético (ANA), 1,5 g de carvão ativado 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 nos frascos de vidro. A quantidade dependerá da capacidade do frasco, respeitando a proporção de aproximadamente $\frac{1}{4}$ do volume com meio de cultura. Tapar os frascos e autoclavar sob temperatura de 120 °C e 1 atm de pressão, por 20 minutos, antes do uso.

Assepsia

Para a desinfestação, as sementes de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* devem ser mantidas em água corrente por 30 minutos e, em seguida, levadas 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 temperatura de 23 °C \pm 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas e intensidade de luz de 40 µmol m⁻² s⁻¹, 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, foi observado que, até o 12º dia após a inoculação das sementes em meio de cultura, a contaminação por fungos e bactérias foi inferior a 7%. Ao final de 50 dias após inoculação, obteve-se uma porcentagem de germinação *in vitro* de sementes de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* de 70,8%, sendo que a maioria das sementes germinou entre 30 e 35 dias (Figura 1). Após esse período, a taxa de germinação diminuiu e, aos 60 dias em meio de cultura, as sementes não germinadas foram descartadas.

Micropropagação

Após a germinação *in vitro*, as raízes das plântulas devem ser retiradas em condições assépticas, em capela de

fluxo laminar, com auxílio de pinça e bisturi, sobre placa de Petri, previamente esterilizada por autoclavagem (Figura 1). As partes aéreas devem ser, então, colocadas em meio de cultura de multiplicação, em frascos de vidro contendo meio de micropropagação.

Para a clonagem, os explantes devem ser repicados para meio fresco de mesma composição, a cada 30 dias, sendo retirados explantes de aproximadamente 1,5 cm de comprimento. Tanto na fase de germinação quanto na de multiplicação, as culturas devem ser mantidas em sala de crescimento a uma temperatura de $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas e intensidade de luz de $40\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$.

Para as repicagens, tanto a parte apical quanto as porções inferiores das brotações são utilizadas. *Pinus caribaea* var. *hondurensis* apresenta multiplicação *in vitro* tanto pela secção da altura das brotações, que podem crescer, em média, 2 cm por mês, quanto pela

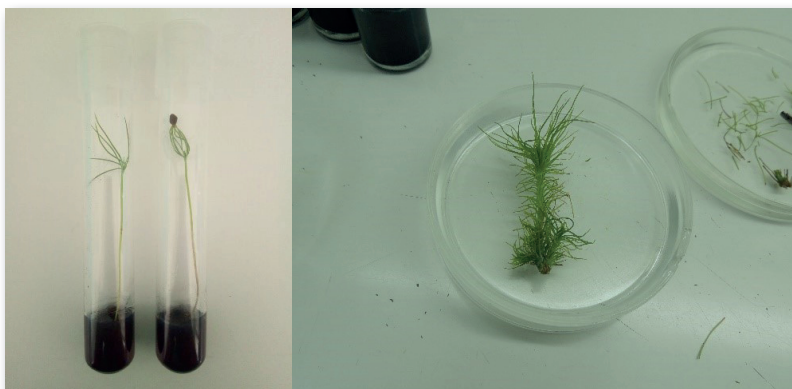


Figura 1. Germinação *in vitro* de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* (esquerda); Repicagem de brotações em meio de multiplicação.

indução de novas brotações, as quais podem ser separadas da brotação inicial e utilizadas para a multiplicação.

Caso seja o objetivo, a conservação *in vitro* desta espécie pode ser realizada pelo maior tempo entre os subcultivos. Os resultados prévios obtidos nos estudos base para este documento indicaram que é possível manter as plantas sem subcultivos e sem perda de viabilidade do material vegetal por até três a quatro meses, utilizando-se meio de cultura de mesma composição do meio de multiplicação.

Utilizando-se este protocolo, foi observada a formação de novas brotações em 40% dos brotos iniciais já no primeiro subcultivo. Em relação ao número médio de brotações por explante e altura média das brotações em quatro subcultivos,

foi observada uma multiplicação de 2,7 brotações por mês e um comprimento médio de 7 cm por brotação, a cada subcultivo (Figura 2). O alongamento das brotações ocorre no próprio meio de multiplicação e permite a multiplicação destes brotos por meio de cortes longitudinais com 2 cm, do ápice à base.

A composição de macro e microelementos utilizadas no meio WV5 foi originalmente desenvolvida por Coke (1996), como meio nutritivo basal para o cultivo *in vitro* de *Pinus taeda* e, desde então, vem sendo utilizada com sucesso, em diferentes estudos envolvendo várias espécies de coníferas. Resultados semelhantes aos observados por nosso grupo de trabalho foram obtidos para *Pinus taeda*, para o qual não foram observadas diferenças significativas

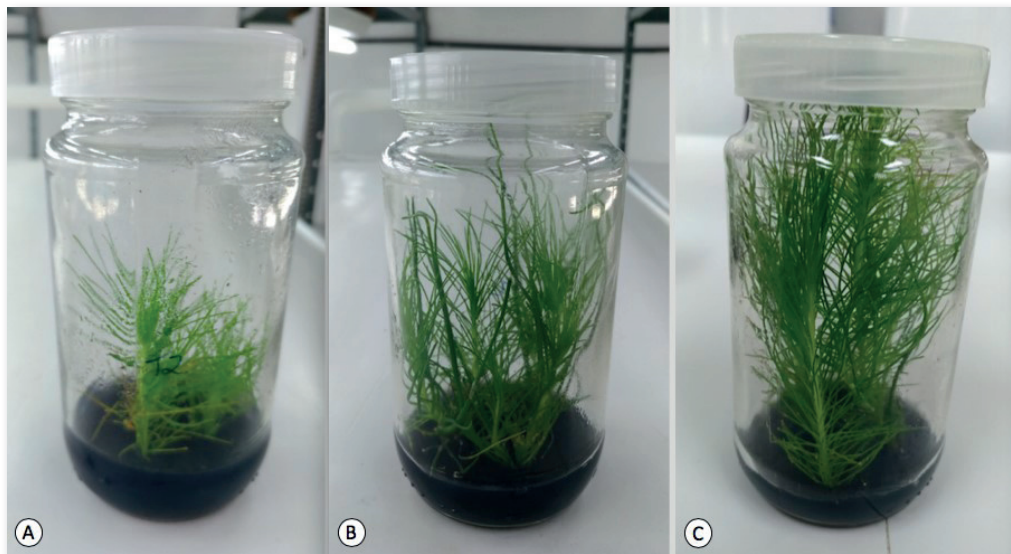


Figura 2. Brotações em meio de multiplicação aos (A) 30 dias, (B) 60 dias e (C) 90 dias sem subcultivo.

na formação de brotos no meio WV5, com e sem adição de BAP (Oliveira et al., 2011). Para *Pinus tecunumanii*, a concentração de BAP no meio WV5 também não influenciou o crescimento em altura média das brotações (Zanella et al., 2018).

A multiplicação de pinus por micropropagação tem como principais vantagens a obtenção de mudas de alta qualidade fitossanitária e uma alta produção, em um espaço bastante reduzido, garantindo ainda alta fidelidade genética. Além disso, esta técnica possibilita o enraizamento e multiplicação de genótipos recalcitrantes ao uso de outras técnicas mais conhecidas, como a estaquia. A conservação *in vitro* possibilita também a manutenção de um banco de genótipos elite com baixa necessidade de mão de obra e que pode ser acessado e multiplicado quando necessário.

Os protocolos de micropropagação são utilizados também na produção de mudas em biorreatores, em biofábricas. Este sistema já é utilizado comercialmente para outras espécies, dentre elas os eucaliptos. Seu emprego demonstrou ser também interessante em empresas do setor florestal que utilizam a propagação massal de pinus via embriogênese somática. Neste caso, os embriões somáticos após germinados podem passar por uma fase de micropropagação antes de serem encaminhados para os viveiros, aumentando assim a sobrevivência das mudas.

No entanto, a comercialização em larga escala de mudas vindas de micropropagação ainda permanece aquém

da capacidade de produção e demanda de mercado. Entre as principais causas estão as dificuldades intrínsecas da própria técnica quando esta é transferida da escala laboratorial para a comercial, sendo realidade ainda apenas para algumas espécies de pinus. Por este motivo também, o custo unitário da muda ainda é relativamente alto, quando a produção se limita a pequenas quantidades.

Referências

AGUIAR, V. A.; SOUSA, V. A.; SHIMIZU, J. Y. Espécies de pinus mais plantadas no Brasil. **Revista Madeira**, n. 135, 2013.

COKE, J. E. **Basal nutrient medium for in vitro cultures of loblolly pines**. USA Patent 5.534.434, 1996.

IBÁ. Indústria brasileira de árvores. **Relatório Ibá**. Brasília, DF, 2017. 80 p. Disponível em: <https://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2017.pdf>. Acesso em: 8 mar. 2020.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. de; TORRES, M. A. V. **Árvores exóticas no Brasil**: madeiras, ornamentais e aromáticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2003. 368 p.

OLIVEIRA, L. F.; RIBAS, L. L. F.; QUOIRIN, M.; KOEHLER, H. S.; HIGA, A. R. Micropropagation of *Pinus taeda* L. via axillary buds. **BMC Proceedings**, v. 5, n. 7, 2011.

SHIMIZU, J. Y. (Ed.). **Pinus na silvicultura brasileira**. Colombo: Embrapa Florestas, 2008. 223 p.

WREGGE, M. S.; FRITZSONS, E.; SHIMIZU, J. Y.; AGUIAR, A. V. de; CARAMORI, P. H. Pinus tropical com potencial para uso em plantios comerciais no Brasil. **Revista do Instituto Florestal**, v. 26, p.137-145, 2014.

ZANELLA, L. B.; FRANCISCON, L.;
GRUNENVALDI, R. L.; TOMASI, J. C.;
DEGENHARDT-GOLDBACH, J. Micropropagation

of *Pinus tecunumanii*. **Ciência Florestal**, v. 28,
n. 2, p. 651-660, 2018.

Anexo 1

Concentração das soluções estoque e volume adicionado ao meio de cultura WV5

Reagentes	Concentração final no meio de cultura (mg/L)
NH ₄ NO ₃	700,00
KNO ₃	1.084,60
CaCl ₂ .2H ₂ O	600,00
KI	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,83
KH ₂ PO ₄	270,00
H ₃ BO ₃	31,00
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
MnSO ₄ .H ₂ O	15,16
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.848,60
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,30
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,80
KCl	718,67
Mio-inositol	1.000,00
Tiamina	0,40

Exemplares desta edição
podem ser adquiridos na:

Embrapa Florestas

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

1ª edição

Versão digital (2020)



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



GOVERNO FEDERAL

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Florestas

Presidente

Patrícia Póvoa de Mattos

Vice-Presidente

José Elidney Pinto Júnior

Secretária-Executiva

Neide Makiko Furukawa

Membros

Cristiane Aparecida Fioravante Reis,

Krisle da Silva, Marilice Cordeiro Garrastazu,

Valderês Aparecida de Sousa, Anete Bonnet,

Álvaro Figueredo dos Santos,

Guilherme Schnell e Schühli,

Marcelo Franca Arco-Verde

Supervisão editorial/Revisão de texto

José Elidney Pinto Júnior

Normalização bibliográfica

Francisca Rasche

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

Neide Makiko Furukawa

Fotos:

Juliana Degenhardt

CGPE 15999