

INDUÇÃO DE CALOS A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE SERINGUEIRA (*Hevea spp.*) CULTIVADOS *IN VITRO*

Ana Claudia Lopes da Silva¹; Cândida Elisa Manfio²; Josiane Celerino de Carvalho³; José Francisco de Carvalho de Gonçalves⁴; Andrea Raposo⁵

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

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

Resumo: O sucesso do cultivo *in vitro* está diretamente relacionado com a manipulação isolada ou combinada de reguladores vegetais como auxinas e citocininas. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar possíveis efeitos do regulador de crescimento 2,4-D combinado com ANA na indução de calogênese em embriões zigóticos de *Hevea spp* cultivados *in vitro*. Os embriões zigóticos utilizados como fonte de explante, foram 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). Embriões zigóticos são explantes promissores para a indução de calos em *Hevea spp.*, mesmo em baixa frequência de resposta no presente estudo.

Palavra chaves: calogênese; reguladores de crescimento, seringueira.

Introdução

A cultura de tecidos vegetais tem sido relativamente bem sucedida na propagação de espécies lenhosas (GOMES et al., 2010). O sucesso do cultivo *in vitro* está diretamente relacionado com a manipulação isolada ou combinada de reguladores vegetais como auxinas e citocininas (WANG et al., 2016). Segundo Tarrahi e Rezanejad (2013), esses reguladores, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é uma importante auxina sintética normalmente usada no meio de cultura como agente de indução de calos. Para o desenvolvimento de protocolos de micropropagação de uma dada espécie, é necessário primeiro estabelecê-la *in vitro*. No entanto, as exigências requeridas em condições *in vitro* variam muito entre as espécies (MIRANDA et al., 2019). No que diz respeito a organogênese *in vitro* em espécies de seringueira, ainda não existe um protocolo eficiente para a propagação de clones “elite” em larga escala. Neste contexto, o presente estudo propôs-se investigar possíveis efeitos de diferentes concentrações do regulador de crescimento 2,4-D combinado com ANA na indução de calogênese em embriões zigóticos de *Hevea spp* cultivados *in vitro*.

Material e métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular da Embrapa Acre, Rio Branco. Sementes em estágio final de maturação foram coletadas de árvores matrizes do clone FX 2261 no Campo Experimental da Embrapa. As sementes coletadas (54 amostras) foram conduzidas ao laboratório, as quais foram realizadas pré-asepsia (lavagem em água corrente com detergente comercial neutro durante 5 minutos, seguidos de tríplice lavagem em água destilada e autoclavada). Posteriormente, seus tegumentos foram extraídos e as amêndoas foram lavadas em água destilada e autoclavada e encaminhados à câmara de fluxo laminar, onde os embriões zigóticos foram excisados das sementes e imersos durante 15 segundos em solução de álcool 70% (v/v), então lavado em água destilada e autoclavada e imerso em solução de hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) durante 10 minutos, seguido de tríplice lavagem em água destilada e autoclavada. Os explantes foram inoculados em frascos de vidro (6,8 X 10 cm) contendo com 30 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e com diferentes concentrações do regulador de crescimento 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (0,0; 0,25; 0,5 mg L⁻¹) combinado com 1 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético). O pH foi ajustado em 5,8 antes da adição do agente gelificante ágar (6 g L⁻¹) e autoclavado a 120°C e 1 atm, durante 20 minutos. Após a inoculação, 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. As avaliações foram realizadas a cada 15 dias após o estabelecimento de cultivo durante 90 dias. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, constituído de 3 tratamentos e 6 repetições, com três explantes por parcela (frasco) totalizando 54 unidades amostrais. As variáveis observadas foram: porcentagem de sobrevivência, contaminações fúngicas e bacterianas, formação de calos, coloração e consistência dos calos (friável ou compacto). 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

Após 15 dias de incubação na ausência de luz, observou-se o início o processo de desdiferenciação e indução de calos com o intumescimento dos embriões e a formação de 12% de calos em meio nutritivo. Durante o período de avaliação (90 dias), não foram observadas oxidações e nem contaminações, sendo estas um dos principais obstáculos ao cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. Em consequência disto, a média de sobrevivência dos embriões cultivados *in vitro* foi de 70%. Passados os 90 dias, todos os tratamentos empregados promoveram a formação em média de 34,5% de calogênese nos explantes, não sendo observadas diferenças estatísticas entre eles conforme pode ser observado na Figura 1.

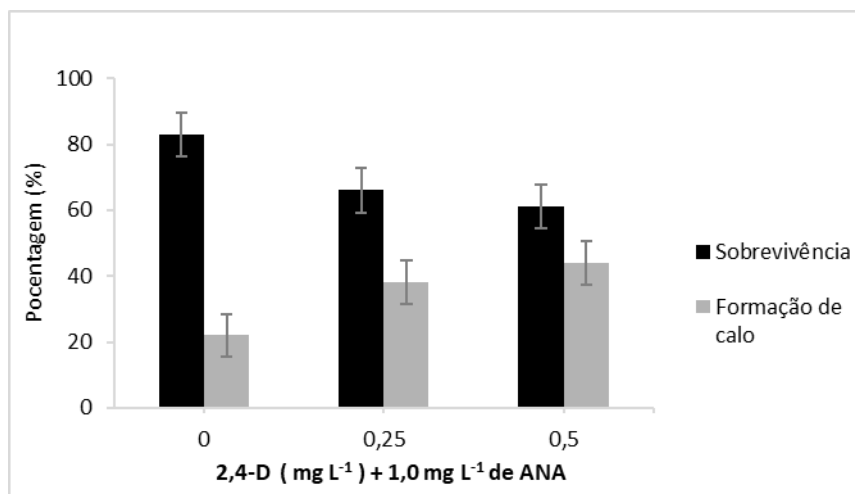


Figura 1. Porcentagem sobrevivência e formação de calos em embriões zigóticos de seringueira (*Hevea* spp.) em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.

Apesar de não ser observado diferença significativa entre os tratamentos empregados ($p > 0,05$), pode se dizer que no tratamento contendo $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D combinado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA possibilitou melhores resultados na indução de calos nos explantes (44%) conforme pode ser observado na figura 1. Passados o período de avaliação (90 dias), os calos primários de coloração marrom claro e que apresentaram consistência compacta e características não embriogênicas (Figura 2).



Figura 2. Embrião zigótico de seringueira (*Hevea* spp.) após 90 dias de incubação em meio de cultura MS suplementado com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético) combinado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA (Ácido Naftalenoacético), com a presença de calo compacto de cor marrom claro.

Embriões zigóticos são excelentes explantes excelentes para propagação *in vitro*, devido à sua natureza juvenil e alto potencial de regeneração, seu uso ajuda a superar as barreiras genéticas à germinação, produzir plantas assépticas e esclarecer os aspectos inerentes à nutrição (REKA et al., 2014). Além da elevada capacidade de expressar sua totipotência pela constituição meristemática, é possível obter embriões em larga escala, sua colheita pode ser facilitada e ainda reduzir a ocorrência de contaminações microbianas (TEIXEIRA et al., 1993). Diante deste contexto, a maioria dos programas de embriogênese somática tem utilizado embriões zigóticos como fonte de explante em diferentes espécies: *Bactris gasipaes* Kunth (STEINMACHER et al., 2007), *Coffea arábica* L. (LACERDA et al., 2015), *Elaeis guineensis* Jacq. (GOMES et al., 2016), *Zea mays* (SALGADO et al., 2017). Um protocolo de

micropropagação eficaz foi desenvolvido via embriogênese somática por meio de explantes de seguimentos radiculares oriundo de plântulas germinadas *in vitro* (ZHOU et al., 2010).

Um único explante pode gerar calos friáveis ou compactos. Quando se busca a embriogênese somática, são indicados calos friáveis por apresentarem tecidos formado por células sobrepostas que, ao toque, se desagregam em células ou grupos de células. Uma vez que, os calos compactos são compostos por células compactadas entre si, formando um tecido resistente ao corte ou fragmentação (GODOY-HERNANDEZ; VAZQUEZ-FLOTA, 2006; FLORES, 2006; GEORGE et al., 2008). A formação de calos primários depende da espécie estudada. Pereira et al. (2004), verificaram que a formação dos calos em *Uncaria tomentosa* ocorreu ao final de 45 dias de cultivo. Para *Acrocomia aculeata*, esta formação calogênica foi verificada somente aos 90 dias de cultivo (LUIS; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2014). Enquanto que, para a espécie estudada no presente trabalho, a formação de calos foi constatada após 15 dias de cultivo.

A indução de calo é dependente de um balanço hormonal intermediário de auxinas e citocininas (PREECE, 2008). No presente trabalho foi observado que em todos os tratamentos os calos apresentaram textura compacta e coloração marrom claro, o que pode ser um indicativo de alta atividade auxínica (TERMIGNONI, 2005).

Conclusão

Embriões zigóticos são explantes promissores para a indução de calos em *Hevea* spp.. Esse trabalho servirá como suporte para outros trabalhos com micropropagação de seringueira, bem como utilizando outras combinações ou outros tipos de fitorreguladores, afim de induzir calos friáveis e embriogênicos nesta espécie.

Agradecimentos

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

Referências Bibliográficas

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v.38, n.2, p. 109-112, 2014.

FLORES, R. **Cultura de tecidos e produção de B-ecdisona em Pfaffiaglomerata e Pfaffia tuberosa (Amaranthaceae)** (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 168p. 2006.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G.J. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd. edition. v.1. Dordrecht, Netherlands. Springer. 501p. 2008.

GODOY-HERNANDEZ, G.; VAZQUEZ-FLOTA, F.A. Growth measurements: estimation of cell division and cell expansion. In: G. Godoy-Hernandez & F.A. Vazquez-Flota (eds). **Plant Cell Cultures Protocols**. 2 ed. Humana Press Inc. New Jersey, Totowa, 416 p, 2006.

GOMES, H. T.; BARTOS, P. M. C.; BALZON, T. A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Regeneration of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis*) using temporary immersion bioreactors. **Industrial Crops and Products**, [S.l.] v.89, p.244-249, 2016.

LACERDA, G. A.; SILVA, B. D. O.; CHALFUN-JUNIOR, A.; PAIVA, L. V. Características histo-anatômicas dos calos a partir de embriões zigóticos imaturos de *Coffea arabica* L. cv. Rubi. **IX Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, Curitiba – PR, 2015.

LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. An improved protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 118: 485-496. 2014.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, [S.l.], v.15, p. 473-497, 1962.

PEREIRA, R. de C. A. **Micropropagação, indução de calos, características anatômicas e monitoramento dos biomarcadores de Uncaria tomentosa Willdenow Ex Roemer & Schultes DC e Uncaria guianensis (AUBLET) Gmelin (Unha de Gato)**. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 186 p. 2004.

PREECE, J. Plant physiological factors affecting growth and morphogenesis. Pg. 403-422. In: George, E.F.; Hall, M.A.; & De Klerk, G. (orgs.). **Plant Propagation by Tissue Culture**. Dordrecht, Springer, 3rd Edition. 2008.

REKHA, K.; NAZEEM, P.A.; VENKATACHALAM, P.; JAYASHREE, P., S.; SOBH, S.; KUMARI, S.S. Development of osmotin transgenics in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. Using explants of zygotic origin. **Journal of Tropical Agriculture**, n. 52, v. 1, p. 7-20, 2014.

SALGADO, F. F.; SOUZA, E. T. S.; CARNEIRO, A. A. Embriogenese somática e regeneração em cultura de tecidos de linhagens de milho tropical. **Revista Brasileira de Ciências da Vida**. [S.l.], v. 5, n. 1, 2017.

STEINMACHER, D. A.; KROHN, N. G.; DANTAS, A. C. M.; STEFENON, V. M.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: Induction, morphohistological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. **Annals of Botany** 49: 1–11; 2007

TEIXEIRA, J.B. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas**. Brasília: Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, 2005.

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de Tecidos Vegetais**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2005

ZHOU, Q.; JIANG, Z.; HUANG, T.; LI, W.; SUN, A.; DAI, X.; LI, X.Z. Plant regeneration via somatic embryogenesis from root explants of *Hevea brasiliensis*. **African Journal of Biotechnology**. [S.l.], v. 9, n. 48, p. 8168-8173, 2010.