



UTILIZAÇÃO DO ÁCIDO GIBERÉLICO (AG₃) NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE SERINGUEIRA (*HEVEA SPP.*)

Resumo: A formação de mudas de seringueira ocorre pela enxertia, processo que visa conectar duas partes diferentes em uma única planta. A utilização de sementes que apresentem características similares se torna muito importante para a produção de porta-enxerto homogêneos e vigorosos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do ácido giberélico (AG₃) no desenvolvimento de embriões zigóticos imaturos de seringueira (*Hevea spp.*). Sementes oriundas de frutos imaturos tiveram seus tegumentos retirados, em seguida as amêndoas foram lavadas em água destilada e então ocorreu a retirada dos embriões zigóticos imaturos, estes foram desinfestados em câmara de fluxo laminar mediante a imersão dos mesmos em álcool 70% por 15 segundos e solução de hipoclorito de sódio 1% por 10 minutos, sendo em seguida lavados por três vezes em água destilada e autoclavada e inoculados em meio de cultura WPM contendo várias concentrações de AG₃ (T1 - 0; T2 - 0,5; T3 - 0,75; T4 - 1; T5 - 1,5; T6 - 2; T7 - 2,5 e T8 - 3 mg.L⁻¹). A utilização do AG₃ no meio de cultura promoveu maior desenvolvimento de embriões imaturos desta espécie.

Palavras-chave: ácido giberélico, cultivo *in vitro*, embriões zigóticos imaturos, *Hevea spp*

Introdução

A formação de mudas de seringueira ocorre pela enxertia, processo que visa conectar duas partes diferentes em uma única planta. Segundo Ng (1993) e Cardinal et al. (2007) em mudas enxertadas de seringueira, pode ocorrer interação entre o enxerto e o porta-enxerto, principalmente para características de crescimento e produção de látex. Os efeitos do plantio de mudas com porta-enxertos de baixa qualidade só serão notados quando as plantas estiverem no período reprodutivo. Para tentar minimizar esta variabilidade torna-se necessário a utilização de porta-enxertos geneticamente compatíveis com os clones utilizados para enxerto. Portanto, a utilização de sementes que apresentem características similares é importante para a produção de porta-enxerto homogêneos e vigorosos. Neste sentido, a utilização da micropropagação utilizando como fonte de explantes embriões zigóticos, irá permitir a propagação clonal de material homogêneo. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito das diferentes concentrações do ácido giberélico no desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos imaturos de seringueira (*Hevea spp.*).



Material e Métodos

Após coletadas, as sementes oriundas de frutos imaturos foram lavadas com detergente e água corrente, posteriormente seus tegumentos foram retirados, em seguida as amêndoas foram lavadas em água destilada, após esta etapa ocorreu a retirada dos embriões zigóticos. A desinfestação dos embriões foi realizada em câmara de fluxo laminar mediante a imersão dos mesmos em álcool 70% por 15 segundos e solução de hipoclorito de sódio 1% por 10 minutos, sendo em seguida lavados por três vezes em água destilada e autoclavada por 10 minutos para reidratação dos mesmos.

Em seguida os embriões foram inoculados em tubos de ensaio preenchidos com meio de cultura WPM (Wood Plant Medium) suplementado com inositol (100 mg.L^{-1}), sacarose (30 g.L^{-1}) e solidificado com 7 g.L^{-1} de ágar. Foram utilizadas várias concentrações do ácido giberélico (AG_3) (T1 - 0; T2 - 0,5; T3 - 0,75; T4 - 1; T5 - 1,5; T6 - 2; T7 - 2,5 e T8- 3 mg.L^{-1}). As culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ em condições de escuro por 15 dias, após este tempo, levadas a condições luminosas de $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz por até o completo desenvolvimento. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento. A após 110 dias de cultivo *in vitro* ocorreu troca de meio de cultura com as mesmas concentrações e 20 dias após esta transferência foram avaliados visualmente: porcentagem de intumescimento, aparecimento de folhas, raízes e plântulas anormais.

Resultados e Discussão

O cultivo dos embriões *in vitro* é utilizado no melhoramento vegetal para se produzir plantas de cruzamentos incompatíveis ou para aumentar a população de plântulas em espécies com problemas na germinação. No presente estudo verificou-se que os embriões iniciaram o seu desenvolvimento inicialmente pelo seu intumescimento e a passagem do estado heterotrófico para o autotrófico, onde estes apresentaram coloração amarela clara e esverdeada, respectivamente. A mudança de coloração ocorreu após a troca de meio de cultura, ou seja, depois de 110 dias de cultivo, após este tempo verificou-se o aparecimento dos primórdios foliares e a hiperhidricidade em alguns embriões.

Verifica-se na Tabela 1 que o maior percentual de embriões que não se desenvolveram ocorreu na ausência do AG_3 e em baixas concentrações deste, maiores percentuais de embriões contendo primórdios foliares foram observados na presença deste ácido. Segundo Hu e Ferreira (1998) quanto mais jovens forem os embriões, mais difícil será seu cultivo *in vitro*, devido ao seu pequeno tamanho, a danos que podem ocorrer durante sua retirada e suas exigências nutricionais serem mais complexas.



Apesar de serem observados embriões sem desenvolvimento em quase todos os tratamentos que utilizaram o AG₃ (Tabela 1), estes permaneceram vivos e sem sinais de contaminação. A utilização de embriões imaturos requer o uso de reguladores de crescimento para estimular o desenvolvimento destes, dentre os reguladores utilizados, destacam-se as giberelinas. Além disso, os carboidratos possuem importante papel na manutenção do balanço osmótico adequado para a promoção do crescimento do embrião.

No presente estudo verificou-se grande dificuldade em se trabalhar com embriões imaturos, fato observado pela demora na resposta morfogênica dos embriões, além do tamanho reduzido. Ulisses et al. (2010) em trabalhos com *Heliconia*, verificaram que embriões derivados de frutos maduros apresentavam maior estágio de diferenciação do que os derivados de frutos imaturos, e que no cultivo *in vitro* os embriões imaturos iniciaram seu desenvolvimento após 60 dias de inoculação em meio de cultura contendo ácido giberélico, enquanto os embriões maduros precisaram somente de 15 dias.

Ighere et al. (2011) verificaram que embriões maduros de seringueira após 42 dias em meio de cultura MS suplementado com 0,075 mg.L⁻¹ de BAP e 0,01 mg.L⁻¹ de ANA e sem acréscimo de giberelinas, apresentaram plântulas com sistemas radicular e aéreo desenvolvidos. Fato que reforça que a adição do AG₃ é necessária quanto mais jovens forem os embriões.

No caso de espécies arbóreas como a seringueira, a importância deste tipo de cultivo consiste no fato de que após ocorrer o desenvolvimento do embrião, este poderá ser clonado, aumentando assim o número de plântulas de um mesmo genótipo, o que permite a obtenção de porta-enxertos homogêneos para a enxertia desta espécie.

Tabela 1 – Porcentagem de embriões que não se desenvolveram, embriões no início de desenvolvimento, embriões com primórdios foliares, e embriões hiperhídricos.

Conc. AG ₃ (mg.L ⁻¹)	% de embriões que não desenvolveram	% de embriões no início do desenvolvimento	% de embriões com primórdios foliares	% de embriões hiperhídricos
0,00	42,86	28,57	28,57	0
0,50	42,86	0	57,14	0
0,75	22,22	11,11	66,66	0
1,00	28,57	28,57	28,57	14,28
1,50	0	60	40	0
2,00	0	14,28	57,14	28,57



2,50	14,28	14,28	57,14	14,28
3,00	22,22	0	77,78	0

Conclusão

Com este trabalho pode-se concluir que a utilização do AG₃ no meio de cultura promoveu maior desenvolvimento de embriões imaturos de seringueira (*Hevea spp.*).

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Fundo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do estado do Acre (Processo TO 010/2010) e à Embrapa Acre pelo apoio financeiro. Ao CNPq e CAPES pelas bolsas de PIBIC e mestrado.

Referências Bibliográficas

- CARDINAL, A.B.B.; GONÇALVES, P.S.; MARTINS, A.L.M. Influência de seis porta-enxertos sobre a produção de clones superiores de seringueira. **Bragantia**, v. 1, n. 2, p. 277-284, 2007.
- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPH/CBAB, 1998. v.2, p.371-393.
- IGHERE, D.A.; ANTHONY, O.; JAMMADINE, E.; OLAYODE, M.; FAJIMI, O.; SUNDAY, A. In vitro culture of *Hevea brasiliensis* (rubber tree) embryo. **Journal of Plant Breeding and Crop Science**, v. 3, n. 9, p. 185-189, 2011.
- NG, A.P. Performance of rootstocks. **Planters' Bulletin**, v.1, n.175, p.81-87, 1983.
- ULISSES, Cláudia et al. *In Vitro* Propagation of *Heliconia bihai* (L.) L. from Zygotic Embryos. **Acta Bot. Bras.** vol.24, n.1, p. 184-192, 2010.