

DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO CULTURAS ASSÉPTICAS DE SERINGUEIRA (*Hevea spp.*)

Andréa Raposo¹; Paulo Cesar Poeta Fermino Junior²; Alana Fernandes Chocorosqui³, Renata Beltrão Teixeira⁴

¹Pesquisadora da Embrapa Acre, email: andrea@cpafac.embrapa.br

²Professor, Universidade Federal do Acre, email: paulofermino@ufac.br

³Estudante do curso de Engenharia Florestal da UFAC, email: alanacfernandes@yahoo.com.br;

⁴Analista da Embrapa Acre, email: beltrao@cpafac.embrapa.br

Resumo

A seringueira, fonte natural da borracha, apresenta sementes recalcitrantes, que perdem o poder germinativo rapidamente. Sendo a propagação vegetativa o método mais recomendado de obtenção de mudas em grande quantidade, além de manter a integridade genotípica dos clones estabelecidos. Dentro deste contexto, o desenvolvimento de técnicas que permitam a propagação em massa de clones desta espécie torna-se indispensável para a viabilidade da cultura. O presente trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo para obtenção de culturas assépticas de seringueira (*Hevea spp.*) a partir de plantas provenientes do campo, visando seu cultivo *in vitro*. Foram coletadas gemas axilares dos clones CNSAM-7905, PX e FDR-5788 (Jardim Clonal – Embrapa/Acre). As secções caulinares foram desinfestadas com NaOCl(2,5%) e HgCl₂(0,05%), durante 5, 10, 15 e 20 minutos. Os explantes foram inoculados em meio de cultura WPM e mantidos em sala de crescimento a 25±2⁰C, expostas a fotoperíodo de 16 horas de luz (38µmol.m².s⁻¹). Após 30 dias, não foi observado explantes sadios em nenhum dos tratamentos; observou-se a ocorrência de grande contaminação. O tratamento com NaOCl por 15 minutos nos clones CNSAM-7905 e FDR-5788 foi mais efetivo para o controle da contaminação por fungos, apesar da oxidação nos explantes do clone CNSAM-5788 e a presença de bactéria juntamente com oxidação no clone FDR-5788 terem provocado a morte dos mesmos. Pelos resultados aqui apresentados, verifica-se a grande dificuldade na primeira etapa do processo de estabelecimento do cultivo *in vitro* da seringueira. Trabalhos futuros devem ser realizados no intuito de controlar a contaminação e a oxidação nesta espécie.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*; desinfestação; meios de cultura

Abstract

The rubber tree, natural source of rubber, has recalcitrant seeds, which lose their germination capacity quickly. Vegetative propagation is the most recommended method to raise seedlings in large quantities while maintaining the integrity of genotypic clones established. Within this context, the development of techniques for mass propagation of selected clones of this species is essential for the viability of this culture. This study aimed to establish a protocol to obtain aseptic cultures of rubber tree (*Hevea spp.*) from plants in the field to *in vitro* cultivation. Auxiliary buds of CNS-AM-7905, PX-5788 and FDR clones were collected (Clone Garden - Embrapa Acre). The stem sections were sterilized with NaOCl (2.5%) and HgCl₂ (0.05%) for 5, 10, 15 and 20 minutes. The explants were inoculated in a WPM growth medium and kept in a growth chamber at 25 ± 20C, exposed to a photoperiod of 16 hours of light (38µmol.m².s⁻¹). After 30 days, no healthy explants were observed in any of the treatments; there was an occurrence of heavy contamination. Treatment with NaOCl for 15 minutes in CNS-7905-AM-5788 and FDR clones was more effective in controlling fungal contamination, although the oxidation in CNS explants of AM-5788 clone and the presence of bacteria with oxidation in the FDR-5788 clone provoked their deaths. The results presented here show that there is great difficulty in the first establishment stage of *in vitro* cultivation of the rubber tree. Future work should be carried out to control for contamination and oxidation in this species.

Palavras-chave: in vitro culture, disinfestation, growth medium

Introdução

A descoberta do processo de fabricação da borracha a partir de polímeros derivados de petróleo veio diminuir consideravelmente a demanda de borracha natural no mundo. Apesar da borracha sintética, que é um derivado do petróleo, possuir quase as mesmas propriedades físicas que a borracha natural (IAC, 2008), esta possui melhor elasticidade, resistência à fricção, impermeabilidade a líquidos e gases, bem como isolamento térmico, o que demonstra que a borracha natural ocupa papel de grande destaque como matéria-prima mundial.

Com o preço elevado do petróleo, a borracha sintética, apesar de ser mais barata que a natural, fica menos competitiva. Além deste fato, se tem a pressão pelo uso de produtos naturais e a necessidade de se criar alternativas para o desenvolvimento sustentável, já que o petróleo é um recurso natural não renovável e, portanto suas reservas mundiais podem se esgotar. Outro fator importante a se considerar, é a queda de produção dos seringais asiáticos (Belfort, 2009) que são os principais produtores de borracha natural do mundo e a substituição dos seringais por dendezeiros que tem ocorrido na Malásia. Com isso, irá ocorrer em um futuro próximo um crescimento na procura pela borracha natural.

A seringueira, espécie arborea pertencente ao gênero *Hevea* (família Euforbiaceae) é a principal fonte natural da borracha, sendo considerada matéria-prima estratégica na indústria de pneumáticos, material bélico, transporte e outros. Cerca de 80% da produção mundial da borracha natural é originária do Sudoeste Asiático (Tailândia, Indonésia e Malásia) e, apesar da produção estar atendendo a demanda do mercado, se tem perspectivas da necessidade de aumento (Martins et al., 2000) e, como consequência aumento no preço.

O Brasil que no início do século XX foi o maior produtor de borracha natural do mundo, passou a ser comprador (Gonçalves et al., 1983), importando cerca de 63% do seu consumo interno, produzindo apenas 1% da produção mundial (IAPAR, 2008). A expansão da heveicultura pode proporcionar uma alternativa econômica, já que se tem uma perspectiva de aumento do preço e da demanda da borracha natural no mercado internacional, e minimizar a importação no Brasil, além de ser um recurso renovável, promover a redução do efeito estufa e proteger o meio ambiente (Gonçalves, 2002; Jacovine et al., 2006).

A seringueira é uma planta alógama com alto grau de segregação, suas sementes são recalcitrantes e perdem o poder germinativo rapidamente. Tendo-se deste modo dificuldades na obtenção de mudas em grande quantidade. Portanto, a propagação vegetativa é o método mais recomendado, além de manter a integridade genotípica dos clones estabelecidos (Martins et al., 2000).

Diante do exposto acima, o desenvolvimento de técnicas que permitam a propagação em massa de clones selecionados desta espécie torna-se indispensável para a viabilidade desta cultura. Dentre as metodologias existentes, a cultura de tecidos *in vitro* surge como uma ferramenta que possibilita a multiplicação rápida de plantas de um mesmo genótipo a um custo reduzido e com menor tempo do que os sistemas convencionais, além da alta qualidade sanitária (George, 1996).

O cultivo de tecidos vegetais é fundamentado em alguns princípios, sendo os mais importantes: a capacidade de totipotência celular, ou seja, cada célula pode gerar uma nova planta com as mesmas características da planta matriz, e a hipótese do balanço hormonal, onde o desenvolvimento do explante depende do controle da interação entre as concentrações de auxinas e citocininas (George, 1996).

Diversos trabalhos têm sido realizados em cultura de tecidos de espécies lenhosas (Bassan et al., 2006; Campos et al., 2006; Mantovani et al., 1999; Mendanha et al., 1998; Paranjothy e Gandhimathi, 1976; Rocha et al., 2007; Soares et al., 2007). Paranjothy e Gandhimathi (1976) foram os primeiros a obter culturas de brotos apicais em *Hevea*, embora estes não terem apresentado sistema radicular. Depois disso, plântulas com brotos e raízes puderam ser desenvolvidas com sucesso por vários autores (Senevirante e Flegmam, 1996; Mendanha et al., 1998).

Segundo Nayanakantha e Senevirantne (2007), explantes derivados de clones elite de árvores adultas de *Hevea* são altamente recalcitrantes, somente em poucos estudos a micropropagação de material clonal tem sido relatada com sucesso. Estes autores enfatizam que ainda não existe um protocolo que seja

eficiente para a propagação de clones elites em larga escala. Explantes oriundos de plantas adultas apresentam dificuldades tanto no estabelecimento da cultura como na proliferação celular *in vitro*. A seringueira é uma planta de clima tropical, sendo que a principal limitação para seu cultivo *in vitro* está na presença de contaminação por bactérias e fungos sistêmicos. Vários estudos têm sido realizados localizando a efetiva desinfestação de explantes desta planta (Enjarlic et al., 1987; Asokan et al., 1988).

Apesar dos avanços verificados nos estudos de micropropagação em *Hevea spp.*, ainda é limitada a compreensão dos estímulos e condições necessárias para o estabelecimento do cultivo *in vitro* para a indução e o controle da organogênese direta nesta espécie. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para obtenção de culturas assépticas de seringueira (*Hevea spp.*) a partir de plantas provenientes do campo, visando seu cultivo *in vitro*.

Material e Métodos

Este experimento foi conduzido no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular do Centro de Pesquisa Agroflorestal do Acre (CPAFAC). Utilizou-se como fonte de explantes gemas axilares de seringueira (*Hevea spp.*) provenientes dos clones CNS AM 7905, PX e FDR 5788 do jardim clonal da Embrapa Acre.

Após a coleta no jardim clonal, as seções caulinares dos clones supracitados foram conduzidas ao laboratório e então as gemas axilares foram lavadas em água corrente acrescidas com algumas gotas de detergente comercial durante 10 minutos, seguida de dois enxágües com água destilada. Posteriormente, foi realizada imersão dos explantes em álcool etílico a 70% (v/v), durante um minuto.

O processo de desinfestação foi realizado em câmara de fluxo laminar, em condições assépticas, utilizando vidrarias previamente esterilizadas. Os explantes foram mergulhados nos seguintes tratamentos de desinfestação: T1 (água destilada por 10 min); T2 (Hipoclorito de sódio (NaOCl) (2,5%) por 5 min); T3 (NaOCl (2,5%) por 10 min); T4 (NaOCl (2,5%) por 15 min); T5 (NaOCl (2,5%) por 20 min); T6 (Cloreto de mercúrio (HgCl₂) (0,05%) por 5 minutos); T7 (HgCl₂) (0,05%) por 10 minutos); T8 (HgCl₂) (0,05%) por 15 minutos); T9 (HgCl₂) (0,05%) por 20 minutos), sendo em seguida realizadas três lavagens em água destilada e autoclavada.

Após a desinfestação os explantes foram introduzidos em tubos de ensaio contendo meio de cultura WPM (Wood Plant Médium, elaborado por Lloyd & McCown, 1980), suplementado com sacarose (30 g.L⁻¹) e solidificado com Agar (6 g.L⁻¹). As culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura controlada de 25±2^oC, dispoendo de lâmpadas fluorescentes Philips TDL (38 µmol.m².s⁻¹), expostas ao fotoperíodo de 16 horas de luz.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2X4 com seis repetições, totalizando 48 parcelas, sendo um explante por parcela. As avaliações foram realizadas ao final de 30 dias.

Resultados e Discussão

A micropropagação de espécies lenhosas tem sido um dos grandes desafios para a área da Biotecnologia, principalmente na fase inicial do estabelecimento do cultivo *in vitro*. Tem-se dificuldades na obtenção de tecidos livres de contaminações provocadas por fungos, bactérias e também a oxidação provocada pelos compostos fenólicos (Grattapaglia & Machado, 1998; Teixeira, 2008). Teixeira (2008) comenta que além da contaminação superficial, também se tem a contaminação endógena, que é mais freqüente em explantes derivados de plantas cultivadas no campo. Este autor recomenda para a obtenção de explantes, o cultivo da planta em casa de vegetação ou telados, onde se tem condições ambientais mais controladas.

No presente estudo a ocorrência de grande contaminação por fungos e bactérias e oxidação fenólica promoveram a morte de todos explantes dos três clones (Figura 1). Os tratamentos T4, T5 e T9 do Clone PX não foram realizados por falta de material.

Verificou-se que o tratamento dos explantes com hipoclorito de sódio (2,5%) por 15 minutos (T4) nos clones CNS AM 7905 e FDR 5788 foi mais efetivo para o controle da contaminação por fungos, apesar da oxidação nos explantes do clone CNS AM 5788 e a presença de bactéria juntamente com oxidação no clone FDR 5788 terem provocado a morte dos mesmos.

A liberação dos compostos fenólicos ocorre devido ao dano causado às células durante a excisão dos explantes, comprometendo o desenvolvimento do explante. Andrade et al. (2000) comentam que as plantas lenhosas acumulam polifenóis e produtos da oxidação tais como melanina, suberina, lignina dentre outros, em torno da superfície incisada do explante, as quais modificam a composição do meio de cultura e a absorção de metabólitos, fato este observado no presente estudo

Pelos resultados aqui apresentados, verifica-se a grande dificuldade na primeira etapa do processo de estabelecimento do cultivo *in vitro* da seringueira. Trabalhos futuros devem ser realizados no intuito de controlar a contaminação e os efeitos da oxidação nesta espécie. Este trabalho tem caráter pioneiro, visto que a utilização de explantes de plantas oriundas do campo é pouco relatada na literatura e apresenta um grau de dificuldade muito maior do que a utilização de material provindo de casa de vegetação e/ou germinação *in vitro*.

Noieto e Silveira (2004) realizaram vários experimentos com o intuito do estabelecimento *in vitro* de copaíba (*Copaífera lanhsdorffi*), onde foram feitos testes com sementes e segmentos nodais de plantas adultas. Eles verificaram que o estabelecimento *in vitro* de explantes de plantas adultas não foi bem sucedido, pois os diferentes tratamentos de desinfestação provocaram escurecimento e morte dos explantes. Já o estabelecimento do cultivo *in vitro* pelas sementes foi satisfatório para a formação de brotos.

Vários autores têm obtido sucesso na organogênese direta de espécies lenhosas tendo como fonte de explantes segmentos caulinares (nodais). O que se observa é que em todos os casos as plantas fornecedoras de explantes estavam em locais onde as condições ambientais eram controladas ou em casa de vegetação (Almeida et al., 2008; Enjalric e Carron, 1982; Mantovani et al., 2001; Melo et al., 1999), ou a partir de plântulas germinadas *in vitro* (Bassan et al., 2006; Campos et al., 2006; Cerdas et al., 1998; Mantovani et al., 1999; Mendanha et al., 1998; Paranjothy e Gandhimathi; 1976 Rocha et al., 2007).

Conclusões

O tratamento utilizado para a desinfestação dos explantes de seringueira não foram efetivos para o controle das contaminações. A oxidação fenólica prejudica os explantes.

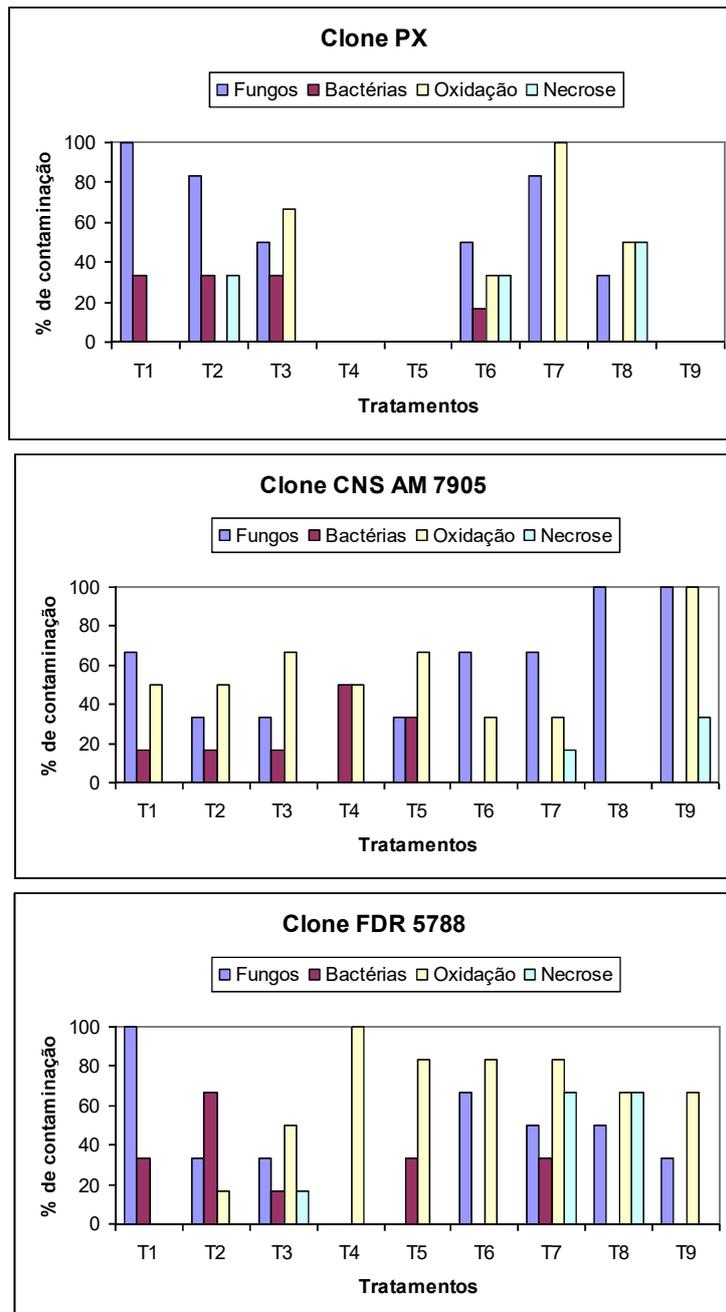


Figura 2. Porcentagem de contaminação em explantes de seringueiras (clones PX, CNS AM 7905 3 FDR 5788) submetidos a diferentes tratamentos de desinfestação.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa, a Embrapa Acre pela infra-estrutura.

Referências Bibliográficas

ASOKAN, M. P., SOBHANA, P., SUSHAMAKUMARI, S. AND SETHURAJ, M. R. Tissue culture propagation of rubber (*Hevea brasiliensis* Willd ex Adrig. De Juss. Muell. Arg) Clone GT1. **Indian Journal of Natural Rubber Research**, v.1, p.10-12, 1988.

BASSAN, J.S.; REINIGER, L.R.S.; ROCHA, B.H.G.; SEREVE, K.R.P.; FLORES, A.V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafistula (*Peltophorum dubium* (SPRENG) Taub.). **Ciência Florestal**. v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006.

BELFORT, A. F. Borracha ganha cada vez mais espaço na área da Zona da Mata. *Jornal do Comércio de Recife*. Disponível em < http://www2.uol.com.br/JC/_1999/1804/ec1804p.htm > Acesso em: 21/01/2009.

CAMPOS, R.A.S.; AÑEZ, L.M.M.; DOMBROSKI, J.L.D.; DIGNART, S.L. [Micropropagação de *Jatropha elliptica* \(Pohl\) Müll. Arg.](#) **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 9, n.3, p. 30-36, 2007.

ENJALRIC, F., CARON, M. P AND LARDET, L. Contamination of primary cultures in tropical areas: the case of *Hevea brasiliensis*. International Symposium Cork, Ireland. **Acta Horticulture**, v.225, p.57-65, 1987.

ENJALRIC, F. AND CARRON, M. P .Microbouturagew in vitro de jeunes plants d' *Hevea brasiliensis*. **CR Academic Science Paris**, v.295, p.259-264, 1982.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Exegetics, Edington. v.1, 1996. 555p.

GONÇALVEZ, P.S.; PAIVA, J.R.; SOUZA, R.A. **Retrospectiva e atualidade do melhoramento genético da seringueira (*Hevea spp.*) no Brasil e em países asiáticos**. Manaus. Embrapa – CNPSD. Documentos, 2. 1983. 69p.

GRATTAPAGLIA, D. ; MACHADO, M. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. [e.d.]. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998, p.183-260. v.1.

IAPAR - INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. O Cultivo da Seringueira (*Hevea spp.*). Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Disponível em: http://www.iapar.br/zip_pdf/cultsering.pdf. Acesso em: 24/07/2008.

JACOVINE, L.A.G.; NISH, M.H.; SILVA, M.L.; VALVERDE, S.R.; ALVARENGA, A.P. A seringueira no contexto das negociações sobre mudanças climáticas globais. In: MARTINS, A.L.M.; NILZA, P.R.; GONÇALVES, P.S.; VAL, K.S. Influência de porta-enxertos no crescimento de clones de seringueira no estado de São Paulo. **Pesq. Agrop. Bras.** v.35, n.9, p.1743-1759, 2000.

MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H.; VESTENA, S. Regeneração *in vitro* de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrábida ex Steudel). **Ciência Florestal**, v.11, n.2, p.93-101, 2001.

MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H.; GUERRA, M.P.; HOPPE, J.M. Micropropagação de caixeta, *Didymonax morototoni* (Albl.) Dcne. Et Planch. **Revista Florestal**. v. 9, n. 1, p. 47-61. 1999.

MELO. N.F.; OKASAKI, W.O.; LEITE, C.B.; FÁRI, M. Estabelecimento do cultivo *in vitro* da aceroleira (*Malpighia emarginata*). **Ciênc. e Agrotec.** v. 32, n. 1, p. 102-107. 1999.

MENDANHA, A.B.; TORRES, R.A.A.; FREIRE, A.B. Micropropagation of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) **Genetics and Molecular Biology**. v.21, n.3, 1998.

NAYANAKANTHA, N.M.C.; SENEVIRANTNE, P. Review Tissue culture of rubber: past, present and future prospects. **Cey. J. Sci. (Bio Sci.)** v.36, n.2, p.116-125. 2007.

PARANJOTHY, K.; GANDIMATHI, H. Tissue and Organ Culture of *Hevea*. Proceedings of International. Rubber Conference, Kuala Lumpur, Malaysia. v., p.59-84, 1976.

NOLETO, L.G.; SILVEIRA, C.E.S. Micropropagação de copaíba. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 33, p. 109-120, 2004.

ROCHA, S.C.; QUORIM, M.; RIBAS, L.L.F.; KOEHLER, H.S. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. **Revista Árvore**. v.31, n. 1, p. 43-50. 2007.

SENEVIRATNE, P.; FLEGMANN, A. W. The effect of thidiazuron on axillary shoot proliferation of *Hevea brasiliensis in vitro*. **Journal of Rubber Research Institute of Sri Lanka**, v.77, p.1-14, 1996.

TEIXEIRA, J.B. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas**. Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia, simpósios, 2001.