

# CULTIVO *IN VITRO* DE SEGMENTOS NODAIS DE *Hevea brasiliensis* (WILLD. EX. ADR DE JUSS.) MUELL. ARG E *Hevea spruceana* (BENTH.) MULL. ARG

Josiane Celerino de Carvalho<sup>1</sup>; Rosineide da Paz Machado<sup>2</sup>; Ana Claudia Lopes da Silva<sup>1</sup>; Marcelo Benevides dos Santos Júnior<sup>3</sup>; José Francisco de Carvalho Gonçalves<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Doutoranda do Lab. Fisiologia e Bioquímica Vegetal INPA; <sup>2</sup>Eng. Agr. Técnica Lab. INPA; <sup>3</sup>Discente de Biotecnologia UFAM; <sup>4</sup>Coord. Lab. Fisiologia e Bioquímica Vegetal INPA

**Identificação do evento:** VII Congresso Brasileiro de Heveicultura - 10 a 12 de novembro de 2021, Piracicaba/SP.

**Resumo:** A seringueira é propagada, principalmente, via enxertia. Além da técnica de enxertia, a micropropagação tem se mostrado como uma alternativa promissora para produção em larga escala de clones elites e de mudas livres de patógenos. Aqui investigamos o estabelecimento das espécies *Hevea brasiliensis* e *Hevea spruceana* a partir de gemas axilares, avaliando o meio MS Pleno e o efeito da interação de Ácido-indol-acético-AIA e Benzilaminopurina-BAP. Gemas axilares foram excisadas das mudas e inoculadas em tubos de ensaio com 20 mL de meio Murashige e Skoog's (MS) na íntegra e suplementados com reguladores vegetais AIA (3 µM) e BAP (5 µM). O cultivo das gemas axilares nos diferentes tratamentos foi eficaz para a emergência dos brotos de *H. brasiliensis* e *H. spruceana*. Foi possível observar diferentes comportamentos e estratégias em relação à emergência e desenvolvimento dos brotos. A *H. spruceana* teve um desempenho melhor do que *H. brasiliensis*. Nossos resultados, portanto, demonstram que o manuseio adequado dos componentes do meio de cultura, dos reguladores vegetais e do tipo de genótipo pode influenciar diretamente no estabelecimento de explantes *in vitro*.

**Palavra chaves:** genótipos, reguladores vegetais, seringueira e micropropagação

## Introdução

A seringueira (*Hevea brasiliensis*) é uma espécie originária da região amazônica e pertencente à família Euphorbiaceae, que possui acima de 7000 espécies e aproximadamente 300 gênero. Dentre estas se destaca o gênero *Hevea*, que apresenta a principal espécie produtora de látex, a *H. brasiliensis*. Esta espécie sempre chamou a atenção por apresentar elevada produtividade e qualidade de borracha natural. Por outro lado, existem espécies do mesmo gênero que exibem características opostas em termos de produção, mas são bastante rústicas a exemplo da *Hevea spruceana*, que apresenta baixa produtividade de látex e maior tolerância contra patógenos (SECCO et al., 2012). Considerando esta diversidade genética, verifica-se a oportunidades de prospectar características úteis nas plantas selvagens que possam ser absorvidas em diferentes abordagens dos programas de melhoramento genético.

As espécies da seringueira são propagadas via enxertia que ainda é necessário o uso de sementes para produção de porta-enxertos, onde este processo pode levar cerca de 1 ano para se obter as mudas (MENDANHA et al., 1998). Além da técnica de enxertia, a micropropagação tem se mostrado uma alternativa promissora para produção em larga escala de clones elites e material isento de patógenos, podendo, estes materiais serem utilizados como diferentes fontes de explantes para o desenvolvimento de uma nova planta em um meio nutritivo e em condições assépticas, portanto, o ambiente *in vitro*, possibilita o controle total sobre o explante (NONOGAKI e NONOGAKI, 2017). A cultura de tecidos vegetais é uma técnica com o potencial não só para clonagem e propagação em massa das espécies vegetais, que são necessárias em grande número nos programas de reflorestamento, mas também para a conservação de espécies importantes e que possam estar ameaçadas pela intensa exploração. Além disso, a técnica pode também auxiliar na identificação de marcadores bioquímicos como expressão de proteínas ou enzimas e na produção de novos indivíduos isentos de alguns microorganismos (PAWŁOWSKI e STASZAK 2016; CARVALHO et al., 2021).

O fato é que devido ao aumento da demanda por produtos oriundos da 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 segmentos nodais apresenta uma alternativa viável para não só em larga escala, mas também para a produção e seleção de genótipos elites. Diante disso, investigamos o estabelecimento das espécies *Hevea brasiliensis* e *Hevea spruceana* a partir de gemas axilares, avaliando o meio MS Pleno e o efeito da interação de Ácido-indol-acético-AIA e Benzilaminopurina-BAP.

## Material e métodos

As sementes de *Hevea brasiliensis* e *Hevea spruceana* foram coletadas no Parque Zoológico e Embrapa, respectivamente, ambas as áreas de coleta estão situadas em Rio Branco - Acre, em seguida, as sementes acondicionadas em sacos foram conduzidas ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (LFBV), INPA/Campus III em Manaus-AM. Inicialmente, as sementes foram submetidas a uma pré-asepsia com hipoclorito de sódio 2% durante dois minutos, depois lavadas em água corrente e acondicionadas em bandejas de plástico contendo areia como substrato e colocadas para germinar em casa de vegetação para obtenção das plântulas.

A partir das plântulas propagadas em casa de vegetação, após 60 dias, foi coletada a parte aérea das plantas, onde os segmentos nodais de aproximadamente 2 cm foram seccionados. Posteriormente, foram submetidos ao processo de

asepsia externo, em que o material foi imerso em álcool 70 % durante 2 minutos, em hipoclorito de sódio a 1 % e gotas de detergente neutro durante 5 minutos, seguidos de tríplice lavagem em água destilada e autoclavada.

Logo após, foi iniciado a inoculação dos explantes em meio MS pleno Murashige e Skoog, (1962) em 2 tratamentos: Tratamento 1, com meio MS pleno; Tratamento 2, meio MS suplementado com AIA (3  $\mu$ M) e BAP (5  $\mu$ M). Onde cada tratamento contou com 24 unidades amostrais divididos para as duas espécies: 12 de *Hevea brasiliensis* e 12 de *Hevea spruceana*.

Os ensaios foram conduzidos em sala de crescimento, fotoperíodo de 16 horas luz e temperatura de 28°C, durante 60 dias. Nesse período foram avaliadas seguintes variáveis: as quantidades, tamanho; percentagem de emergência dos brotos (E%); Índice de velocidade de emergência (IVE) e Tempo médio de emergência (IVE). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 2 tratamentos (2 composições dos meios versus 2 espécies) e 4 repetições com 3 unidades amostrais. A normalidade dos dados foi aferida pelo teste de Shapiro-Wilk e após atender as premissas de normalidade, os dados foram submetidos a análise de variância e teste de médias.

## Resultados e discussões

No que diz respeito à interação entre as espécies e os tratamentos, a *H. brasiliensis* não respondeu positivamente ao tratamento 1 e 2, resultando na ausência de emergência de brotos (Figura 1A, B), em contrapartida, a *H. spruceana* apresentou mais de 85% de emergência de brotos, sendo os maiores valores de porcentagem no tratamento sem a adição de reguladores de crescimento (Figura 1C e D, Tabela 1). Essas respostas distintas das espécies, podem estar associadas ao tipo de genótipo, uma vez que a espécie *H. spruceana* apresentou melhor desempenho nas brotações. Estudo de variação genética em progênies de *Hevea* têm sido objeto de pesquisa, pois possibilitam estabelecer suporte para planejamento para programas de melhoramento genético (GONÇALVES, 1982). Além disso, genótipos de plantas, os caracteres bioquímicos, fisiológicos e morfológicos, tipos de explantes e condições da cultura de tecidos são parâmetros importantes para a propagação de espécies (GONÇALVES e ROMANO, 2013).

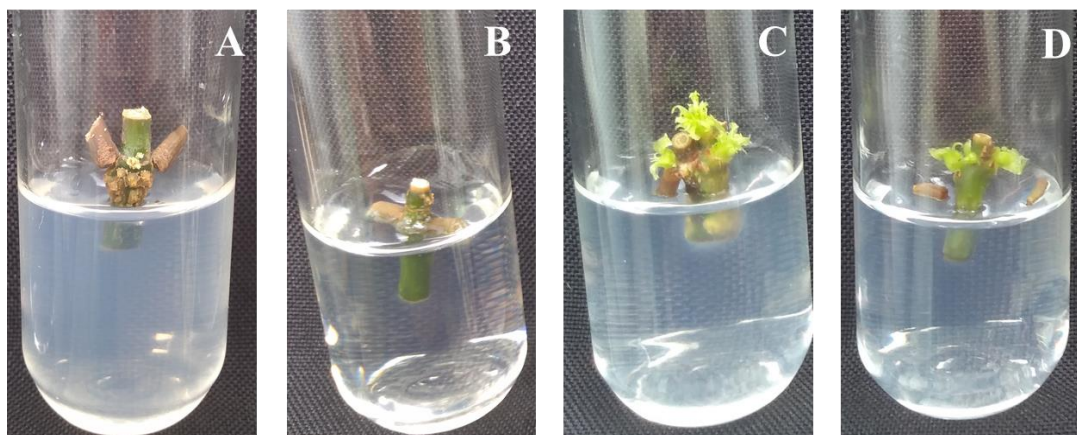


Figura 1. Segmentos nodais de diferentes genótipos de *Hevea* spp. (A) e (B) *Hevea brasiliensis*. (C) e (D) *Hevea spruceana*.

Quanto a quantidades de brotos, observou-se que a espécie *H. spruceana* apresentou médias de brotações de 1,76 em meio MS pleno e 3,15 com a adição de ANA x BAP (Tabela 1), ao passo que não observou-se brotações para *H. brasiliensis*. O que nos permite inferir que as ações dos reguladores de crescimento e/ou as interações dos mesmos nas diferentes espécies apresentaram comportamento distintos. Quanto a emissão de brotações, a *H. spruceana* apresentou maiores porcentagens, promovendo um grande potencial para a produção em larga escala em comparação com *H. brasiliensis*.

Tabela 1. Efeito de diferentes concentrações de auxinas e citocininas no crescimento de brotos de segmentos nodais de plântulas de *Hevea brasiliensis* e *Hevea spruceana* aos 60 dias.

Espécies	Reguladores de crescimento (mg/L)	Quant. de brotos (unid.)	Tamanho dos brotos (cm)
<i>H. brasiliensis</i>	MS pleno	0	0
	AIA 0.5 x BAP 1.0	0	0
<i>H. spruceana</i>	MS pleno	1,76 ± 0,21	0,3 ± 0,04

AIA 0.5 x BAP 1.0	3,15 ± 0,45	0,6 ± 0,08
MS- Murashige & Skoog; BAP- Benzilaminopurina; AIA- Ácido indol acético.		

## Conclusão

Os resultados obtidos indicam que os segmentos nodais das espécies *Hevea brasiliensis* e *Hevea spruceana* exibem respostas distintas quanto a formação de brotações *in vitro*. Para os tratamentos estudados, a espécie *H. spruceana* foi mais responsiva para estabelecimento do cultivo *in vitro*. Em geral, *H. spruceana* respondeu bem às interações dos reguladores, com resultados eficazes para a produção de maiores quantidades de brotações, o que pode otimizar a produção de mudas para enxertia da espécie. No entanto, ainda é necessário um tempo maior de avaliação das brotações.

## Agradecimentos

FAPEAM, INPA, aos membros do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (LFBV).

## Referências Bibliográficas

- CARVALHO, J.C.; NASCIMENTO, G.O.; SILVA, A.C.L.; FERREIRA, M.G.R.; ARAÚJO, W.L.; GONÇALVES, J.F.C. 2021. Differential *in vitro* germination and protein profile of seedlings of wild and cultivated *Hevea brasiliensis*. Anais da Academia Brasileira de Ciências.
- GONÇALVES, P.S.; GORGULHO, E.P.; MARTINS, A.L.M.; BORTOLETTO, N.; CARDOSO, M.; BERMOND, G. 1992. Variação genética de componentes do crescimento em progênies jovens de uma população de clones de seringueira.
- GONÇALVES, S., ROMANO, A., 2013. *In vitro* culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the 17 production of secondary metabolites. Biotechnocol. Adv, 31: 166-174.
- MENDANHA, A.B.L.; TORRES, R.D.A.de.; FREIRE, A.de.B. 1998. Micropropagação de seringueiras (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). Genet. Mol. Biol, 3: 21.
- NONOGAKI, H. 2017. Atualizações da biologia de sementes - Destaques e novas descobertas na pesquisa de dormência e germinação de sementes. Planta frente Sci, 8: 1-16.
- PAWŁOWSKI, T.A.; STASZAK, A.M. 2016. Analysis of the embryo proteome of sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) seeds reveals a distinct class of proteins regulating dormancy release. Journal of Plant Physiology, 195: 9–22.
- SECCO, R.S. 2012. A Botânica da Seringueira *Hevea brasiliensis* (Wild. Ex Adr. De Juss) Muell-Arg. p, 01-24. In: Alvarenga, A.P.; Carmo, C.A.F.S. (Ed.). Seringueira Viçosa.