

# ORGANOGENESE DE SEGMENTOS NODAIS DE *HEVEA* spp. CULTIVADOS *IN VITRO* EM MEIOS MODIFICADOS COM AGENTES GELIFICANTES

Ana Claudia Lopes da Silva<sup>1</sup>; Cândida Elisa Manfio<sup>2</sup>; João Ricardo Avelino Leão<sup>3</sup>; Josiane Celerino de Carvalho<sup>4</sup>; José Francisco de Carvalho de Gonçalves<sup>5</sup>; Andrea Raposo<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Eng. Flo., Doutoranda PPG Ciências de Floresta Tropicais INPA; <sup>2</sup> Eng. Agr., Pesquisadora EPAGRI; <sup>3</sup> Eng. Flo., Docente IFAC; <sup>4</sup> Doutoranda PPG Ciências de Floresta Tropicais INPA; <sup>5</sup> Coord. Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal- INPA; <sup>6</sup> Pesq. Lab. de Biotecnologia Vegetal, Embrapa Gado de Corte

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

**Resumo:** O crescimento de tecidos vegetais estabelecidos *in vitro* e as respostas morfogênicas dependem substancialmente do meio de cultura utilizado. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar possíveis efeitos de agentes gelificantes, bem como a indução de calogênese sobre a organogênese *in vitro*. Segmentos nodais foram utilizados como fonte de explante, inoculados em meio de cultura MS suplementado com diferentes concentrações dos reguladores de crescimento 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) combinado com ANA (ácido naftalenoacético). Os agentes gelificantes testados foram o ágar (6 g L<sup>-1</sup>) e o Phytigel (2 g L<sup>-1</sup>). Apesar de segmentos nodais de *Hevea* spp. cultivados *in vitro* apresentarem sobrevivência, não foi possível estabelecer a calogênese. Dos gelificantes testados o ágar foi o que apresentou maiores índices de oxidações.

**Palavra chaves:** calogênese; reguladores de crescimento, seringueira.

## Introdução

O crescimento de tecidos vegetais cultivados *in vitro* e as respostas morfogênicas dos mesmos dependem sobremaneira do meio de cultura utilizado (SZABADOS et al., 1993). Agentes gelificantes são fundamentais para oferecer estrutura aos meios nutritivos de cultivo *in vitro* semi sólidos, suas consistências devem ser firmes o suficiente para suportar as plantas, sem ser rígido demais para não interferir no crescimento e no desenvolvimento dos tecidos (MONTILLA-ESCUADERO et al., 2011). Apesar da maioria dos trabalhos conduzidos *in vitro* utilizarem o ágar como agente gelificante, o Phytigel também é uma alternativa. Quando comparado com o ágar, o Phytigel apresenta um grau de pureza maior, não contendo contaminantes, por ser isolado a partir de um único organismo (GEORGE, 1993; CID, 2001; CHEVREAU et al., 2017). A resposta das plantas aos agentes gelificantes podem variar de acordo com a espécie vegetal e as condições de cultivo (BURGOS; ABURQUERQUE, 2003). Informações referente a morfogênese *in vitro* de *Hevea* podem contribuir para propagação e obtenção de clones “elite”. O presente estudo propôs-se investigar possíveis efeitos de agentes gelificantes, bem como a indução de calogênese na organogênese *in vitro* de *Hevea* spp.

## Material e métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular da Embrapa Acre, Rio Branco. Segmentos nodais (clone FDR 5865) foram coletados no banco de germoplasma da EMBRAPA totalizando 144 amostras, as quais foram realizados pré-asepsia (lavagem em água corrente com detergente comercial neutro durante 5 minutos, seguidos de uma tríplice lavagem em água destilada e autoclavada). Posteriormente, os segmentos nodais foram encaminhados à câmara de fluxo laminar, onde foram imersos em solução de desinfestação composta pelo fungicida de Amistar® (0,34 g L<sup>-1</sup>) e cloreto de benzalcônio (0,5 g L<sup>-1</sup>) durante 20 minutos, então lavado em água destilada e autoclavada e imerso durante 1 minuto em solução de álcool etílico a 70% (v/v) seguido de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) com 3 gotas de detergente comercial neutro por 10 minutos, seguido de uma tríplice lavagem em água destilada e autoclavada. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaios (25 X 150 mm) contendo com 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado PPM® (Plant Preservative Mixture) (3 ml L<sup>-1</sup>), carvão ativado (1 g L<sup>-1</sup>) e diferentes concentrações dos reguladores de crescimento (0,1 mg L<sup>-1</sup>, 0,25 mg L<sup>-1</sup>, 0,5 mg L<sup>-1</sup>, 1 mg L<sup>-1</sup>, 2 mg L<sup>-1</sup>) 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e na sua ausência, combinado com 1 mg L<sup>-1</sup> de ANA (ácido naftalenoacético). Os agentes gelificantes utilizados foram ágar (6 g L<sup>-1</sup>) e Phytigel (2 g L<sup>-1</sup>). Após a inoculação, os segmentos foram mantidos em sala de crescimento na ausência de luz durante 30 dias, após este tempo foram transferidos para presença de luz por mais 30 dias. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial, onde o fator A foram as doses de 2,4-D e o fator B, o tipo de agente gelificante, constituído de 12 tratamentos e 12 repetições, com um explante por tubo de ensaio. As variáveis observadas foram: porcentagem de sobrevivência, oxidação, contaminações fúngicas e bacterianas e formação de calos. Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância e comparados pelo teste de Tukey (5%). O programa utilizado foi Sisvar (Sistema para Análise de Variância) versão 5.1 (FERREIRA, 2014).

## Resultados e Discussão

Durante o período de avaliação (90 dias), verificou-se baixa taxa de sobrevivência de explantes em todos os tratamentos (5,5%) apresentando efeito significativo entre os dois agentes gelificantes testados ( $p < 0,05$ ). A porcentagem de sobrevivência dos segmentos nodais aumentou quando os explantes foram submetidos a  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D no meio de cultura que tinha o ágar e  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D no meio de cultura que tinha Phytigel (Figura 1).

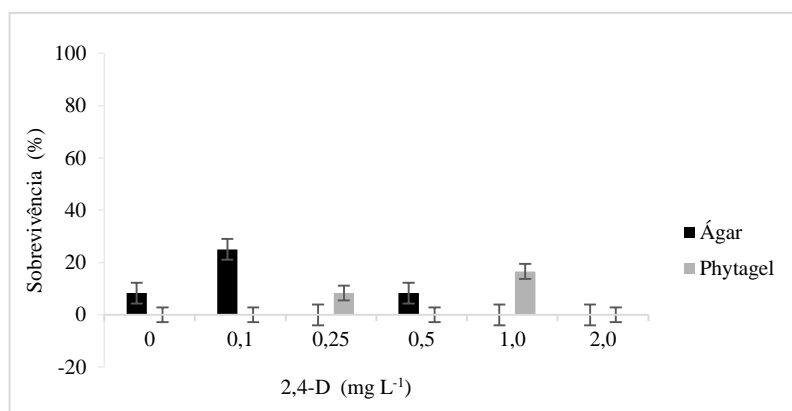


Figura 1. Porcentagem de sobrevivência em segmentos nodais de seringueira (*Hevea* spp.) em resposta aos agentes gelificantes e tratamentos para indução de calogênese.

Estudos sobre agentes de gelificação são importantes para o condicionamento dos explantes, estes dependem da espécie e das condições de cultivo. Em *Eucalyptus grandis* por exemplo, o meio de cultivo gelificado com Phytigel apresentou maior porcentagem de sobrevivência dos explantes, do que o meio com ágar (WILLIAMS; TAJI, 1987). Por outro lado, no estabelecimento *in vitro* do caquizeiro (*Diospyros kaki*, L.) onde se avaliou os agentes gelificantes ágar e Phytigel, recomendaram o ágar como o melhor agente gelificante para o meio de cultivo deste gênero por apresentar maior número de brotos regenerados (CARVALHO et al., 2004). No entanto, no cultivo *in vitro* de micropropágulos de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.), verificou-se que não houve diferença significativa entre os agentes gelificantes Phytigel e ágar para esta espécie (MINAMIGUCHI, 2013).

Durante o procedimento de cortes dos segmentos nodais de seringueira para posterior desinfestação, observou-se a exsudação de látex característico da espécie, estas injúrias causadas aos tecidos tiveram reflexos na oxidação fenólica (74,3%), possivelmente como resposta celular ao estresse causado, já que, ferimentos, podem estimular a atividade da fenilalanina amonialiase, à qual está relacionada à formação de compostos fenólicos (TAIZ; ZEIGER, 2013); mas, também, em função do tipo de explante inoculado, pois os segmentos eram semi-lenhosos, favorecendo a oxidação e reação mais ativamente com o hipoclorito de sódio. Como alternativa, optou-se pelo uso do composto antioxidante carvão ativado adicionado ao meio de cultura, o qual não foi eficiente. Levando em consideração os agentes gelificantes utilizados como tratamentos observou-se que o ágar apresentou maior incidência de oxidação fenólica de 91,6%, enquanto o Phytigel apresentou 86%, proporcionando efeito significativo estatisticamente na interação de ambos os fatores analisados ( $p < 0,05$ ) (Figura 2).

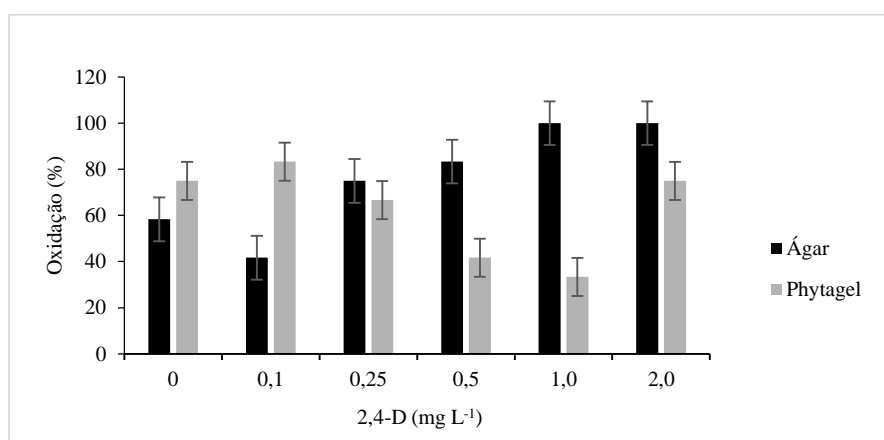


Figura 2. Porcentagem de oxidação em segmentos nodais de seringueira (*Hevea* spp.) após 90 dias de incubação em meio de cultura MS, em resposta aos agentes gelificantes e tratamentos para indução de calogênese.

A oxidação fenólica é um fator comum em cultivo de espécies lenhosas, sendo estes compostos, muitas vezes, produzidos em áreas injuriadas dos explantes (ANDRADE et al., 2000). De forma geral, as oxidações não inviabilizam o

desenvolvimento dos explantes, sobretudo quando ocorrem em manchas isoladas ou de forma branda (GOLLE, 2010), porém este fato não foi observado neste estudo. Apesar do uso do antioxidante carvão ativado e a cultura ter sido deixada na penumbra, observou-se que após 60 dias de estabelecimento deste cultivo, os explantes estavam oxidados e iniciando o processo de necrose (Figura 3), onde cerca de 52% de todos explantes necrosaram ao final dos 90 dias de observação.

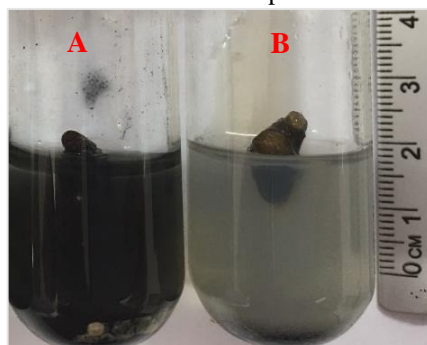


Figura 3. Segmentos nodais de seringueira (*Hevea* spp.) após 60 dias de incubação em meio de cultura MS, em processo de oxidação e necrose. A) Meio de cultura com Phytigel b) Meio de cultura com ágar.

Em um estudo com pau-brasil (*Caesalpinia echinata*), também realizado na penumbra, o carvão ativado foi o tratamento que melhor controlou a oxidação, mas não favoreceu a formação de calo, ou seja, nem a ausência de luz nem a utilização de antioxidantes evitaram a oxidação dos explantes (WERNER, 2009). Outros estudos apontam que as contaminações e a oxidações fenólicas são os principais agentes que afetam o sucesso do estabelecimento de cultivos *in vitro* em espécies florestais, considerando que níveis reduzidos de contaminação e de oxidação não inviabilizam a cultura de tecidos.

No presente estudo, as perdas por contaminação durante a fase de estabelecimento *in vitro* dos segmentos nodais de seringueira (*Hevea* spp.) nos tratamentos gelificados com ágar foram de 79% para contaminação bacteriana e 9,7 % para contaminação fúngica. Para os tratamentos gelificados com Phytigel se obteve 88,02 e 9,72 % para contaminações bacterianas e fúngicas respectivamente. Deste modo, análise realizada para contaminações apresentou efeito significativo apenas para contaminação bacteriana (Figura 4).

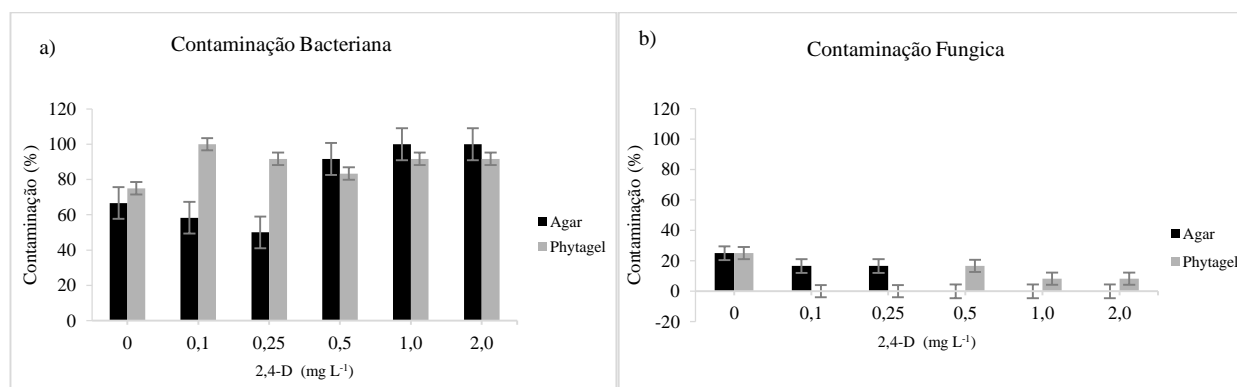


Figura 4. Porcentagem de contaminação bacteriana (a) e fúngica (b) em segmentos nodais de seringueira (*Hevea* spp.) em resposta aos tratamentos e agentes gelificantes ágar e Phytigel na indução de calogênese.

De acordo com George (1993), taxas elevadas de contaminação bacteriana são comumente encontradas em espécies lenhosas cultivadas *in vitro*, as quais são difíceis de se estabelecer quando provenientes de campo. Niede e Baushier (2002), ressaltam que a contaminação microbiana é a principal causa de perdas de plantas cultivadas *in vitro*. A maioria dos trabalhos de cultivo *in vitro*, tem utilizado material juvenil como fonte de explante, em virtude do baixo nível de contaminação e do elevado potencial morfogenético (BARCELÓ-MUÑOZ et al., 1999).

No presente trabalho observou-se que 8 explantes saudáveis foram obtidos ao final deste experimento, sendo 5 em meio gelificado com ágar e apenas 3 explantes no meio gelificado com Phytigel. Provavelmente os altos índices de oxidação (74,3%) e contaminação (94,44%) encontrados podem ter prejudicado a calogênese, já que não se obteve um índice satisfatório de explantes saudáveis.

## Conclusão

Apesar de segmentos nodais de *Hevea* spp. cultivados *in vitro* apresentarem sobrevivência, não foi possível estabelecer a calogênese. Dos agentes gelificantes testados o ágar apresentou maiores índices de oxidações em comparação ao Phytigel.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Acre pelo suporte estrutural e financeiro, para realização desta pesquisa.

## Referências Bibliográficas

- ANDRADE, M.W. et al. Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemao). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174 - 180, jan./mar. 2000.
- BARCELÓ-MUÑOZ, A. Micropropagation of adult avocado. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 58, p.11-7, 1999.
- BURGOS, L.; ALBURQUERQUE, N. Ethylene inhibitors and low kanamycin concentration improve adventitious regeneration from apricot leaves. **Plant Cell Reports**, Murcia, V.21, n.12, p. 1167–1174, 2003.
- CARVALHO, D. C.; BIASI, L. A.; TELLES, C. A. Organogênese do caquizeiro ‘Fuyu’ a partir de ápices meristemáticos. **Revista Brasileira Agrociência**, v.10, n. 3, p. 303-307, 2004.
- CID, L. P. B. **A propagação *in vitro* de plantas**. O que é isso? Biotecnologia Ciência & desenvolvimento, Brasília, n.19, p.16-21, 2001.
- CHEVREAU, E.; MOURGUES, F. ; NEVEU, M. ; CHEVALIER, M. Efeito de gelificantes e antibióticos na regeneração adventícia de gemas de folhas de pêra *in vitro*. **Células *in vitro* e biologia do desenvolvimento - Plantas**, v.33, p.173-179, 2017.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v.38, n.2, p. 109-112, 2014.
- GEORGE, E. F. Plant propagation by tissue culture. **Exegetics**, Edington. [S.l.] v.1, 555p. 1993.
- GOLLE D.P. **Estabelecimento, multiplicação, calogênese, organogênese *in vitro* e análise da diversidade genética em acessos de *Eugenia involucrata* DC**. Ph.D. thesis, Universidade Federal de Santa Maria, 2010.
- MINAMIGUCHI, J. Y. **Uso de diferentes gelificantes e de um esterilizante em cultura de segmentos nodais de batata-doce**. 2013. 77p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade do Oeste Paulista. Presidente Prudente –São Paulo, 2013.
- MONTILLA-ESCUADERO, E.A.; M.F. DULCE-RIVEDENEIRA, B. QUEVEDO-HIDALGO, M. MERCADO-REYES, R. ÁLVAREZ-LEÓN, J.N. MOLINA-VARGAS, Y A.A TRESPALACIOSRANGEL. “Efecto del tratamiento alcalino sobre la productividad y las propiedades físicas del ágar proveniente de *Gracilaria verrucosa*”. **Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras-INVERMAR**, 40(1): 75-88. 2011.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, [S.l.], v.15, p. 473-497, 1962.
- NIEDS, R. P.; BAUSHER, M. G. Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse and field grown trees. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, New York, v. 38, n. 5, p. 468-471, 2002.
- SZABADOS, L.; V.M. NÚÑEZ, L.M. TELLO, G. MAFLA, J. ROA, Y W.M. ROCA. “Los agentes gelinizantes en el cultivo de tejidos”. Roca, W. M., y Mroginski, L. A (Eds.), Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. **Centro Internacional de Agricultura Tropical**, Colombia, p. 79-93. 1993.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 5. Ed. Porto Alegre: Artmed. 918 p., 2013.
- WERNER, E.T.; PESSOTTI, K.V.; LOPES, F.P; ROGER, J.A.; CUZZUOL, G.R.F. Controle da calogênese do pau-brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, v.33, p. 987-996, 2009.
- WILLIAMS, R. R.; TAJI, A. M. Effects of temperature, darkness and gelling agent on long-term storage of *in vitro* shoot cultures of Australian woody plant species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 11, p. 151-156, 1987.
- XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 279 p., 2009.