

Colombo, PR / Novembro, 2025

Protocolo de organogênese direta em *Pinus elliottii* var. *elliottii*: fase de indução e desenvolvimento de brotações adventícias

Julia Heduarda Giacomel Balbinotti⁽¹⁾, Julia Maria Bassetto Brandalize⁽²⁾, Pamela Keiko Harada⁽³⁾, Regina Caetano Quisen⁽⁴⁾



⁽¹⁾ Estudante de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. ⁽²⁾ Estudante de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. ⁽³⁾ Analista, Embrapa Florestas, Colombo, PR. ⁽⁴⁾ Pesquisadora, Embrapa Florestas, Colombo, PR.

Introdução

O gênero *Pinus* ocupa cerca de 2 milhões de hectares no Brasil, com árvores plantadas para fins comerciais, correspondendo a 19% do total da área do setor florestal, com destaque para a produção de celulose de fibra longa, madeira, resina e biomassa energética (Indústria Brasileira de Árvores, 2024). Dentre as espécies cultivadas no Sul do País, destaca-se *Pinus elliottii* Engelm. var. *elliottii*, principal fonte de resina destinada às indústrias de cosméticos, pneus, tintas e muitos outros produtos (Moreira et al., 2014). No entanto, a produção de mudas dessa espécie ainda se baseia predominantemente em sementes, o que resulta em elevada variabilidade genotípica e compromete a uniformidade dos plantios. A silvicultura clonal, vista como alternativa estratégica para aumentar a homogeneidade e o rendimento resinífero, enfrenta obstáculos significativos, sobretudo devido às dificuldades no resgate de material adulto e ao envelhecimento fisiológico das árvores-elite. Como consequência, a propagação vegetativa de *P. elliottii* em escala comercial permanece inviável, mantendo os plantios dependentes de sementes e limitando o avanço de

programas voltados à produção de resina (Ishibashi et al., 2022).

Nesse contexto, compreende-se que os principais entraves para o estabelecimento de protocolos de clonagem eficientes e reprodutíveis de espécies de pinus, seja por estaquia, enxertia ou cultivo in vitro, estão diretamente relacionados às características do gênero *Pinus*. A baixa capacidade de regeneração e a maturidade fisiológica do material constituem barreiras determinantes, restringindo a propagação vegetativa ao uso de propágulos juvenis, resultando em taxas de multiplicação insuficientes para atender à demanda comercial. Além disso, a eficiência desses métodos é fortemente influenciada pelo genótipo, de modo que indivíduos ou famílias podem apresentar respostas contrastantes sob as mesmas condições de propagação (Bonga et al., 2010).

Diante destas dificuldades, diversas pesquisas têm buscando superar tais limitações, explorando técnicas de cultivo in vitro, entre as quais a organogênese adventícia direta. Nesse processo, as células do explante são induzidas a formar meristemas adventícios que originam estruturas unipolares, como brotações, que posteriormente necessitam

passar pela fase de enraizamento para originar plantas clonais (Kareem et al., 2016).

Na organogênese de *Pinus* spp, a benzilaminopurina (BAP) é reconhecida como o regulador vegetal mais efetivo na formação de brotações adventícias, sendo que tanto a concentração quanto o tempo de exposição influenciam a qualidade e a quantidade de brotações (Moncaleán et al., 2005). Outro fator determinante é a composição do meio basal, especialmente quanto à disponibilidade de nitrogênio, como evidenciado nos meios WV5 (Coke, 1996) e DCR (Gupta; Durzan, 1985), nos quais o primeiro apresenta maiores teores desse nutriente em relação ao segundo (Coke, 1996; Oliveira et al., 2012; Nunes et al., 2018).

Em *P. elliotii*, estudos demonstraram que o maior número de brotações adventícias foi obtido a partir de explantes cotiledonares isolados e cultivados por 28 dias em meio contendo GD1 com 66 μM de BAP, enquanto as brotações de maior altura foram observadas após tratamento de pulso, por período de 14 dias, em meio contendo 22 μM de BAP (Bronson; Dixon, 1991). Resultados semelhantes foram relatados por Lihua e Xiaoqin (2006) que verificaram maior frequência e tamanho de brotações em embriões zigóticos cultivados em meio GD com 266 μM de BAP, por 12 e 24 horas, respectivamente. Para *P. taeda*, por sua vez, a organogênese tem sido predominantemente indireta, com maior taxa de diferenciação de brotos observada após 12 semanas, em meio TE (Tang; Ouyang, 1998) suplementado com ácido diclorofenóxiacético (2,4-D) ou ácido naftalenoacético (ANA) e BAP, em baixas concentrações de BAP. Contudo, nota-se ainda a escassez de trabalhos relatados na literatura.

Considerando este cenário, o presente documento foi elaborado com o objetivo de apresentar detalhadamente os procedimentos para a indução e o desenvolvimento de brotações adventícias por via da organogênese direta de *P. elliotii*, além dos resultados obtidos nas condições experimentais adotadas. Ressalta-se que, embora as taxas de multiplicação nessa fase ainda sejam reduzidas para a produção em escala massal, as brotações formadas constituem propágulos viáveis e podem ser integradas a outros sistemas de regeneração, como a microporpropagação ou embriogênese somática.

O procedimento de organogênese direta em *P. elliotii* var. *elliotii* deve ser realizado utilizando meios específicos: DCR contendo sais e vitaminas, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar e BAP em regime de pulso e o meio WV5 suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 1 g L⁻¹ de carvão ativado e 8 g L⁻¹ de ágar. Os explantes, constituídos

de embriões zigóticos reduzidos, devem ser inicialmente cultivados em meio de indução (MI) composto pelo meio basal de DCR acrescido de 44,4 μM de BAP, por 7 dias. Em seguida, realizam-se três subculturas de 28 dias cada em meio de desenvolvimento e proliferação de brotações (MDP) composto pelo meio basal de DCR acrescido de 0,44 μM de BAP. Por fim, as brotações devem ser transferidas para meio de alongamento (MA) composto pelo meio basal de DCR sem regulador de crescimento, por 28 dias.

A condição descrita neste comunicado técnico é recomendada como protocolo de referência para a indução e desenvolvimento de brotações adventícias, com base nos resultados apresentados na Tabela 1. Nesta tabela, o tratamento 2 que corresponde ao procedimento adotado neste comunicado apresentou a menor proporção de gemas atrofiadas (20,8%) e a maior frequência de brotações, tanto na faixa de < 15 mm (45,8%) quanto $\geq$ 15 mm (8,3%). Em contraste, os demais tratamentos apresentaram porcentagens mais elevadas de gemas atrofiadas e menor produção de brotações de maior porte, evidenciando a superioridade do meio e regime adotados (Figura 1).

Metodologia para a indução e desenvolvimento de brotações adventícias

Material vegetal, reagentes equipamentos e cuidados necessários

A metodologia foi desenvolvida utilizando-se sementes maduras de *P. elliotii* var. *elliotii*. A conservação adequada das sementes, desde a coleta até utilização, é fundamental para garantir a integridade do material e o sucesso do cultivo in vitro. Após o beneficiamento dos cones, as sementes devem ser armazenadas em sacos plásticos em ambiente resfriado sob temperatura de 4° $\pm$ 2 °C, evitando-se flutuações de temperatura que possam comprometer a viabilidade dos propágulos.

Para a execução desta metodologia, são necessários infraestrutura e equipamentos básicos de um laboratório de cultura de tecidos. O laboratório deve contar com salas específicas: sala de preparo de meios e soluções, sala de inoculação, sala de crescimento climatizada e sala de lavagem de vidraria e de esterilização. Entre os equipamentos essenciais destacam-se: balanças de precisão e analítica, pHmetro, agitador magnético, autoclave, estufa de secagem e esterilização, capela de fluxo laminar, além de vidrarias diversas, incluindo frascos de cultura

(250 mL), placas de Petri, pinças bisturis, lamparinas e materiais descartáveis.

As placas de Petri, frascos e água destilada a serem utilizados na assepsia das sementes e na inoculação devem ser autoclavados sob temperatura de 121 °C, por 30-40 minutos. e os meios de cultura autoclavados por 15-20 minutos.

Os meios de cultura utilizados apresentam, em sua formulação básica, sais e vitaminas de DCR (Gupta e Durzan, 1985) e WV5 (Coke, 1996) (Tabela 2), além de sacarose, BAP, carvão ativado e

água. Para a assepsia das sementes, são empregados agentes desinfestantes tais como peróxido de hidrogênio 40V, hipoclorito de sódio comercial com 2,5% de cloro ativo 50% (v/v) e álcool 70%.

É importante lembrar que todos os materiais de apoio a serem utilizados no interior da câmara de fluxo laminar devem estar previamente esterelizados, quando aplicável, borrifados com álcool 70%. Os cuidados neste ambiente são essenciais para minimizar o risco de contaminação do cultivo in vitro.

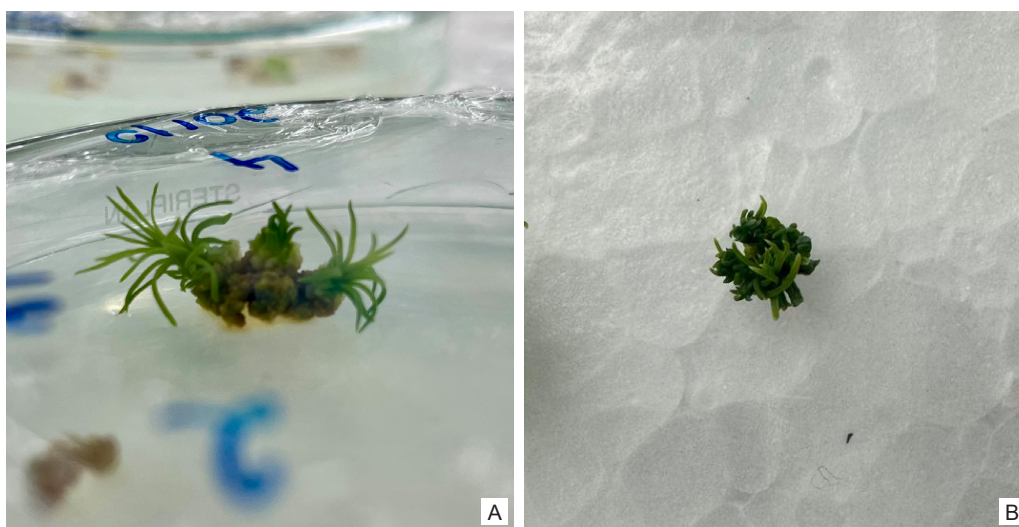


Figura 1. Brotações adventícias de *Pinus taeda* L. formadas por organogênese indireta, a partir de tecidos de embriões zigóticos cultivados in vitro. (A) Brotações com desenvolvimento morfológico normal, individualizadas e bem definidas, com alongamento das acículas; (B) Brotações atrofiadas, pequenas e compactas, com acículas curtas e crescimento reduzido.

Tabela 1. Efeitos de tratamentos “pulse” com BAP em meio DCR sobre a organogênese direta de *P. elliottii* var. *elliottii*, considerando a perda por contaminação (%PER), explantes não responsivos (%NRP), formação de gemas atrofiadas (%GAT), formação de brotações < 15mm (%BRP) e brotações ≥ 15 mm (%BRM), após 120 dias de cultivo.

Tratamento	%PER	%NRP	%GAT	%BRP	%BRM
1	16,7 ± 13,6	8,3 ± 9,4	66,7 ± 23,6 a	4,2 ± 8,4 b	0,0 ± 0,0
2	25,0 ± 16,7	0,0 ± 0,0	20,8 ± 15,9 b	45,8 ± 8,35 a	8,3 ± 16,7
3	25,0 ± 16,7	8,3 ± 9,6	62,5 ± 20,9 a	4,2 ± 8,4 b	0,0 ± 0,0
4	20,8 ± 8,3	8,3 ± 9,6	50 ± 23,6 a	20,8 ± 8,3a	0,0 ± 0,0
5	29,2 ± 15,9	4,2 ± 8,3	66,7 ± 23,6 a	0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0
6	20,8 ± 15,9	16,7 ± 23,6	62,5 ± 8,4 a	0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0

Tratamentos: 1 - MI /7 dias + MDP com 4,44 µM BAP /85 dias + MA/28 dias; 2 - MI /7 dias + MDP com 0,44 µM BAP/85 dias + MA/28 dias; 3 - MI/14 dias + MDP com 4,44 µM BAP/78 dias + MA/28 dias; 4. 1. MI/14 dias + MDP com 0,44 µM BAP/78 dias + MA/28 dias; 51. MI/28 dias + MDP com 4,44 µM BAP/64 dias + MA/28 dias e 6 - MI/28 dias + MDP com 0,44 µM BAP/64 dias + MA/28 dias.

Meio de cultura

Os explantes devem ser cultivados em placas de Petri contendo 25 mL do meio de indução à organogênese adventícia (MI), composto por sais e vitaminas da formulação DCR suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 44,4 µM de BAP e 7 g L⁻¹ de ágar (Tabela 2). O meio de diferenciação e proliferação de gemas adventícias (MDP), utilizado após o período de pulso, contém sais e vitaminas da formulação DCR suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,44 µM de BAP e 7 g L⁻¹ de ágar. Na fase de alongamento de brotações adventícias, para individualização e crescimento dos brotos formados, utiliza-se o meio basal de WV5 suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 1 g L⁻¹ de carvão ativado e 8 g L⁻¹ de ágar (MA).

Tabela 2. Composição dos meios de cultivo de DCR (GUPTA e DURZAN, 1985) e WV5 (COKE, 1996)

Nutrientes	DCR	WV5
Macronutrientes (mg L⁻¹)		
NH ₄ NO ₃	400	700
KNO ₃	340	1084,6
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	556	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	85	600
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	1848,6
KH ₂ PO ₄	170	270
KCl		718,67
Micronutrientes (mg L⁻¹)		
MnSO ₄ ·H ₂ O	22,3	15,16
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	8,6
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,25	0,25
KI	0,83	0,025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,83
H ₃ BO ₃	6,2	31
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,3	27,8
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37,3	37,3
Vitaminas (mg L⁻¹)		
tiamina	1	0,4
ácido nicotínico	0,5	
piridoxina	0,5	
mio-inositol	200	1000
Aminoácido (mg L⁻¹)		
glicina	2	

De maneira simplificada, o preparo do meio de cultura segue as seguintes etapas:

Preparo da solução (1 L): (a) Adicionar 10 mL L⁻¹ das soluções-estoque (100×) de sais e vitaminas; (b) Acrescentar sacarose, mio-inositol, BAP e carvão ativado (quando necessário); (c) Completar a dissolução em ~700 mL de água destilada.

Ajuste e solidificação: (a) Ajustar o pH para 5,8; (b) Adicionar ágar, completar volume para 1 L e dissolver completamente por aquecimento (micro-ondas).

Distribuição e esterilização: Em frascos de cultura, dispensar ¼ do volume, tampar e autoclavar (121 °C, 15–20 min). Para placas de Petri, após ajuste do pH, colocar o meio em frasco reagente de laboratório (1,5 L), adicionar o ágar e, então, autoclavar. Após esterilização, verter o meio ainda líquido em placas estéreis e em ambiente asséptico de câmara de fluxo laminar.

Assepsia de sementes e preparo do explante

As sementes maduras de *P. elliotii* devem ser inicialmente lavadas em água corrente por 30 minutos, descartando-se aquelas que boiarem, indicativo de sementes vazias. Em seguida, estas devem ser imersas em solução de peróxido de hidrogênio 40V (~12%) e mantidas em agitação sob 100 rpm, por 60 minutos. O manuseio desta solução requer cuidado, pois é altamente oxidante, podendo causar queimaduras químicas na pele e mucosas, além de reagir violentamente com materiais orgânicos e metais.

Após o tempo de desinfestação, em ambiente estéril de fluxo laminar previamente limpo e preparado, as sementes devem ser enxaguadas abundantemente em água estéril e transferidas para frasco vazio estéril. A seguir, as sementes devem ser imersas em álcool 70%, por 60 segundos e em hipoclorito de sódio comercial 50% (v/v), por 20 minutos, seguidas de três enxágues em água destilada estéril.

O preparo de explantes deve ser realizado sempre sobre placas de Petri e com auxílio de pinças e bisturi (cabo 4 e lâmina 20) estéreis. As sementes devem ser cortadas na região da micrópila para facilitar a retirada do tegumento. Após a abertura da semente e exposição do megagametófito, deve-se cuidadosamente extrair o embrião zigótico, evitando-se machucá-lo. O terço inferior do embrião (região do meristema radicular) deve ser descartado antes da inoculação do explante em meio de cultura.

Inoculação dos embriões zigóticos, subculturas necessárias e condições de cultivo

Os embriões reduzidos em comprimento devem ser inoculados em meio MI. Recomenda-se inocular entre 10 a 12 explantes por placa, pois, em uma maior quantidade, aumenta-se o risco de perder toda a placa, caso ocorra alguma contaminação. Após sete dias, os explantes devem ser transferidos para meio MDP, com o objetivo de desenvolver e multiplicar gemas adventícias a partir das células rediferenciadas, mantendo-as nas mesmas condições ambientais, por 21 dias. O processo de subcultura deve ser repetido mais duas vezes em meio MDP fresco, com intervalos de 28 dias cada. Por fim, os grupos de brotações formadas devem ser transferidos para o meio MA, visando o maior crescimento e individualização das brotações, sendo cultivados nas mesmas condições ambientais, por mais 28 dias.

Em todas as fases da organogênese, os cultivos devem ser mantidos em sala de crescimento climatizada sob temperatura de $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas e intensidade de luz de $40\text{--}50\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ e umidade relativa de 60%.

Por fim, é importante destacar que a adoção dos procedimentos sugeridos pode resultar em variações nos rendimentos em função das adaptações e condições específicas de cada laboratório, além dos genótipos utilizados. Recomenda-se, portanto, que as orientações aqui descritas sejam seguidas com rigor, de modo a aproximar os resultados daqueles obtidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação da Embrapa Florestas.

O presente documento apresenta aderência aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) estabelecidos pela Agenda 2030 das Nações Unidas (ONU), em especial do ODS 12, por apresentar um procedimento para a indução e o desenvolvimento de brotações adventícias via organogênese direta de *Pinus elliottii*, demonstrando o uso eficiente dos recursos naturais.

Referências

- BONGA, J. M.; KLIMASZEWSKA, K. K.; VON ADERKAS, P. Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 100, p. 241-254, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9647-2>.
- BRONSON, M. R.; DIXON, R. K. Cultural factors influencing adventitious shoot and plantlet formation from slash pine cotyledons. *New Forests*, v. 5, p. 277-288, 1991.
- COKE, J. E. Basal nutrient medium for in vitro cultures of loblolly pines. United States Patent US5534433A, 9 jul. 1996. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/US5534433A/en>.
- GUPTA, P. K.; DURZAN, D. J. Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cell Reports*, v. 4, n. 4, p. 177-179, 1985.
- INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. Relatório anual 2024. Brasília, DF, 2024. 99 p. Disponível em: <https://iba.org/wp-content/uploads/2025/05/relatorio2024.pdf>.
- ISHIBASHI, V.; FLÔRES JUNIOR, P. C.; MARTINEZ, D. T.; COELHO, A. S. G.; HIGA, A. R. Estratégias de seleção genética para silvicultura clonal em *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. *Scientia Forestalis*, v. 50, e3858, 2022. DOI: <https://doi.org/10.18671/scifor.v50.30>.
- KAREEM, A.; RADHAKRISHNAN, D.; SONDHI, Y.; AIYAZ, M.; ROY, M. V.; SUGIMOTO, K.; PRASAD, K. De novo assembly of plant body plan: a step ahead of Deadpool. *Regeneration*, v. 3, n. 4, p. 182-197, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/reg2.68>.
- LIHUA, Z.; XIAOQIN, W. Plantlet regeneration via organogenesis from mature embryos of *Pinus elliottii*. *Scientia Silvae Sinicae*, v. 42, n. 8, 2006.
- MONCALEÁN, P.; ALONSO, P.; CENTENO, M. L.; CORTIZO, M.; RODRIGUÉZ, A.; FERNÁNDEZ B, ORDÁS R. J. Organogenic responses of *Pinus pinea* cotyledons to hormonal treatments: BA metabolism and cytokinin content. *Tree Physiology*, v. 25, n. 1, p. 1-9. DOI: <https://10.1093/treephys/25.1.1>. PMID: 15519980.
- MOREIRA, J. P.; SHIMIZU, J. Y.; SOUSA, V. A.; MORAES, M. L. T. de; MOURA, N. F.; AGUIAR, A. V. de. Ganho esperado na seleção de progênes de *Pinus elliottii* var. *elliottii* em idade precoce para produção de madeira. *Pesquisa Florestal Brasileira*, v. 34, n. 78, p. 99-109, 2014.
- NUNES, S.; SOUSA, D.; PEREIRA, V.; CORREIA, S.; MARUM, L.; SANTOS, C.; DIAS, M. C. Efficient protocol for in vitro mass micropropagation of slash pine (*Pinus elliottii* Engelm. var. *elliottii*). *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, v. 54, n. 2, p. 1-11, 2018.
- OLIVEIRA, L. F.; RIBAS, L. L. F.; QUOIRIN, M.; KOEHLER, H. S.; AMANO, E.; HIGA, A. R. Micropropagation of *Pinus taeda* L. from juvenile material. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*, v. 6, n. 1, p. 96-101, 2012.
- TANG, W.; OUYANG, F.; GUO, Z. C. Plant regeneration through organogenesis from callus induced from mature zygotic embryos of loblolly pine. *Plant Cell Reports*, v. 17, p. 557-560, 1998.

Embrapa Florestas

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

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Patrícia Póvoa de Mattos*Vice-presidente: *José Elidney Pinto Júnior*Secretária-executiva: *Elisabete Marques Oaida*

Membros: *Annete Bonnet, Cristiane Aparecida Fioravante Reis, Elene Yamazaki Lau, Guilherme Schnell e Schühli, Luis Claudio Maranhão Froufe, Marina Moura Morales, Paulo Marcelo Veras de Paiva e Sandra Bos Mikich.*

Comunicado Técnico 517

ISSN 1517-5030 / e-ISSN 1980-3982
Novembro, 2025

Edição executiva e revisão de texto: *José Elidney Pinto Júnior*Normalização bibliográfica: *Francisca Rasche*
(CRB-9/1204)Projeto gráfico: *Leandro Sousa Fazio*Diagramação: *Celso Alexandre de O. Eduardo*

Publicação digital: PDF



**Ministério da
Agricultura e Pecuária**

Todos os direitos reservados à Embrapa.