

## RESGATE, CONSERVAÇÃO E CLONAGEM DE MATRIZES DE *Eucalyptus benthamii* MAIDEN & CABBAGE

Baccarin, Francisco<sup>1</sup>; Ebling Brondani, Gilvano<sup>2</sup>;  
Gomes Vieira, Israel<sup>3</sup> y de Almeida, Marcilio<sup>4</sup>

### RESUMO

O *Eucalyptus benthamii* é uma das opções para formação de plantios florestais no Brasil, principalmente em regiões de clima frio e com ocorrências de geadas, em decorrência de sua origem a oeste de Sydney, NSW na Austrália. Mas para tal é necessário à propagação vegetativa de genótipos superiores que muitas vezes precisa ser realizada em árvores adultas e requer material fisiologicamente juvenil ou rejuvenescido para obter bons índices de enraizamento.

Técnicas especiais são necessárias para reverter árvores adultas a juvenilidade e resgatar condições favoráveis para promover o enraizamento e crescimento. No caso dos eucaliptos para obtenção de brotações, o método de resgate mais utilizado é o corte da árvore, técnica que proporciona alta taxa de enraizamento de estacas, devido à eficiente reversão a juvenilidade. Porém, quando existe a necessidade de preservação do indivíduo, justifica-se o uso de técnicas não destrutivas, evitando dessa forma a morte da árvore matriz.

Considerando a dificuldade de enraizamento dessa espécie pelas técnicas tradicionais, o presente trabalho objetivou avaliar diferentes métodos não destrutivos de propagação vegetativa e diferentes tipos de brotos, visando o resgate, a conservação e clonagem de 20 matrizes de *E. benthamii* de um plantio seminal com 13 anos de idade. Para tanto, avaliou-se estacas de galhos da copa, brotações epicórmicas dos primeiros galhos da copa, brotações provenientes do anelamento e brotações da poda dos galhos. Estes materiais foram submetidos às técnicas de estaquia e micropropagação.

Como principais resultados destacam-se o elevado índice de enraizamento e desenvolvimento *ex vitro* de microestacas provenientes do cultivo *in vitro* das brotações epicórmicas (megaestacas) e a estaquia dos brotos provenientes do anelamento, que apresentaram enraizamento e desenvolvimento satisfatório. Entretanto, não houve sobrevivência e nem enraizamento de nenhum dos brotos tanto diretamente da copa, como estimulados pela poda dos galhos.

Palavras chaves: Resgate Não Destrutivo, Propagação Vegetativa de Genótipos Superiores, Micropropagação, Estaquia e Brotações Epicórmicas.

---

<sup>1</sup> Engenheiro Agrônomo, M. Sc. Silvicultura clonal –, Professor Universidade Estadual de Goiás (UEG), Rua S7 Qd, 1 - S Sul, CEP – 76.190-000 – Palmeiras de Goiás, GO, Brasil – e-mail: franciscobaccarin@hotmail.com

<sup>2</sup> Engenheiro Florestal, Professor Dr Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT). gebrondani@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Biólogo, M. Sc., Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais - IPEF, Brasil israel@ipef.br

<sup>4</sup> Biólogo, Professor Dr. em Botânica – Departamento de Ciências Biológicas, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), Avenida Pádua Dias, 11, Cx.P. 9 – 13418-900 – Piracicaba, SP, Brasil – e-mail: malmeida@esalq.usp.br

## SUMMARY

The *E. benthamii* presents a great aptitude for cultivation in Brazil, especially in cold climates and with frequent frosts, this is due to its origin from western Sydney, NSW Australia. Taking into account their optimal silvicultural performance, selected genotypes will certainly represent an excellent alternative for future plantings. The cloning of superior genotypes is accomplished by vegetative propagation of mature trees, and requires physiologically juvenile or rejuvenated material.

Special techniques are necessary to reverse the juvenile and adult trees recover favorable conditions to promote rooting and growth. In the specific case of Eucalypts to obtain propagules, the most rescue method used for the forestry companies are clearcutting, technique that provide a high rate of rooting, due to efficient reversion to juvenility. However, when it needs to protect the individual, justifies the use of non-destructive techniques, thus avoiding the death of the tree array.

The present study aimed to spot after the selection of phenotypes with superior silvicultural characteristics, rescue (through non-destructive techniques) to retain and multiply matrices adult of *E. benthamii*, evaluating which technique that present the best result for the cloning of the same. So we used to shoot the first cup of twigs, shoots, epicormic shoots that emerged from girdling and shoots arising from the pruning of the branches of the crown, which were submitted to the techniques of cutting, grafting and micropropagation for each type of bud.

The main results stand out the high rate of *ex vitro* rooting and development of microcuttings from *in vitro* cultivation of epicormic shoots and cuttings of sprouts from girdling, which showed satisfactory growth and rooting. However, there was neither survival nor any of rooting shoots both directly cup, as stimulated by pruning the branches.

Keywords: Cloning; Micropropagation; Cuttings; Grafting; Rescue and Multiplication of Superior Genotypes; Epicormic Shoots

## INTRODUÇÃO

O *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage, é encontrado em áreas limitadas, ao oeste da cidade de Sydney em planícies ao longo do rio Nepean e seus tributários (Pryor, 1981), região com centenas de geadas por ano, registrando temperaturas que variam de 4 a 26°C, condições semelhantes a região sul e sudeste do Brasil, com o maior pólo de plantio florestal. Em sua região de origem em Camden (Austrália) pode atingir 36 m de altura e 50 cm de diâmetros (Nisgoski *et al.*, 1998).

O *E. benthamii* além de ser uma excelente alternativa de plantio pela resistência a geadas, apresenta rápido crescimento e apresenta vantagens em relação ao *E. dunnii* e *E. viminalis*, principalmente para programas de melhoramento, devido as ótimas qualidades silviculturais (Higa e Pereira, 2003).

A clonagem do *Eucalyptus* visando maior homogeneidade e qualidade de florestas é de fundamental importância para o aumento do rendimento e qualidade da madeira, podendo ainda obter-se um maior planejamento da colheita pelas empresas florestais, que em sua maioria utilizam a técnica da decepta da árvore, para tentar reverter a juvenilidade, aumentando assim o percentual de enraizamento das estacas. No entanto, esse método não pode ser aplicado em espécies com dificuldade de rebrota e, ou protegidas do corte raso. Dentre as técnicas de propagação vegetativas não destrutivas, as mais conhecidas e aplicadas são: anelamento, enxertia, estaquia, brotações epicórmicas de galhos destacados (megaestaca), miniestaca, e microestaca.

Neste sentido, presente trabalho selecionou *in loco* de fenótipos com características silviculturais superiores de *E. benthamii*, visando resgatar (através de técnicas não destrutivas), conservar e clonar matrizes adultas, avaliando-se qual (is) técnica(s) apresenta(m) melhor(es) resultado(s) para o *E. benthamii*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Origem e Seleção do Material

Vinte árvores de *E. benthamii* com as melhores qualidades silviculturais, como altura, diâmetro a altura do peito (DAP), retidão do caule (menor fator de forma) e sanidade em um plantio seminal comercial com 13 anos de idade da empresa Valor Florestal, localizado no município de Sengés - PR.

Duas coletas foram realizadas, sendo a primeira entre o final do verão e início do outono de 2011, coletando-se brotações do topo das árvores, e de galhos (megaestaca). No inverno do mesmo ano realizou-se nova coleta, daquelas brotações provenientes do anelamento realizado na primeira coleta, e também das brotações que surgiram no local da retirada dos galhos (brotações do ano).

### -Brotações dos Primeiros Galhos da Copa

Foram coletados brotações dos primeiros galhos da copa de todas as matrizes selecionadas, coletou-se 100 ramos com aproximadamente três estacas.

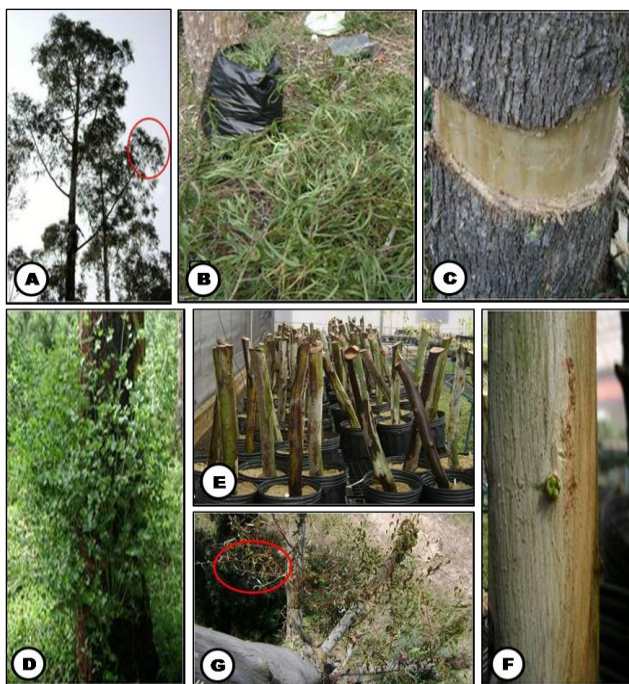
Os ramos foram armazenados em sacos plásticos de 60 L contendo jornal umedecido com água, a fim de se reduzir o estresse hídrico provocado pela evapotranspiração e manter a turgescência dos tecidos, durante o transporte até o laboratório de Fisiologia de Árvores - LAFISA, USP/ESALQ em Piracicaba-SP (Figuras 1A e 1B).

## -Brotos do Anelamento

Um anel de casca a 20 cm do nível do solo e com 20 cm de largura foi realizado em todas as matrizes, e após 90 dias as brotações foram coletadas e conduzidas em caixas de polietileno contendo jornal umedecido com água para o transporte até LAFISA, USP/ESALQ em Piracicaba-SP (Figuras N° 1C e N° 1D).

## -Brotações Epicórmicas

A coleta da megaestaca foi realizada através da poda dos galhos mais baixos da copa das árvores, no intuito de minimizar os efeitos da idade ontogênica e em Piracicaba-SP foram imediatamente acondicionados em casa de vegetação com temperatura variando entre 22 a 28°C e umidade relativa do ar acima de 80% controlada por nebulização intermitente. Os ramos foram serrados em segmentos (megaestacas) de 50 cm de comprimento (diâmetro variando de 12 a 18,5 cm), e dispostos verticalmente em vasos com areia (Figura N° 1E). Semanalmente aplicou-se fungicida a base de tiofanato metílico (1.000 mg L<sup>-1</sup>), para maior controle fitossanitário das brotações. Após 60 dias observou-se a emissão das primeiras brotações epicórmicas (Figura N° 1F).



Dos Primeiros Galhos da Copa, Destacados (A); Saco Plásticos de 60 L Contendo Jornal Umedecido com Água, Foi Utilizado para Transporte do Material Coletado (B); Detalhe do Anelamento Realizado, 20 cm de Largura (C); Brotações Emitidas Após o Anelamento das Árvores (D); Disposição das Megaestacas em Vasos com Areia e Sob Aspersão (E); Início da Emissão de Brotos da Megaestaca (F); Brotações Emitidas No Local se Coletou as Megaestacas (G).

**Figura N° 1**  
**BROTAÇÕES DE *E. benthamii***

## Brotos Oriundos da Poda dos Galhos da Copa

Brotações emitidas na região do corte da coleta de megaestacas foram selecionadas e transportadas ao local de preparo, no LAFISA – USP/ESALQ (Figura N° 1G).

### -Estaquia

Cinco tipos de brotos (brotações dos primeiros galhos da copa, do anelamento, epicórmicos, brotos oriundos da poda da copa e brotações alongadas *in vitro*), e dois ambientes de enraizamento (miniestufa e casa de vegetação tradicional) foram utilizados visando avaliar o melhor ambiente de enraizamento para cada tipo de broto.

Estacas provenientes das brotações dos primeiros galhos da copa, do anelamento e dos brotos oriundos da poda dos galhos da copa com  $12 \pm 2$  cm de comprimento foram selecionados. As folhas foram reduzidas para 50% da área total com a realização de um corte em bisel na região basal, descartando-se as ponteiras. As estacas foram lavadas em água corrente, mergulhadas em hipoclorito de sódio comercial (20% em água) e Tween 20 (0,05% v/v) durante 5 minutos e novamente lavadas em água. As estacas foram submetidas ao tratamento com fungicida (*Benomyl*  $500 \text{ mg L}^{-1}$ ) por 15 minutos, em seguida a região basal foi imersa por 10 segundos, em solução hidroalcoólica (água: álcool, 1:1, v/v) contendo  $8.000 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB (Brondani *et al.*, 2012).

Brotos provenientes das megaestacas com  $4 \pm 2$  cm de comprimento foram coletados com um corte em bisel na porção inferior, com a região basal imersa por 10 segundos em solução hidroalcoólica (água: álcool, 1:1, v/v) contendo  $2.000 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB.

Brotações alongadas *in vitro* de cada clone, com tamanho de aproximadamente 1 cm, foram coletadas em câmara de fluxo laminar com auxílio de tesoura e transferidas para placas de Petri contendo água autoclavada. Posteriormente, realizou-se a estaquia no substrato de cultivo.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com parcelas subdivididas no tempo. Para as brotações dos primeiros galhos da copa e brotos oriundos da poda dos galhos da copa testaram-se vinte clones, com dez repetições e vinte estacas para a composição de cada repetição, para os brotos do anelamento, brotações epicórmicas e brotos alongados *in vitro* testaram-se vinte clones, com dez repetições e três estacas para a composição de cada repetição.

### -Condições de Enraizamento

As estacas de todos os tipos de brotos foram dispostas para o enraizamento em dois ambientes distintos. O primeiro em casa de vegetação (com umidade relativa do ar maior que 80% a partir de nebulização intermitente, e temperatura do ar de  $33 \pm 5^\circ\text{C}$ ), utilizou-se tubetes plásticos de forma cônica de  $55 \text{ cm}^3$ , contendo substrato comercial a base de casca de pinus e vermiculita média (2:1). Após 45 dias, as estacas foram transferidas para casa de vegetação com sombrite 50% para aclimação (casa de sombra), onde permaneceram por 15 dias, com irrigação por microaspersão.

O segundo constituído por uma bandeja (com  $11 \times 5$  cm) com o mesmo tipo de substrato, sobre uma base (prato de vaso), uma armação de arame e um saco plástico transparente fechado (mantendo-se a umidade próxima a 100%). A mini-estufa foi acondicionada em local com sombra, e protegido com sombrite 80%, evitando-se elevadas temperaturas. Semanalmente, aplicou-se fungicida à base de Tiofanato Metílico ( $1.000 \text{ mg L}^{-1}$ ), a fim de evitar-se a contaminação fúngica. Após 30 dias, iniciou-se o onduci de aclimação, com a abertura do saco plástico, aos 45 dias as estacas enraizadas foram retiradas do sistema de mini-estufa e repicadas para tubetes, foram então transferidas para casa de vegetação com sombrite 50% para aclimação (casa de sombra).

A porcentagem de enraizamento e conduzido cia foi avaliada aos 45 dias após estaqueamento. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com parcelas subdivididas no tempo, testando-se vinte clones, cinco tipos de estacas, e dois locais de enraizamento.

## Micropropagação

### -Meio de Cultura e Condições *In Vitro*

Os meios de culturas utilizados foram MS (Murashige e Skoog, 1962) para o estabelecimento da cultura e WPM para subcultivos posteriores, com adição das auxinas ANA e AIB e a citocinina BAP, sacarose 20 e 30 g L<sup>-1</sup> (dependendo do estagio de desenvolvimento). O valor do pH foi ajustado para 5,8 com HCl (0,1M) ou KOH (0,1M) previamente a adição do ágar (6g L<sup>-1</sup>), e posteriormente autoclavado a temperatura de 121°C (≈1,0 kgf cm<sup>-2</sup>) durante 20 minutos. Os explantes foram cultivados em sala de crescimento com temperatura de 25°C ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecidas por duas lâmpadas fluorescentes, branca fria, com 110 Watts cada.

### -Introdução *In Vitro*

A introdução *in vitro* dos segmentos nodais foi realizada por meio de quatro tipos diferentes de explantes: (i) a partir de brotações dos primeiros galhos da copa, (ii) brotações oriundas da poda dos galho (megaestaca), (iii) das brotações basais provenientes do anelamento das matrizes e (iv) brotações epicórmicas das megaestacas. Em todos os casos os explantes consistiram de segmentos nodais da porção mediana das brotações com as folhas removidas, contendo um par de gemas axilares, e tamanho médio de 1,5 cm.

A assepsia dos explantes se deu primeiramente por imersão em solução de álcool a 70% (v/v) por 10 segundos, sendo enxaguados com água deionizada e autoclavada. Em seguida foram submetidos à solução com fungicida Tiofanato Metílico (1.000 mg L<sup>-1</sup>) por 15 minutos, enxaguados com água deionizada e autoclavada e finalmente imersos em solução com de 1,0% (v/v) de cloro ativo (NaOCl) acrescida de duas gotas de Tween 20 (0,05% v/v) durante 5 minutos. Ao final do tratamento, foram enxaguados por três vezes com água deionizada e autoclavada no interior da câmara de fluxo laminar e inoculados verticalmente em tubos de vidro com 7 x 3 cm, com 7 mL do meio de cultura MS. Especificamente para os explantes provenientes das brotações epicórmicas das megaestacas, a assepsia foi mais branda, reduzindo-se para 5 minutos o tempo de exposição ao fungicida Tiofanato Metílico, devido ao tecido ser mais tenro e as condições de cultivo permitir um maior controle fitossanitário dos brotos. Aos 30 dias após a inoculação avaliou-se porcentagem de contaminação por fungos, bactérias e algas além da porcentagem de oxidação, consideraram-se estabelecidos os explantes sem estas características e com gemas axilares desenvolvidas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Estaquia

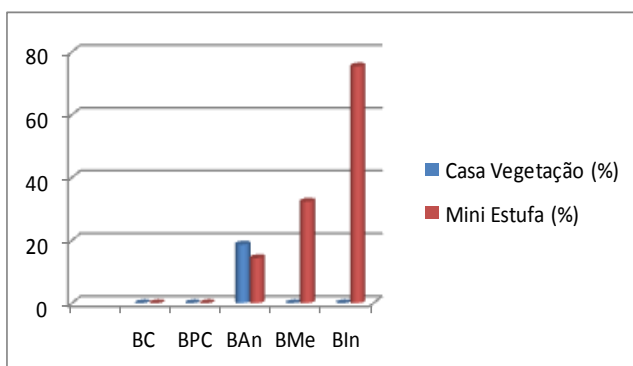
As brotações provenientes dos primeiros galhos da copa e brotos oriundos da poda dos galhos da copa não sobreviveram (Figura N° 2). Entretanto, os brotos de procedência de megaestaca e os alongados *in vitro* evidenciaram boa competência ao enraizamento no ambiente de mini-estufa, apesar de apresentarem-se com tecidos muito tenros, sem praticamente nenhuma lignificação, sendo mais susceptíveis ao ataque de patógenos.

Paul e Clark (1989) salientam que no solo ou no substrato existe normalmente um grande número de microrganismo, e que durante a produção de mudas por estaquia, é comum a ocorrência de desequilíbrios bióticos e abióticos que podem interferir negativamente no crescimento e desenvolvimento das mudas. Entre estes, destaca-se a incidência de fungos

decompositores como um dos fatores mais negativos ao percentual de enraizamento (Ferreira, 1989).

Em escala comercial, o enraizamento de estacas tem sido praticado dentro de casas de vegetação, nas quais são mantidas à altas temperaturas (geralmente de 25 a 35°C) e alta umidade (geralmente acima de 80%) por nebulização intermitente (Ferreira, 1989). Essas condições se tornam mais críticas ao ataque de fitopatógenos, visto que é, aparentemente, um material fisiologicamente pouco ativo, muito vulnerável à ação de agentes microbianos (Alfenas *et al.*, 1988).

A mini-estufa pelo seu reduzido tamanho permitiu maior controle fitossanitário, e também pela individualização dos materiais reduzindo a disseminação de fitopatógenos associado a aplicação semanal de fungicidas, sem lavagem pela aspersão, obtendo-se maior absorção pela estaca favorecendo seu desenvolvimento sadio. Permitindo inferir que associado a competência rizogênica, os mecanismos de resistência inicial ao ataque de patógenos fundamental para o sucesso do processo de formação de mudas.



BC – Brotações dos primeiros galhos da copa, BPC – Brotos oriundos da poda dos galhos da copa, BAn – brotos do anelamento, BMe – brotos da megaestaca, Bln – brotos alongados *in vitro* e ambiente de enraizamento.

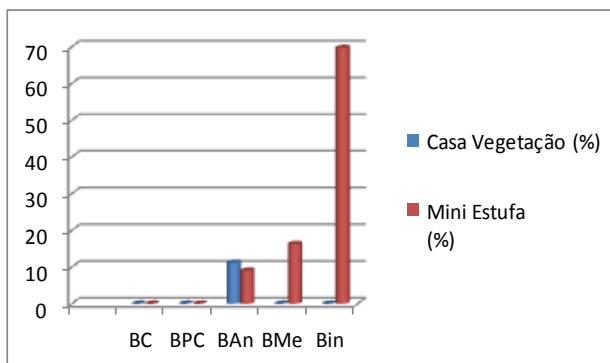
**Figura N° 2**  
**VALORES MÉDIOS DA PORCENTAGEM DE SOBREVIVÊNCIA DE PROPÁGULOS**  
**DE *Eucalyptus benthamii* EM RELAÇÃO A ORIGEM DE BROTO**

Os brotos advindos do anelamento apresentaram índices semelhantes de sobrevivência (Figura N° 2) e enraizamento (Figura N° 3) em ambos os ambientes avaliados. Segundo Hackett (1987b) algumas características, que estão associadas com a juvenilidade, são mantidas nas porções basais de plantas maduras de muitas espécies. Hartmann *et al.* (1997) observaram que a maior juvenilidade da região basal das plantas se deve ao fato dos meristemas mais próximos da base formarem-se em épocas mais próximas à germinação do que os das regiões terminais. Pode-se, portanto supor, que além dessas características observadas por Hackett (1987a) e Hartmann *et al.* (1997) as estacas apresentaram boa resistência inicial ao ataque de patógenos, não tendo assim, interferência do ambiente no enraizamento e sobrevivência.

Os brotos alongados *in vitro*, foram os que apresentaram o maior percentual de sobrevivência e enraizamento (Figuras N° 2 e N° 3), devido ao maior grau de reversão a juvenilidade proporcionado pela cultura de tecidos (George *et al.*, 2008). A composição do meio de cultura pode induzir a células a estádios menos diferenciados (multipotentes, pluripotentes e totipotentes), com menor determinação e aquisição de competências para novas rotas morfogênicas específicas, que acarretam na redução do grau de metilação do DNA, na perda da



memória e na reprogramação celular (Valledor *et al.*, 2007), e consequentemente, viabilizam o rejuvenescimento dos tecidos para que ocorra a regeneração de plantas e clonagem.



BC – Brotações dos primeiros galhos da copa, BPC – Brotos oriundos da poda dos galhos da copa, BAn – brotos do anelamento, BMe – brotos da megaestaca, Bin – brotos alongados *in vitro* e ambiente de enraizamento.

**Figura N° 3**  
**VALORES MÉDIOS DA PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO DE PROPÁGULOS**  
**DE *Eucalyptus benthamii* EM RELAÇÃO À ORIGEM DE BROTO**

O sucesso na reversão da juvenilidade está diretamente associado ao número de subcultivos durante a fase de multiplicação. Os maiores índices de enraizamento dos brotos alongados *in vitro* ocorreram com as microcepas que foram subcultivadas por 14 meses, ou seja, 15 subcultivos (1 a cada 28 dias de cultivo), para somente então serem transferidas ao meio de alongamento onde se obteve brotações aptas para o enraizamento, corroborando com Xavier *et al.* (2009) que recomendam, no mínimo, a realização de 12 subcultivos na fase de multiplicação para se atingir o rejuvenescimento de árvores adulta de *Eucalyptus*.

Em relação aos brotos dos primeiros galhos da copa e da poda dos galhos da copa, a porcentagem de sobrevivência e enraizamento (Figuras N° 2 e N° 3) foi de 0 % (zero) nos dois ambientes, principalmente devido ao elevado grau de maturação dessas estacas. Segundo Hartmann *et al.* (1997) o ciclo de vida de muitas plantas se relacionam às fases juvenil e adulta, nas quais as características anatômicas, fisiológicas, bioquímicas e morfológicas são distintas, afetando sensivelmente a propagação vegetativa das plantas. Em plantas lenhosas, há um gradiente de juvenilidade em direção à base da árvore (Eldridge *et al.*, 1994), o que promove aumento da maturação em função da maior proximidade com o meristema apical (Greenwood e Hutchison, 1993). Quando se compara o percentual de enraizamento de estacas dos primeiros galhos da copa e da poda dos galhos da copa, com os das estacas advindas do anelamento, evidencia-se a importância da juvenilidade.

Outro fator importante no enraizamento fica evidente quando se compara a sobrevivência e enraizamento (Figuras N° 2 e N° 3) das estacas oriundas da megaestaca com estacas formadas no local da coleta de megaestaca (ou seja, os brotos oriundos da poda dos galhos da copa), em que se pode observar superior capacidade de enraizamento das estacas do brotamento de megaestacas em relação as da poda dos galhos da copa. Segundo Alfenas *et al.* (2004) o princípio fisiológico para indução de brotações epicórmicas está baseado na alteração do equilíbrio entre os reguladores de crescimento (auxina/citocinina), favorecendo assim a emissão de brotos. Essas alterações além de influenciar a emissão de brotos, provavelmente também favoreceram seu rejuvenescimento, diferentemente das brotações na base da retirada dos galhos, os quais praticamente não alteraram seu balanço hormonal.



Na literatura existem diversos relatos a respeito das diferenças entre o enraizamento adventício de material juvenil e adulto (Wendling *et al.*, 2006), os quais apresentam dependência da condição fisiológica da planta-mãe (doadora de propágulos) e da idade cronológica (Haapala, 2004). Ainda em relação às espécies de *Eucalyptus* determinou-se que a concentração dos inibidores ao enraizamento aumenta com a idade das folhas, e esse aumento está correlacionado com o decréscimo da capacidade de enraizamento (Hackett, 1988). Esses mesmos inibidores poderiam estar presentes nas brotações do ano, enquanto que nas brotações da megaestaca não, pois as folhas dos brotos oriundos da poda dos galhos apresentavam morfologia de folhas adultas, enquanto as folhas das megaestacas características de folhas jovens.

Uma das mais importantes consequências do envelhecimento ontogenético para a clonagem é a redução, ou até mesmo, a perda da capacidade de enraizamento que se verifica em plantas lenhosas adultas, este fato tem elevada importância. Segundo Assis (1997) a seleção normalmente é realizada na fase adulta, onde a propagação vegetativa encontra limitações, principalmente, no que se refere à variação de genótipos entre e dentro das espécies florestais, e da redução gradual da capacidade de enraizamento de estacas, que esta associada ao envelhecimento ontogênico. Com base nessas informações e como não houve sobrevivência e enraizamento dos brotos dos primeiros galhos da copa, e nem dos brotos oriundos da poda dos galhos da copa para nenhum material genético (clone), esta técnica não é recomendada para o resgate de árvores adultas de *E. benthamii* com idade superior ou igual a 13 anos.

Em espécies de difícil enraizamento, como por exemplo o *E. benthamii*, é fundamental garantir a juvenilidade dos propágulos. Assim, quanto mais juvenil for o material vegetativo, maior será o sucesso do enraizamento, quer expresso em percentagem, na rapidez de formação de raízes, quer na qualidade do sistema radicular e na capacidade de crescimento da nova planta (Gomes, 1987).

Todos os clones emitiram brotos basais decorrentes do aumento da concentração de citocininas associado a redução da concentração de auxina, imediatamente após o anel da casca retirado, que interrompeu o transporte via floema (Zimmermann e Brown, 1974).

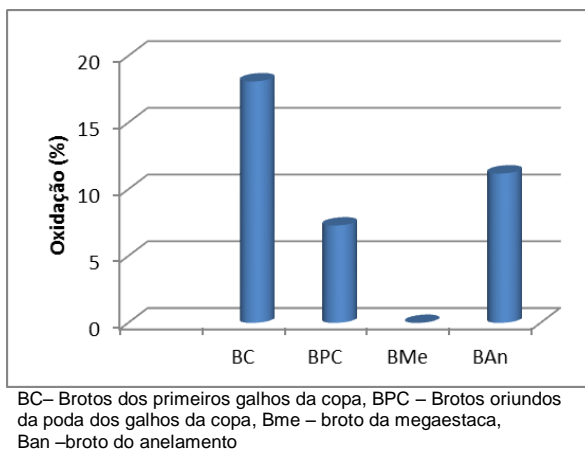
### ***In vitro***

A maior porcentagem de oxidação foi verificada nos brotos dos primeiros galhos da copa (18,1%), seguido dos brotos do anelamento (11,2 %), brotos oriundos da poda dos galhos (7,3%) e da megaestaca, o qual não apresentou oxidação (Figura N° 4). Particularmente espécies tropicais, frequentemente apresentam elevadas concentrações de substâncias fenólicas que são oxidadas quando as células são feridas ou senescentes, sendo que o tecido isolado torna-se marrom ou preto e não cresce (George *et al.*, 2008). Além disso, várias enzimas cobre-dependentes estão envolvidas na oxidação e hidroxilação de compostos fenólicos (Lerch, 1981). A hidroxilação de monofenóis por enzimas que contém cobre, induzem a construção de importantes componentes polímeros nas plantas, tais como a lignina. Essas mesmas enzimas podem levar ao escurecimento de explantes recém isolados (George *et al.*, 2008). Atribui-se a elevada porcentagem de oxidação dos segmentos nodais advindos de broto dos primeiros galhos da copa, a maiores deposição de ligninas presentes destes tecidos quando comparado aos brotos de anelamento, brotos oriundos da poda dos galhos da copa e de megaestaca (0% de oxidação).

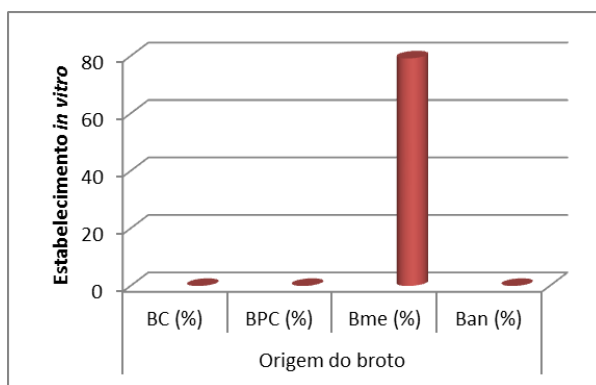
Dessa forma a oxidação foi um dos fatores que influenciou para o não estabelecimento de explantes *in vitro* (Figura N° 5). Segundo Benson (2000), a oxidação leva ao aumento na formação de radicais livres que são responsáveis por danos irreparáveis ao DNA, proteínas e enzimas, causando disfunção celular, levando a morte do explante.

O estabelecimento *in vitro* dos explantes de segmentos nodais advindos de brotos dos primeiros galhos da copa, brotos oriundos da poda dos galhos da copa e de anelamento não foi possível em razão da contaminação fúngica e bacteriana (Figuras N° 6 e N° 7). Observa-se que os percentuais de contaminação fúngica e bacteriana desses três tipos de broto foram elevados,

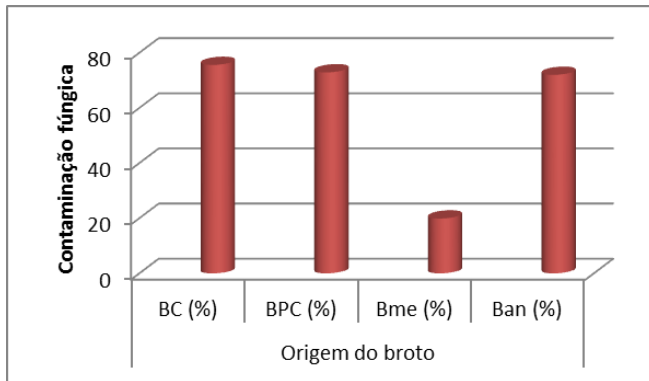
principalmente devido a sua origem direta do campo, em que estão expostos a todos os tipos de patógenos. Diferentemente dos segmentos nodais advindos da megaestaca, que permaneceram em casa de vegetação até o surgimento das brotações, assegurando maior controle fitossanitário, corroborando com as afirmações de Grattapaglia e Machado (1998), onde destacam que o estado fisiológico da planta matriz de onde são coletados os explantes, apresenta grande influência no posterior comportamento das culturas *in vitro*.



**Figura N° 4**  
**MÉDIAS DA OXIDAÇÃO DE EXPLANTES DE *Eucalyptus benthamii***  
**EM RELAÇÃO A ORIGEM DO BROTO**

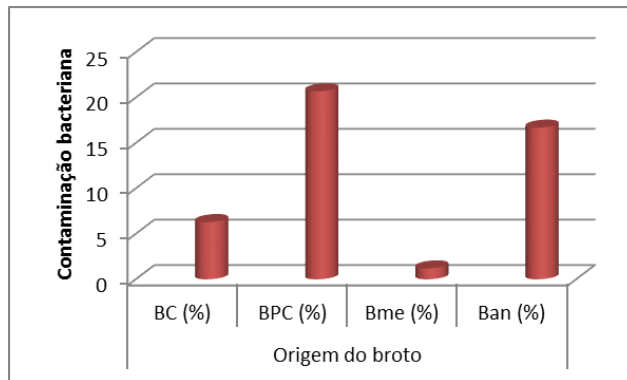


**Figura N° 5**  
**MÉDIAS DO ESTABELECIMENTO (EST) DE EXPLANTES DE *Eucalyptus benthamii***  
**EM RELAÇÃO A ORIGEM DO BROTO**



BC– Brotos dos primeiros galhos da copa, BPC – Brotos oriundos da poda dos galhos da copa, BMe – broto da megaestaca, BAn – broto do anelamento

**Figura N° 6**  
**MÉDIAS DA CONTAMINAÇÃO FÚNGICA (FUN) DE EXPLANTES DE *Eucalyptus benthamii***  
**EM RELAÇÃO A ORIGEM DO BROTO**



BC– Brotos dos primeiros galhos da copa, BPC – Brotos oriundos da poda dos galhos da copa, BMe – brotos da megaestaca, BAn – brotos do anelamento

**Figura N° 7**  
**MÉDIAS DA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA (BAC) DE EXPLANTES DE *Eucalyptus benthamii***  
**EM RELAÇÃO A ORIGEM DO BROTO**

Mesmo com o estabelecimento de um protocolo de assepsia menos rigoroso na pré introdução dos brotos de origem do anelamento, em relação ao protocolo estabelecido aos brotos dos primeiros galhos da copa, brotos oriundos da poda dos galhos da copa e de anelamento, estes apresentaram índices de contaminação maiores. Esse efeito demonstra a importância do controle fitossanitário do material vegetal fornecedor de explantes, desde seu aparecimento até o momento da introdução e não somente momentos antes da introdução. Esses resultados estão de acordo com Grattapaglia e Machado (1998) que citam que quando se utiliza material vegetativo diretamente do campo, os tratamentos para assepsia devem ser mais criteriosos, em virtude dos explantes apresentarem maiores níveis de contaminação, e geralmente as concentrações e tempos

de exposições aos agentes desinfetantes são maiores, em comparação com os explantes provenientes de ambientes protegidos.

De acordo com Brondani *et al.* (2009) os índices de estabelecimento *in vitro* de explantes (no caso de segmentos nodais) geralmente são elevados quando as brotações são originadas de minicepas (planta fornecedora de brotações) cultivadas em minijardim clonal protegido, devido ao maior controle ambiental e nutricional, em comparação aos explantes originados de árvores adultas coletados diretamente no campo, condições essas semelhantes as com brotações da megaestaca.

Apesar de os segmentos nodais advindo de brotos da megaestaca apresentarem menores índices de contaminação por bactérias e fungos, foram os únicos que apresentaram contaminação com algas (3,2%). A alga não interferiu no desenvolvimento inicial dos explantes, no entanto, após três subcultivos verificou-se competição com o explante. Para diminuir a competição entre os explantes e a alga, estes foram lavados dentro do fluxo laminar com água destilada e autoclavada, e para o controle total das mesmas adicionou-se uma gota de algicida ao meio de cultura após a autoclavagem e solidificação, o protocolo mostrou-se eficiente no controle da manifestação da alga.

O melhor explante para a introdução *in vitro* foi caracterizado pelo uso dos segmentos nodais advindos da megaestaca, onde se obteve o estabelecimento *in vitro* para todos os clones. Porém, devido à variabilidade genética presente nas matrizes, houve variação no percentual de estabelecimento *in vitro* dos clones de 62% a 90%. Apesar de ter ocorrido variação da porcentagem entre os clones, a megaestaca mostrou ser a melhor alternativa para o estabelecimento *in vitro* de plantas adultas de *E. benthamii*, sendo recomendada sua utilização para o resgate de material genético adulto, estabelecido em condições de campo.

## CONCLUSÃO

Os resultados permitem concluir que a utilização da megaestaca como doadora de explantes para o cultivo *in vitro*, mostrou ser o método mais eficiente para o resgate de matrizes adultas de *E. benthamii*, uma vez que as microestacas apresentaram elevado índice de enraizamento.

O uso de brotos do anelamento para estaquia embora em menor porcentagem mostrou-se satisfatório para o enraizamento.

Já os brotos dos primeiros galhos da copa e os oriundos da poda dos galhos da copa, não são recomendados para o resgate de matrizes de *E. benthamii*, para nenhum dos tipos de materiais vegetais avaliados.

## REFERENCIAS

**Alfenas, A. C.; Demuner, N. L. and Silva, A. R., 1988.** Benomyl Resistant Strain of *Cylindrocladium scoparium* Causal Agent of Cutting Rot of *Eucalyptus Grandis* in Brazil. ISPP. Chemical Control Newsletter, Califórnia, V. 10, P. 23-25..

**Alfenas, A. C.; Zauza, E. A. V.; Mafia, R. G. e Assis, T. F., 2004.** Clonagem e Doenças do Eucalipto. Viçosa: Ufv, 2004. 442 P.

**Assis, T. F., 1997.** Propagação Vegetativa de *Eucalyptus* por Microestaquia. In: IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalypts, 1997, Salvador. Proceedings... Colombo: EMBRAPA. V. 1, P. 300-304.

**Benson, E. E., 2000.** Special Symposium: *In Vitro* Plant Recalcitrance. Do Free Radicals Have a Role in Plant Tissue Culture Recalcitrance? *In Vitro Cell Developmental Biology Plant*, Dundee, V. 36, P. 163–170, 2000.

**Brondani, G. E.; Dutra, L. F.; Grossi, F.; Wendling, I. e Hornig, J., 2009.** Estabelecimento, Multiplicação e Alongamento *In Vitro* de *Eucalyptus Benthamii* Maiden & Cambage X *Eucalyptus Dunnii* Maiden. Revista Árvore, Viçosa, V. 33, N. 1, P. 11-19.

**Brondani, G. E.; Baccarin, F. J. B.; Ondas, H. W. W.; Stape, J. L.; Goncalvez, A. N. and Almeida, M., 2012.** Low Temperature, IBA Concentrations and Optimal Time for Adventitious Rooting of *Eucalyptus benthamii* Mini-Cuttings. Journal of Forest Research, In press.

**Eldridge, K.; Davidson, J.; Hardwiid, C. and Van Wyk, G., 1994.** Eucalypt Domestication and Breeding. Oxford: Clarendon Press, 312 P.

**Ferreira, F. A., 1989.** Patologia Florestal: Principais Doenças Florestais No Brasil. Viçosa: Ufv; Sif, 570 P

**George, E. F.; Hall, M. A. and De Klerk, G. J., 2008.** Plant Propagation by Tissue Culture. 3<sup>rd</sup> Ed. Dordrecht: Springer, 2008. V. 1, 501 P.

**Gomes, A. L., 1987.** Propagação Clonal: Princípios e Particularidades. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 1987. 69 P. (Série Didáctica, Ciências Aplicadas, 1).

**Grattapaglia, D. e Machado, M. A., 1998.** Micropropagação. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (Ed.). Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Brasília: EMBRAPA, Pi; EMBRAPA, CNPH. P.183-260.

**Greenwood, M. S. and Hutchison, K. W., 1993.** Maturation as an Developmental Process. In: Ahuja, M. R.; Libbyw. J. Clonal Forestry: Genetics and Biotechnology. Budapest: Springer-Verlag, P. 14-33.

**Haapala, T., 2004.** Establishment and Use of Juvenility for Plant Propagation in Sterile and Non-Sterile Conditions. 2004. 53 P. Thesis (Academic Dissertation) - University Of Helsinki, Helsinki.

**Hackett, W. P., 1987a.** Donor Plant Maturation and Adventitious Root Formation. In: Davies, T. D.; Haissig, B. E.; Sankhla, N. Adventitious Root Formation In Cuttings. Portland: Dioscorides Press, P. 11-28. (Advances In Plant Sciences Series, 2).

**Hackett, W. P., 1987b.** Juvenility And Maturity. In: Cell and Tissue Culture in Forestry. Dordrecht: Kluwer Academic, P. 216-231.

**Hackett, W. P., 1988.** Donor Plant Maturation and Adventitious Root Formation. In: Davies, T. D.; Haissig, B. E. E.; Sankhla, N. Adventitious Root Formation in Cuttings. Portland: Dioscorides Press, V. 2, P. 11-28.

**Hartmann, H. T.; Kester, D. E.; Davies Junior, F. T. and Geneve, R. L., 1997.** Plant Propagation: Principles and Practices. 6th Ed. New Jersey: Prentice Hall., 770 P.

**Higa, R. C. V. e Pereira, J. C. D., 2003.** Usos Potenciais do *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage. Colombo: EMBRAPA Florestas. 4 P. (Comunicado Técnico, 100).

**Lerch, K., 1981.** Copper Monooxygenases: Tyrosine and Dopamine B-Monooxygenase. In: Sigel, H. (Ed.). Metal Ions In Biological Systems. New York; Basel, Marcel Dekker. P. 143-186.

**Murashige, T. and Skoog, F. A., 1962.** A Revised Medium for a Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissues Cultures. Plant Physiology, Wisconsin, V. 15, P. 473-479.

**Nisgoski, S.; Muñoz, G. I. B. De e Klock, U., 1998.** Caracterização Anatômica da Madeira de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage. Ciência Florestal, Santa Maria, V. 8, N. 1, P. 67-76.

**Paul, E. A. and Clark, F. E., 1989.** Soil Microbiology and Biochemistry. San Diego: Academic Press, 552 P.

**Pryor, L. D., 1981.** Australian Endangered Species: *Eucalyptus*. Canberra: Commonwealth of Australia. 139 P.

**Valledor, L.; Hasbún, R.; Meijón, M.; Rodríguez, J. L.; Santamaría, E.; Viejo, M.; Berdasco, M.; Feito, I.; Fraga, M. F.; Cañal, M. J. and Rodríguez, R., 2007.** Involvement of DNA Methylation In Tree Development and Micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Amsterdam, V. 91, P. 75-86.

**Wendling, I.; Ferriani, A. P.; Biassio, A. y Heberle, M., 2006.** Miniestacas de Origem Juvenil e Adulta e Concentrações de Ácido Indolbutírico Na Miniestaquia de Erva-Mate (*Ilex Paraguariensis* St. Hil.). In: Congresso

Sudamericano de la Yerba Mate, Reunión Técnica de La Yerba Mate, 4.; Exposición de Agronegocios de la Yerba Mate, 2. Misiones. Anais... Posadas: Instituto Nacional de la Yerba Mate. V. 1, P. 189-193

**Xavier, A.; Wendling, L. e Silva, R. L., 2009.** Silvicultura Clonal: Princípios e Técnicas. Viçosa: Ed. UFV. 272 P.

**Zimmermann, M. and Brown, C. L., 1974.** Trees Structure and Function. New York: Spring Verlag. 336 P.