

CULTURA DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS *IN VITRO* DE DOIS GENÓTIPOS DE *Hevea brasiliensis*

Josiane Celerino de Carvalho¹; Rosineide da Paz Machado²; Ana Cláudia Lopes da Silva³; Marcelo Benevides dos Santos Júnior⁴; Andrea Raposo⁵; José Francisco de Carvalho Gonçalves⁶

¹ Eng. Flo., e Doutoranda do Lab. Fisiologia e Bioquímica Vegetal INPA; ² Eng. Agr.; Lab. Fisiologia e Bioquímica Vegetal INPA; ³ Eng. Flo., Lab. Fisiologia e Bioquímica Vegetal INPA; ⁴ Discente de Biotecnologia UFAM; ⁵ Embrapa Gado de Corte; ⁶ Coord. Lab. Fisiologia e Bioquímica Vegetal INPA

Identificação do evento: VI Congresso Brasileiro de Heveicultura - 22 a 24 de outubro de 2019, Belo Horizonte /MG.

Resumo: Devido ao aumento da demanda por produtos de borracha e, por conseguinte, dos plantios, há necessidade utilização de técnicas *in vitro* de propagação em larga escala de *Hevea brasiliensis*. A utilização da micropropagação utilizando como fonte de explantes embriões zigóticos pode garantir a viabilidade das sementes de *H. brasiliensis*. O objetivo do presente estudo foi estabelecer a cultura de dois genótipos de *H. brasiliensis in vitro*. O experimento foi conduzido no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal – LFBV, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. O experimento teve duração de 30 dias e foram avaliadas as seguintes variáveis: a porcentagem de germinação dos embriões zigóticos (todos os embriões entumecidos); emissão de hipocótilo, raiz secundária, primária, epicótilo, eofilos. O protocolo de desinfestação foi eficaz, com baixa contaminação dos embriões *in vitro*, os mesmos apresentaram alta porcentagem de germinação e o desenvolvimento das plântulas *in vitro* teve influência dos genótipos.

Palavra chaves: produtos de borracha, viabilidade de sementes e propagação.

Introdução

As seringueiras são tradicionalmente propagadas por enxertia a partir de clones selecionados provenientes de mudas ou de plantas de pomares de sementes de pé franco. Além da técnica de enxertia, a propagação da *H. brasiliensis* e de outros cultivos podem ocorrer *in vitro*, técnica promissora para a produção em larga escala de plantas, pois gera novas plantas a partir de sementes, fragmentos de tecido vegetais ou embriões (ANDRADE, 2002). Por sua vez, a cultura de embriões zigóticos pode permitir a propagação de plantas num menor tempo e representa importante desdobramento da técnica para o avanço de determinadas espécies (IGHERE et al., 2011).

A eficiência da cultura de embriões *in vitro* depende principalmente de diferentes genótipos, podem apresentar diferentes respostas na fase do embrião, formulação de meios de cultivo: sais minerais, hidratos de carbono, reguladores de crescimento, vitaminas, etc. e condições de inoculação (temperatura, luz /Escuro) (MONNIER, 1995; RAZDAN, 2003; KOTHARI et al., 2010; MANZUR et al., 2013).

Atualmente, grandes são as demandas por produtos de borracha, há necessidade de utilização de técnicas *in vitro* para propagação em larga escala de *H. brasiliensis*. Assim, a utilização da micropropagação utilizando como fonte de explantes embriões zigóticos pode garantir a viabilidade das sementes de *Hevea brasiliensis*. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo estabelecer a cultura de dois genótipos de *H. brasiliensis in vitro*.

Material e métodos

As sementes dos indivíduos na floresta nativa (selvagens) provenientes de cinco matrizes de *Hevea brasiliensis* foram coletadas em área localizada no Ramal Tatajuba km 17, município de Altamira-PA e as sementes de indivíduos de plantio (clone) provenientes de cinco matrizes de *H. brasiliensis* foram coletadas próximo à rodovia BR 163, município de Belterra-PA. Após a coleta, os frutos foram acondicionados em sacos de polietileno e transportados para o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (LFBV-INPA), onde foram realizados o beneficiamento das sementes e os experimentos relacionados ao cultivo *in vitro*.

As sementes passaram por dois processos de assepsia, dentro e fora da câmara de fluxo laminar. Primeiramente, as sementes foram lavadas com água e detergente ainda com tegumento, imersas em hipoclorito de sódio a 5%, durante 20 minutos, em seguida, foram retirados os tegumentos das sementes e feita à segunda assepsia em câmara de fluxo laminar, onde foram imersas em álcool 70% durante 2 minutos sob constante agitação e lavadas com água destilada autoclavada. Posteriormente, foi feita a desinfestação em hipoclorito 2%, durante 5 minutos, também sob constante agitação, e, por último, foi feita tríplice lavagem com água destilada autoclavada. O meio de cultura utilizado foi o M.S. descrito por Murashige e Skoog (1962), suplementado com 3% de sacarose e vitaminas, (2,5 g.L-1 de Phytigel®).

Os eixos embrionários foram excisados das sementes e inoculados individualmente em cada tubo de ensaio contendo 20 mL do meio de cultura e levado para a sala de incubação sob condições controladas de cultivo, com fotoperíodo de 16 horas/luz, intensidade luminosa de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura variando de 30° C (dia) a 20° C (noite).

O experimento foi conduzido durante 30 dias e foram analisadas as seguintes variáveis: a porcentagem de germinação dos embriões zigóticos (todos os embriões entumecidos); emissão de hipocótilo, raiz secundária, primária,

epicótilo, eofilos. A avaliação, dependendo da variável, foi realizada diariamente. Após a semeadura das sementes e inoculação dos embriões foram calculadas as porcentagens de germinação (G%), o índice de velocidade de germinação (IVG), conforme metodologia de BIRUEL et al., (2007), e o tempo médio de germinação (TMG) de acordo com LABOURIAU E VALADARES (1976). Os dados foram analisados e apresentados como média e desvio padrão.

Resultados e Discussão

Após dois dias de inoculação observou-se o intumescimento dos embriões tanto para sementes dos indivíduos selvagens quanto do clone, ambos os genótipos apresentaram cerca de 70% de germinação (Tabela 1). Resultado promissor, uma vez que as sementes de seringueira apresentam baixas porcentagens de germinação em ambiente convencional, em média de 58%, embora haja relatos que a germinação de seringueira pode variar de 50 a 80% devido as características recalcitrantes das sementes e o alto índice de infestação por microorganismos (GARCIA et al., 1994; PAULA et al., 1997). O cultivo de embriões zigóticos apresentaram porcentagens de germinação próximas ao ambiente convencional, o que torna uma vantagem para a propagação da espécie em larga escala, pois os embriões inoculados são todos viáveis, maduros e passam por um processo de assepsia, aumentando assim as taxas de desenvolvimento das plântulas.

Tabela 1. Médias de porcentagem, índice de velocidade e tempo médio de germinação, primórdios radiculares, alongamento raiz secundária e primária, emissão do epicótilo e dos eofilos de plântulas de *Hevea brasiliensis in vitro*.

| % | En | Pr | Rs | Rp | Ep | Eo |
|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <i>Selvagem</i> | 58,3 ± 16 | 50,0 ± 19 | 50,0 ± 19 | 50,0 ± 19 | 33,3 ± 16 | 33,3 ± 16 |
| <i>Clone</i> | 66,7 ± 21 | 25,0 ± 14 | 25,0 ± 14 | 25,0 ± 14 | 25,0 ± 14 | 25,0 ± 14 |
| IVG | En | Pr | Rs | Rp | Ep | Eo |
| <i>Selvagem</i> | 0,202 ± 0,10 | 0,143 ± 0,09 | 0,210 ± 0,13 | 0,210 ± 0,13 | 0,090 ± 0,06 | 0,090 ± 0,06 |
| <i>Clone</i> | 0,177 ± 0,17 | 0,121 ± 0,11 | 0,184 ± 0,04 | 0,184 ± 0,04 | 0,143 ± 0,05 | 0,143 ± 0,05 |
| TMG | En | Pr | Rs | Rp | Ep | Eo |
| <i>Selvagem</i> | 6.125 ± 1,93 | 7.750 ± 1,70 | 8.750 ± 2,39 | 8.750 ± 2,39 | 8.333 ± 0,50 | 8.333 ± 0,50 |
| <i>Clone</i> | 7.375 ± 2,68 | 9.875 ± 2,46 | 8.000 ± 1,40 | 8.000 ± 1,40 | 8.750 ± 0,50 | 8.750 ± 0,50 |

Médias ± Desvio Padrão

Legenda: **En**- entumescimento do embrião; **Pr**- primórdios radiculares; **Rs**- raiz secundária; **Rp**- raiz primária; **Ep**- epicótilo e **Eo**- eofilos.

Quanto às médias de porcentagem de emissão da parte radicular (primórdios radiculares, raiz primária e secundária), os embriões oriundos das sementes selvagens apresentaram maiores porcentagens (em comparação as de sementes de clone) e na parte aérea (epicótilo e eofilos), o que fica evidente a influencia dos genótipos no estabelecimento de plântulas *in vitro*. Em relação as contaminações dos embriões, observou-se ocorrência entre 3 e 6 dias após a inoculação (Figura 1), ao passo que a oxidação dos embriões ocorreu entre 5 e 8 dias.



Figura 1. Contaminação dos explantes em meio MS com diferentes reguladores de crescimento.

Resultados similares em cultivo *in vitro* com a espécie *H. brasiliensis* apresentaram pouca contaminação nos explantes, conforme encontrado no presente estudo, enquanto para a espécie *Jatropha curcas*, pertencente à mesma família da espécie em estudo, observou alta porcentagem de contaminação e formação de plântulas anormais (IGHERE et al., 2011; MOHAN et al., 2011). Assim, um passo de iniciação de cultura de tecido bem sucedida começa, frequentemente, com uma técnica de esterilização de explantes eficazes e, na micropropagação de *H. brasiliensis*, o estabelecimento de uma cultura axênica é um dos passos desafiadores.

Outro problema encontrado na micropropagação de *H. brasiliensis* é a ocorrência de oxidação dos embriões (MORADPOUR et al., 2016). Mas, acredita-se que estudos que viabilizem cultivos mais equilibrados podem aperfeiçoar bastante a propagação *in vitro*.

Conclusão

O protocolo de desinfestação foi eficaz, com baixa contaminação dos embriões *in vitro*, os mesmos apresentaram alta porcentagem de germinação e o desenvolvimento das plântulas *in vitro* apresentaram diferenças na performance dos genótipos.

Referências Bibliográficas

ANDRADE, R.A.; MARTINS, A.B.G. Propagação vegetativa de porta-enxertos para citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 25(1): 134-136, 2003.

BIRUEL, R.P.; AGUIAR, I.B.; PAULA, R.C. Germinação de sementes de pau-ferro submetidas a diferentes condições de armazenamento, escarificação química, temperatura e luz. **Revista Brasileira de Sementes**, 29 (3):151-159, 2007.

GARCIA A.; VIEIRA D. R. Germinação, armazenamento e tratamento fungicida de sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). **Revista Brasileira de Sementes**, 6(2): 128-133, 1994.

IGHERE, A.D.; OKERE, A.; ELIZABETH, J., OLAYODE, M.; OLATUNDE, F.; ABIODUN, S. In-vitro culture of *Hevea brasiliensis* (rubber tree) embryo. **Journal of Plant Breeding and Crop Science**, 3(9): 185-189, 2011.

KOTHARI, S.L.; JOSHI, A.; KACHHWAHA, S.; OCHOA-ALEJO, N. Chili peppers: a review on tissue culture and transgenesis. **Biotechnology Advances**, 28: 35-48, 2010.

LABOURIAU, L.G. A germinação de sementes. **Organização dos estados Americanos. Programa Regional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**. Série de Biologia, 171 pp, 1983.

MANZUR, J.P.; PENELLA, C.; RODRÍGUEZ-BURRUEZO, A. Effect of the genotype, developmental stage and medium composition on the in vitro culture efficiency of immature zygotic embryos from genus *Capsicum*. **Scientia Horticultura**, 161: 181-187, 2013.

MORADPOUR, M.; AZIZ, M. A.; ABDULLAH, S.N.A. Establishment of *in vitro* Culture of Rubber (*Hevea brasiliensis*) from Field-derived Explants: Effective Role of Silver Nanoparticles in Reducing Contamination and Browning. **Journal of Nanomedicine e Nanotechnology**, 7(3), 2016.

MOHAN, N.; NIKDAD, S.; SINGH, G. Studies on seed germination and embryo culture of *Jatropha curcas* L. under in vitro conditions. **Biotechnol. Bioinf. Bioenergy**, 1: 187-194, 2011.

MONNIER, M. Culture of zygotic embryos. p. 117-153. In: Thorpe, T.A., ed. *In vitro* embryogenesis in plants. **Kluwer Academic**, Dordrecht, The Netherlands, 1995.

PAULA, N.F.; BORGES, E.E.L.; BORGES, R.C.G.; PAULA, R.C. Alterações fisiológicas em sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, 19(2): 326-333, 1997.

RAZDAN, M.K. **Plant Tissue Culture**. 2ed. Science Publishers, Enfield, NH, USA, 2003.