



MICROPROPAGAÇÃO DE CLONES DE *EUCLYPTUS GLOBULUS* RESISTENTES A *TERATOSPHAERIA NUBILOSA*

Tailhane Luíza Andrade de Sousa-⁽¹⁾ Marlene Cesar Isabel-⁽²⁾ Vanessa Elisbão da Silva-⁽³⁾
Rosiane Fátima de Almeida⁽⁴⁾

RESUMO

Eucalyptus globulus é economicamente valioso pela madeira e óleo essencial, mas seu cultivo é limitado pela suscetibilidade a *Teratosphaeria nubilosa* e dificuldade de enraizamento de clones superiores. Este estudo apresenta avanços na construção de um protocolo de micropropagação para clones de *E. globulus* resistentes a *T. nubilosa*, obtendo sucesso na introdução e primeiros subcultivos, mas sem resultados satisfatórios no alongamento e enraizamento.

Palavras-chave: Clonagem. Cultura de tecidos. Propagação.

1 INTRODUÇÃO

Dentre as espécies de *Eucalyptus* com potencial de exploração comercial, o *Eucalyptus globulus* Labill. destaca-se pela alta qualidade da madeira para a indústria de celulose e pelo bom rendimento em óleo essencial a partir das folhas (MOHAMMED *et al.*, 2024).

Apesar de potencial de exploração, o cultivo de *E. globulus* enfrenta grandes desafios. Um deles é a alta suscetibilidade ao fungo *Teratosphaeria nubilosa* (Cooke) Crous & U. Braun (= *Mycosphaerella nubilosa*, filo Ascomycota), um patógeno severo que causa desfolha acentuada e perdas significativas de produtividade (PASSADOR *et al.*, 2012). A seleção e o plantio de genótipos resistentes é a principal estratégia para o controle da doença, conhecida como *Teratosphaeria Leaf Disease* (TLD) (ALFENAS *et al.*, 2009).

Contudo, a forte recalcitrância ao enraizamento adventício em *E. globulus* (NEGISHI *et al.*, 2014) dificulta a propagação clonal em larga escala, limitando o aproveitamento de genótipos superiores resistentes a *T. nubilosa*.

^{1,2,3}Engenharia Florestal | Instituto Federal de Minas Gerais - *campus* São João Evangelista

⁴Engenharia Florestal | Mestre e Doutora em Fitopatologia | Instituto Federal de Minas Gerais - *campus* São João Evangelista



Diante desse cenário, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de micropropagação *in vitro* para a multiplicação massal e a conservação de genótipos de *E. globulus* selecionados por sua resistência à *T. nubilosa*.

2 METODOLOGIA

Mudas clonais de quatro clones de *E. globulus* com resistência/suscetibilidade conhecida à *T. nubilosa*, provenientes da empresa Clonar Resistência à Doenças Florestais (Cajuri, Minas Gerais) foram consideradas como plantas doadoras de explantes. As mudas foram cultivadas por 60 dias em casa de vegetação do Instituto Federal de Minas Gerais – *campus* São João Evangelista (IFMG-SJE), sob condições controladas de temperatura, irrigação e sombreamento, em substrato comercial enriquecido com fertilizantes.

Sete dias antes da coleta, as plantas doadoras foram tratadas com fungicida Cercobin® (1g L⁻¹). Posteriormente, brotações axilares jovens foram colhidas, tiveram as folhas cortadas pela metade para facilitar o processamento e foram transportadas em água fria ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do IFMG-SJE.

Para a desinfestação do material, os ramos foram lavados em água corrente e depois submetido a uma sequência de imersões (Figura 1B): i) solução de fungicida Cercobin® (1g L⁻¹) com Tween 20 (0,05% v/v) por 15 minutos; ii) álcool 70% por 30 segundos; e, iii) hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,0% por 10 minutos. Realizaram-se enxágues com água destilada autoclavada entre cada etapa, permanecendo os ramos imersos em água ao final, para evitar desidratação.

O método de micropropagação testado foi o de indução de multibrotação, utilizando-se como explantes segmentos nodais de 1,5 cm e partindo do protocolo padrão do laboratório. Os explantes foram inoculados em meio MS suplementado com 500 µL de benzilaminopurina (BAP, 1 mg mL⁻¹) e 100 µL de ácido 1-naftalenoacético (ANA, 1 mg mL⁻¹) (Figura 1C). Foram mantidos no escuro por até sete dias e, em seguida, transferidos para câmara de crescimento a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas sob luz branca fria. Após 20-30 dias da introdução, o material foi transferido para tubos contendo 6 mL de meio multiplicação, isto é, meio MS basal suplementado com 700 µL de BAP (1 mg mL⁻¹) e 20 µL de ANA (1 mg mL⁻¹), passando por cinco subcultivos sob as mesmas condições da fase de introdução. Para o enraizamento, os

^{1,2,3}Engenharia Florestal | Instituto Federal de Minas Gerais - *campus* São João Evangelista

⁴Engenharia Florestal | Mestre e Doutora em Fitopatologia | Instituto Federal de Minas Gerais - *campus* São João Evangelista



brotos foram cultivados em vermiculita ou areia autoclavada (Figura 1D), recebendo semanalmente solução de MAP (1 g L^{-1}) ou fertilizante Flex Vermelho Plantpar®, em condições de ambiente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estabelecimento *in vitro* de clones de *E. globulus* foi um processo iterativo, no qual os protocolos foram sistematicamente ajustados ao longo de múltiplos ensaios. Na figura 1, tem-se a relação do total de tubos inoculados (esquerda) e enraizados (direita) em cada um dos lotes de micropropagação (eixo x).

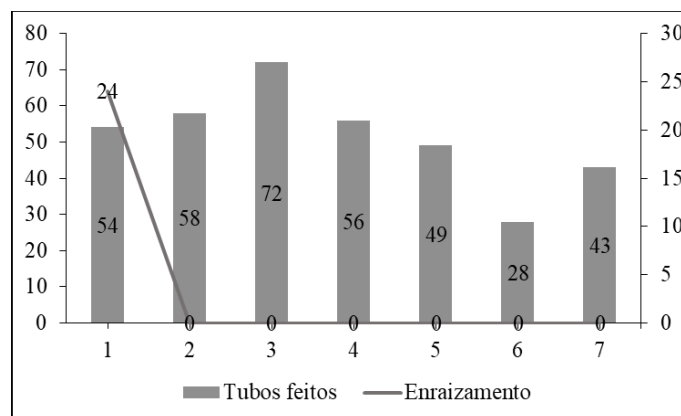


Figura 1- Total de tubos inoculados e enraizados em cada um dos lotes de micropropagação de *E. globulus*.

Os lotes experimentais iniciais (lotes 1, 2 e 3, que equivalem aos momentos de coletas de brotações das plantas doadoras) tiveram perdas de quase 100% dos explantes devido à contaminação microbiana (Figura 2A) e à oxidação severa (Figura 2B). A exceção foram amostras do lote 1, que passaram pela introdução (Figura 2C), cinco multiplicações (Figura 2D) e pelo enraizamento. No entanto, nenhuma das dez amostras analisadas em vermiculita ou areia desenvolveram raiz (Figura 2E). Lotes subsequentes, como o lote 4, 5 e o lote 6, também apresentaram perdas massivas, demonstrando que os ajustes parciais realizados, isto é, na desinfestação do material (imersão em NaOCl a 2,5% por 15 minutos ao invés de imersão em NaOCl a 2,0% por 10 minutos) e na concentração de PVP ($8,0 \text{ g L}^{-1}$ ao invés de $0,8 \text{ g L}^{-1}$) foram insuficientes para garantir a viabilidade das culturas.

^{1,2,3}Engenharia Florestal | Instituto Federal de Minas Gerais - *campus* São João Evangelista

⁴ Engenharia Florestal | Mestre e Doutora em Fitopatologia | Instituto Federal de Minas Gerais - *campus* São João Evangelista

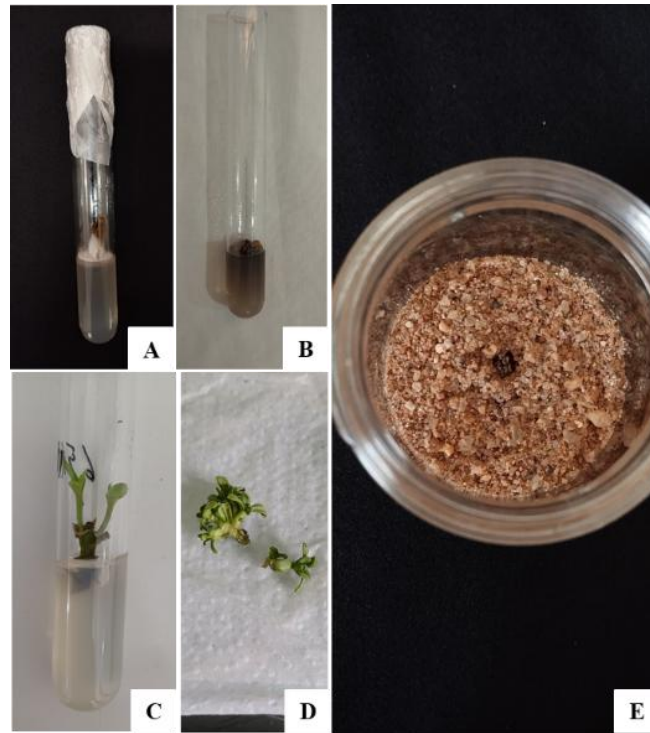


Figura 2- Resultados das etapas de micropropagação de clones de *Eucalyptus globulus*. **A.** Explante com contaminação microbiana. **B.** Explante com oxidação severa. **C.** Fase de introdução. **D.** Multibrotação. **E.** Brotação morta no enraizamento.

O lote 7 de micropropagação apresentou os melhores resultados na fase de estabelecimento após ajustes no protocolo, como o uso de brotações mais maduras, adição do fungicida Orthocide® na fase de desinfestação e redução do período de incubação no escuro para 24 horas, o que diminuiu significativamente as perdas por contaminação e oxidação.

A literatura confirma que altas concentrações de NaClO e a seleção de brotos mais maduros são essenciais para reduzir contaminações e oxidações em explantes de *Eucalyptus* (BORGES *et al.*, 2012), corroborando que o sucesso do lote 7 resulta da adequação dessas práticas, embora o material genético utilizado ainda exija ajustes específicos ao protocolo. A redução do período de incubação no escuro de sete dias para 24 horas foi decisiva para controlar o estresse oxidativo e reduzir contaminações, contrariando estudos anteriores (FETT-NETO *et al.*, 2001) que indicavam benefícios de períodos mais longos de incubação, no que tange o enraizamento.

^{1,2,3}Engenharia Florestal | Instituto Federal de Minas Gerais - *campus* São João Evangelista

⁴Engenharia Florestal | Mestre e Doutora em Fitopatologia | Instituto Federal de Minas Gerais - *campus* São João Evangelista



Devido à perda de vigor observada após vários subcultivos no lote 1, pretende-se testar o enraizamento do lote 7 com material menos rejuvenescido, partindo da hipótese de que, por derivarem de plantas seminais não submetidas a clonagens sucessivas, esses explantes manterão maior potencial fisiológico.

4 CONCLUSÃO

O aumento de desinfestantes e a redução do tempo de incubação diminuíram as perdas iniciais na micropropagação, que demonstrou potencial para multiplicar genótipos de *E. globulus*; contudo, a ausência de enraizamento indica a necessidade de aperfeiçoar reguladores, substratos e técnicas para viabilizar a propagação clonal em larga escala.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2009. 500 p.

ALMEIDA, Márcia Rodrigues de. Bases moleculares da recalcitrância ao enraizamento adventício em *Eucalyptus globulus* Labill. 2015.

BORGES, Silvano Rodrigues; SILVA FILHO, José da; ARAÚJO, Maria de Lourdes. Estabelecimento in vitro de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 3, p. 605-616, jul./set. 2012.

FETT-NETO, A. G. et al. Distinct effects of auxin and light on adventitious root development in *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globulus*. **Tree Physiology**, v. 21, n. 7, p. 457-464, 2001.

MOHAMMED, H. A. et al. Comparative study of volatile oil constituents, anti-microbial properties, and antibiofilm activities in *Eucalyptus camaldulensis* and *Eucalyptus globulus*: insights from central Saudi Arabia. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 27, n. 2, p. 341-355, 2024.

NEGISHI, N. et al. Hormone level analysis on adventitious root formation in *Eucalyptus globulus*. **New Forests**, v. 45, n. 4, p. 577-587, 2014.

PASSADOR, M. M. et al. *Teratosphaeria nubilosa* em plantações comerciais de *Eucalyptus globulus* nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 38, p. 11-16, 2012.

^{1,2,3}Engenharia Florestal | Instituto Federal de Minas Gerais - *campus* São João Evangelista

⁴Engenharia Florestal | Mestre e Doutora em Fitopatologia | Instituto Federal de Minas Gerais - *campus* São João Evangelista