



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA –
CITA



INDUÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES DE SERINGUEIRA (*Hevea* spp.)

Ana Claudia Lopes da Silva

RIO BRANCO, AC
Julho/2018

ANA CLAUDIA LOPES DA SILVA

INDUÇÃO DE CALOS EM EXPLANTES DE SERINGUEIRA
(*Hevea* spp.)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências e Inovação Tecnológica**.

Orientadora: Andréa Raposo

RIO BRANCO, AC

Aos meus pais e amigos, por todo o amor e dedicação, por serem pessoas especiais. Obrigada por acreditarem em mim, pela admiração e pelo companheirismo nesta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida, saúde e proteção, por nunca ter me abandonado nos momentos de fraqueza e desânimo, mas, sobretudo, por ter usado minha fé como instrumento de incentivo, coragem e determinação durante a execução desta pesquisa.

À minha família, por sempre acreditar e investir no meu potencial. Em especial, aos meus pais e ao meu esposo, por todo apoio e incentivo. Vocês sempre serão referências de cuidado e dedicação.

À minha orientadora, Dra. Andrea Raposo, pelos ensinamentos e orientação. Pela amizade, incentivo e disponibilidade irrestrita. Pelo exemplo de pessoa íntegra e forte.

À pesquisadora Dra. Cândida Elisa Manfio, pelos ensinamentos e colaboração nos tratamentos estatísticos, de grande relevância para conclusão desse trabalho.

Aos meus amigos Keilyson Moraes, Jamilenia Carvalho, Ytamares Macedo, Paula Rufino, Polinar Rufino, Francislania Souza, Raiane Gomes, Luciana Santana, Susana Melo, Auriane Laneska, Clemerson Souza, por compartilharem comigo tantos momentos agradáveis.

Aos amigos que conquistei no mestrado, que vivenciaram momentos de estudo e de tensão. Obrigada pela amizade, dedicação e companheirismo.

À equipe do Laboratório LABMOL, Renata Beltrão, Lucielio Silva, João Ricardo Avelino, Kennedy Silva e João Paulo Gadelha, pela ajuda e cooperação durante a execução desse trabalho.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Acre, pela oportunidade de desenvolver as atividades de pesquisa em suas instalações.

À Universidade Federal do Acre, pela disponibilidade do programa de pós-graduação, e à Capes, pela concessão da bolsa de estudos durante o desenvolvimento do meu trabalho de dissertação.

Enfim, a todos que acompanharam e contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização dessa pesquisa.

Senhor, dê-me a serenidade necessária para aceitar as coisas que não posso modificar; coragem para modificar as que posso; e sabedoria para reconhecer a diferença entre elas. Vivendo um dia de cada vez, desfrutando um momento de cada vez...”

Reinhold Niebuhr

RESUMO

O cultivo *in vitro* constitui importante alternativa aos métodos tradicionais de propagação de plantas em espécies florestais e produtoras de sementes recalcitrantes como a seringueira. Considerada a principal fonte natural da borracha, sua cultura é bastante explorada mundialmente. Contudo, os estudos sobre este método de propagação nesta espécie na Amazônia Sul-Occidental são recentes. O presente trabalho teve como objetivo verificar qual tipo de explante mais responsivo para a calogênese em *Hevea* spp., para isto foram realizados vários experimentos utilizando diversas fontes de explantes, oriundas de plântulas germinadas no laboratório (folha, pecíolo, gema apical, caule, intertegumento e raiz), de plantas adultas (folhas, segmentos nodais e anteras) e de embriões zigóticos. Esses foram inoculados em variadas formulações de meio de cultura MS suplementado com diversos reguladores de crescimento, como o 2,4D, BAP, KIN, e ANA. Com base nos resultados obtidos, verificou-se que: a oxidação fenólica é um dos principais problemas para a obtenção de calos em seringueira, independente da fonte de explante utilizada; embriões zigóticos são explantes promissores para a calogênese; explantes oriundos de tecidos jovens apresentam maior porcentagem de formação de massa calogênica; as contaminações endógenas são mais evidentes em segmentos nodais de plantas adultas, esta, aliada à oxidação fenólica, inviabilizaram a formação de calos nestes explantes; as anteras desse gênero são sensíveis ao tratamento de desinfestação; explantes de folha, gema apical e pecíolo oriundos de plântulas germinadas no laboratório proporcionaram maior porcentagem de calos na espécie estudada. Todos os calos apresentavam aspecto compacto. Sendo assim, estudos futuros mais detalhados, se concentrando em explantes oriundos de tecidos jovens, devem ser realizados com o objetivo de obter calos friáveis.

Palavras-chave: cultura de tecidos, 2,4-D, calos, seringueira.

ABSTRACT

In vitro culture is an important alternative to traditional methods of propagating plants in forest species and producing recalcitrant seeds such as rubber trees. Considered the main natural source of rubber, its culture is widely explored worldwide. However, studies on this method of propagation in this species in the South-Western Amazon are recent. The present work had as objective to verify which type of explant most responsive to the calogenesis in *Hevea* sp., For this were done several experiments using several sources of explant from germinated seedlings in the laboratory (leaf, petiole, apical bud, stem, root) of adult plants (leaves, nodal and anther segments) and zygotic embryos. These were inoculated in various formulations of MS culture medium supplemented with various growth regulators such as 2,4D, BAP, KIN, L-cysteine and ANA. Based on the results obtained it was verified that: phenolic oxidation is one of the main problems to obtain callus in rubber tree independent of the explant source used; zygotic embryos are promising explants for calogenesis; explants derived from young tissue present a higher percentage of calogenic mass formation; the endogenous contaminations are more evident in nodal segments of adult plants, this allied to phenolic oxidation made the formation of calli in these explants unfeasible; the anthers of this genus are sensitive to the treatment of disinfestation; leaf explants, apical bud and petiole from germinated seedlings in the laboratory provided a higher percentage of calli in the species studied. All calli were compact in appearance. Thus, more detailed future studies focusing on explants from young tissues should be performed with the aim of obtaining friable callus.

Key words: tissue culture, 2,4-D, callus.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Representação ilustrativa das características morfológicas de <i>Hevea brasiliensis</i> . (A) galho com fruto deiscente; (B) extremidade de ramo lateral de um racemo; (C) flor masculina (parte do perianto distinto); (D) flor feminina na seção longitudinal; (E1, E2) frutos; (F) semente.	19
Figura 2. Foliolo de Seringueira (<i>Hevea</i> spp.) indicando as regiões utilizadas como fonte de explante no cultivo <i>in vitro</i>	31
Figura 3. Semente de Seringueira (<i>Hevea</i> spp.) indicando as fases de extração do embrião zigótico utilizado como fonte de explante no cultivo <i>in vitro</i>	33
Figura 4. Segmentos nodais de Seringueira (<i>Hevea</i> spp.), com aproximadamente 5 mm de comprimento com uma gema axilar utilizado como fonte de explante no cultivo <i>in vitro</i>	34
Figura 5. Botões florais imaturos de Seringueira (<i>Hevea</i> spp.)	36
Figura 6. Anteras de Seringueira (<i>Hevea</i> spp.), com aproximadamente 2 mm de comprimento, utilizadas como fonte de explante no cultivo <i>in vitro</i>	37
Figura 7. Sementes de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) com seus tegumentos removido e postos em frascos de vidro para germinação ex vitro em laboratório.....	38
Figura 8. Plântula de seringueira (<i>Hevea</i> spp.), após 15 dias de germinação, utilizada como fonte de explantes no cultivo <i>in vitro</i>	39
Figura 9. Oxidação fenólica em explante foliar de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.....	42
Figura 10. Porcentagem de oxidação fenólica em explante foliar de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.....	42
Figura 11. Porcentagem de contaminação em explante foliar de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.....	43

Figura 12.	Formação de calo a partir de explante foliar de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) após 60 dias de incubação em meio de cultura MS suplementado com 1 mg L ⁻¹ de 2,4-D e 1 ml L ⁻¹ de PPM...	45
Figura 13.	Explante foliar de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) com a presença de calo oxidado após 90 dias de incubação em meio de cultura MS.....	45
Figura 14.	Porcentagem sobrevivência e formação de calos em embriões zigóticos de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.....	48
Figura 15.	Embrião zigótico de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) após 90 dias de incubação em meio de cultura MS suplementado com 1 mg L ⁻¹ de 2,4-D (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético) combinado com 1 mg L ⁻¹ de ANA (Ácido Naftalenoacético), com a presença de calo compacto de cor marrom claro.....	48
Figura 16	Porcentagem de oxidação em segmentos nodais de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) após 90 dias de incubação em meio de cultura MS, em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.....	52
Figura 17.	Segmentos nodais de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) após 60 dias de incubação em meio de cultura Ms, em processo de oxidação e necrose.....	53
Figura 18.	Porcentagem de necrose em segmentos nodais de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) após 90 dias de incubação em meio de cultura Ms, em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.....	53
Figura 19.	Porcentagem de contaminação fúngica e bacteriana em segmentos nodais de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.....	54
Figura 20.	Porcentagem de contaminação bacteriana em segmentos nodais de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.....	55
Figura 21.	a) Antera de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) recém extraída e estabelecida no cultivo <i>in vitro</i> . b) Antera de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> , apresentando oxidação e morte dos explantes.....	56
Figura 22.	Oxidação fenólica em diferentes explantes (pecíolo (a), gema apical (b), caule (c)) de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) após 30 dias de estabelecimento do cultivo <i>in vitro</i>	59

Figura 23.	Porcentagem de oxidação em diferentes fontes de explantes de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) após 90 dias de incubação em meio de cultura MS, em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.....	59
Figura 24.	Porcentagem de contaminação fúngica e bacteriana em diferentes fontes de explantes de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) após 90 dias de incubação em meio de cultura MS, em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.....	60
Figura 25.	Porcentagem de contaminação fúngica e bacteriana em diferentes fontes de explantes de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) após 90 dias de incubação em meio de cultura MS, em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.....	61
Figura 26.	Porcentagem de formação de calos em diferentes fontes de explantes de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) após 90 dias de incubação em meio de cultura MS, em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.....	61
Figura 27.	Explante foliar (a), gema apical (b), pecíolo (c) e caule (d) de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) após 90 dias de incubação em meio de cultura MS com a presença de calos compactos com coloração variando de bege, marrom claro e branco.....	62

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Tratamentos com diferentes concentrações do regulador de crescimento 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e PPM® (Plant Preservative Mixture) na indução de calos em folhas jovens de seringueira (<i>Hevea</i> spp.)	32
Tabela 2. Tratamentos com diferentes concentrações do regulador de crescimento 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e ANA (ácido naftalenoacético) na indução de calos em embriões zigóticos de seringueira (<i>Hevea</i> spp.)	34
Tabela 3. Tratamentos com diferentes concentrações do regulador de crescimento 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e ANA (ácido naftalenoacético) na indução de calos em segmentos nodais de seringueira (<i>Hevea</i> spp.)	35
Tabela 4. Tratamentos com diferentes concentrações do regulador de crescimento 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), KIN (cinetina) e ANA (ácido naftalenoacético) na indução de calos em anteras de seringueira (<i>Hevea</i> spp.)	37
Tabela 5. Diferentes concentrações do regulador de crescimento 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), KIN (cinetina) e ANA (ácido naftalenoacético) adicionados aos meios de cultura utilizados para indução da calogênese em diferentes fontes de explantes oriundas de plântulas de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) germinadas em laboratório.....	39
Tabela 6. Tratamentos utilizados para as diferentes fontes de explante de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) na indução da calogênese.....	40
Tabela 7. Porcentagem sobrevivência de explantes foliares de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.....	41
Tabela 8. Porcentagem sobrevivência e formação de calos em embriões zigóticos de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.....	47
Tabela 9. Porcentagem de sobrevivência em segmentos nodais de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.....	51

Tabela 10. Porcentagem sobrevivência das diferentes fontes de explantes de seringueira (<i>Hevea spp.</i>) em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.....	59
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA	Ácido indol-3-acético
AIB	Ácido indol-3-butírico
ANA	Ácido naftalenoacético
BAP	6-benzilaminopurina
HCl	Ácido clorídrico
KIN	Cinetina
MS	Murashigue e Skoog
NaOH	Hidróxido de sódio
PPM [®]	Plant Preservative Mixture
PVP	Polivinilpirrolidona
TDZ	Thidiazuron
Zea	Zeatina
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Considerações sobre a seringueira.....	18
2.2 Métodos de propagação da seringueira.....	20
2.3 Micropropagação.....	21
2.4 Calogênese.....	23
2.5 Explantes.....	24
2.6 Meios de cultura.....	27
2.7 Hormônios e reguladores de crescimento.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Indução de calogênese em folhas de seringueira (<i>Hevea</i> spp.).	30
3.2 Indução da calogênese em embriões zigóticos de seringueira (<i>Hevea</i> spp.)	33
3.3 Indução da calogênese em segmentos nodais de seringueira (<i>Hevea</i> spp.)	34
3.4 Indução de calogênese em anteras de seringueira (<i>Hevea</i> spp.)..	36
3.5 Indução da calogênese em diferentes fontes de explantes oriundas de plântulas de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) germinadas <i>ex vitro</i>	38
3.6 Análises Estatísticas.....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1 Indução de calogênese em folhas de seringueira (<i>Hevea</i> spp.)....	41
4.2 Indução da calogênese em embriões zigóticos de seringueira (<i>Hevea</i> spp.)	47
4.3 Indução da calogênese em segmentos nodais de seringueira (<i>Hevea</i> spp.)	51
4.4 Indução de calogênese em anteras de seringueira (<i>Hevea</i> spp.)..	56
4.5 Indução da calogênese em diferentes fontes de explantes oriundas de plântulas de seringueira (<i>Hevea</i> spp.) germinadas <i>ex vitro</i>	58

5. CONCLUSÕES.....	64
6. REFERÊNCIAS	

1. INTRODUÇÃO

Segundo o Ministério do Meio Ambiente (2017), o Brasil ocupa quase metade da América do Sul e é o país com a maior diversidade de espécies no mundo, pois abriga um vasto patrimônio genético. Dentre as espécies com grande potencial econômico, destaca-se a seringueira, uma espécie arbórea pertencente ao gênero *Hevea* (família Euphorbiaceae), a principal fonte de borracha natural no mundo, cultivada e utilizada de modo extrativo (CAMPELO JÚNIOR, 2000; COSTA et al., 2001). Sua matéria-prima é fundamental para o agronegócio, sendo considerada estratégica na indústria de pneumáticos, material bélico, transporte e outros (MACEDO et al., 2002; RIPPEL; BRAGANÇA, 2009).

Apesar do Brasil ter ostentado o monopólio da produção de borracha natural no século passado, atualmente o país passou de principal produtor e exportador a importador desta matéria-prima. Isso se deu após a introdução de sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis*) na Ásia, onde as plantas se adaptaram muito bem, e devido ao aparecimento do mal das folhas (causado pelo fungo *Microcyclus ulei*) nos seringais brasileiros, que causou uma drástica queda na produção da seringueira no território nacional (GONÇALVES et al., 1983). Os países asiáticos são atualmente os maiores produtores de borracha natural, sendo esses os responsáveis por cerca de 90% da produção mundial (GOUVÊA et al., 2010).

A cultura da seringueira pode proporcionar uma alternativa econômica, pois além de ser um recurso renovável, contribui para a redução do efeito estufa e protege o meio ambiente (JACOVINE et al., 2006, FERNANDES et al., 2007; MUNASINGLE et al., 2011). Orjuela-Chavez et al. (2014) confirmam que plantações de *H. brasiliensis* na Amazônia colombiana têm um grande potencial para captura e armazenamento de carbono, permitindo encontrar opções para fortalecer a competitividade e sustentabilidade da cadeia de produção de borracha na região.

No início de sua exploração comercial, a cultura da seringueira era propagada apenas por meio de sementes. Com o desenvolvimento das técnicas de cultivo, passou a ser propagada tanto por via sexuada como assexuada (vegetativa) (MARATTUKULAM; MERCYKUTTY, 2000).

O cultivo de tecidos vegetais *in vitro* permite a propagação das plantas por meio de uma das estratégias mais importantes da biotecnologia moderna (ZICHNER-ZORZ et al., 2012). Essa técnica viabiliza a clonagem de várias espécies, permitindo a

formação de indivíduos geneticamente idênticos, tomando por base células, órgãos ou pequenos fragmentos de uma planta, denominados explantes (SOUZA; JUNGHANS, 2006). Estes são cultivados em meio nutritivo, sob condições ambientais controladas, até a formação da nova planta, para posterior aclimatização (FLÔRES et al., 2011).

Durante a morfogênese, as células vegetais podem sofrer diversos processos, entre eles estão a embriogênese somática e a organogênese (JIMÉNEZ, 2001). Os dois processos correspondem à indução de gemas adventícias diretamente sobre o explante ou calo (forma indireta), mediante a desdiferenciação e rediferenciação celular, levando à formação de uma planta completa (XAVIER et al., 2013). O processo de organogênese *in vitro* é considerado complexo, com a atuação de múltiplos fatores externos e internos, envolvendo interação entre fonte de explante, meio de cultura, fatores do ambiente, ação dos reguladores de crescimento, em particular auxinas e citocininas, como também a habilidade dos tecidos em responder a mudanças hormonais durante o período de cultivo (XAVIER; OTONI, 2009).

A micropropagação de espécies florestais tem potencial para conservação de germoplasma *in vitro*, aplicação nos programas de propagação clonal, auxiliando no desenvolvimento de protocolos eficientes de regeneração para diversas espécies (XAVIER et al., 2013).

Devido à escassez de informações referentes à organogênese *in vitro* em *Hevea*, estudos têm sido realizados focalizando sua micropropagação. De acordo com Nayanakantha e Senevirante (2007), explantes derivados de clones elite de árvores adultas de *Hevea* são altamente recalcitrantes, sendo um fator limitante ao estabelecimento desta cultura em condições *in vitro*.

No estudo realizado por Ighere et al. (2011) com seringueira, foram obtidas plântulas *in vitro* com sistemas radicular e aéreo desenvolvidos, porém estas estagnaram e morreram ainda no meio de cultura. Apesar desse avanço, os autores enfatizam que ainda não existe um protocolo que seja eficiente para a propagação de clones elites em larga escala.

Diante do exposto, a compreensão dos estímulos e condições necessárias para o estabelecimento do cultivo *in vitro* deste gênero ainda é limitada. Desta forma, este trabalho teve por objetivo induzir massa calogênica em explantes de *Hevea spp.*

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações sobre a seringueira

Popularmente conhecida por seringueira, a espécie *Hevea brasiliensis* representa uma das mais importantes espécies pertencentes à família *Euphorbiaceae*, que apresenta grande potencialidade econômica em função de ser a maior fontes produtora de borracha natural no mundo (GONÇALVES et al., 1990; COSTA et al., 2001). Originária do continente americano, abrange, como área de ocorrência e dispersão natural, a Amazônia brasileira e países próximos, como a Bolívia, Colômbia, Peru, Venezuela, Equador, Suriname e Guiana (SECCO, 2008).

A seringueira (Figura 1) é uma árvore de crescimento rápido, raramente superior a 25 m de altura em plantações, e 40 m em ambientes selvagens. Fuste geralmente reto ou cônico, ramificado, com no mínimo 50 cm de diâmetro, sem sapopemas; superfície da casca lisa, cinza ao marrom pálido, entrecasca castanha clara, com abundante látex branco; coroa cônica, ramos finos. Sistema radicular com raiz principal bem desenvolvida e raízes laterais fasciculadas. É classificada como uma dicotiledônea monóica, isto é, possui flores masculinas e femininas em um mesmo indivíduo. As flores são unissexuadas, pequenas, amarelas e dispostas em racimo. A polinização é cruzada e entomófila. O fruto é uma cápsula grande, que geralmente apresenta três sementes, de pericarpo duro e liso. Estas são recalcitrantes, e em geral a germinação ocorre dentro de quinze a vinte dias. As folhas apresentam pecíolos longos e são repartidas em três folíolos. (WICHERLEY, 1992; MARATTUKULAM; MERCYKUTTY, 2000; PREMAKUMARI; SARASWATHYAMMA, 2000; SECCO, 2008; WORLD AGROFORESTRY DATABASE, 2012).

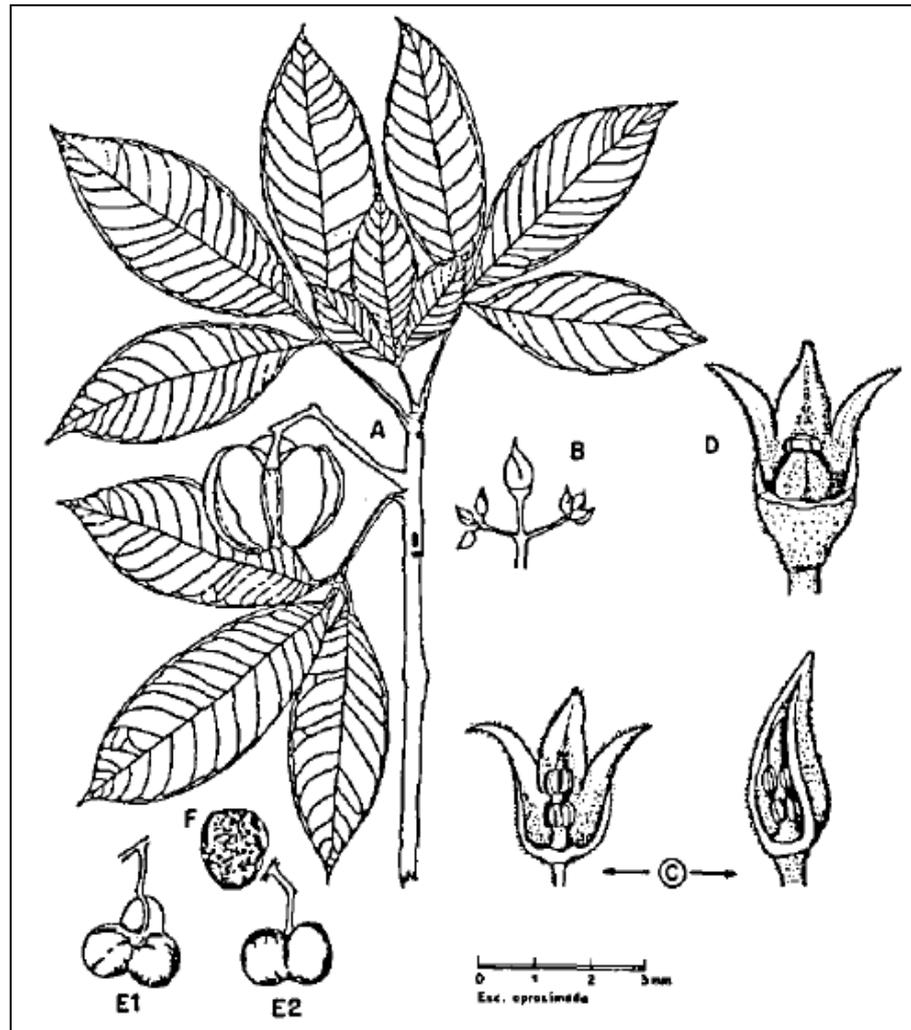


Figura 1. Representação ilustrativa das características morfológicas de *Hevea brasiliensis*. (A) galho com fruto deiscente; (B) extremidade de ramo lateral de um racemo; (C) flor masculina (parte do perianto distinto); (D) flor feminina na seção longitudinal; (E1, E,2) frutos; (F) semente. Fonte: Gonçalves, 1990.

A borracha natural apresenta características físico-químicas superiores, quando comparadas com as borrachas sintéticas, com maior elasticidade, flexibilidade, resistência à fricção e à corrosão, impermeabilidade a líquidos e gases (CORNISH, 2001). Esta matéria-prima extraída da seringueira é amplamente utilizada no transporte, na indústria, material bélico, material cirúrgico, preservativos, pisos e revestimentos, impermeabilização de fios e tecidos (COSTA et al., 2001; RIPPEL; BRAGANÇA, 2009; IAC 2017). Devido a estas características, a borracha natural apresenta qualidades que não podem ser obtidas em polímeros produzidos artificialmente (SILVA, 2012).

Atualmente, os países asiáticos são os maiores produtores mundiais de borracha natural, principalmente Tailândia, Indonésia, Vietnã e Malásia (IRSG, 2017),

sendo responsável por cerca de 90% da produção mundial de borracha natural (GOUVÊA et al., 2010). Desde meados do século passado, a oferta e a demanda por esse produto no Brasil encontram-se cada vez mais distantes, devido à baixa produção no território nacional. Existem estimativas de que em 2020 o país poderá estar produzindo 250 mil toneladas diante de um consumo potencial de 500 mil toneladas (IAC, 2017).

Os cultivos intensivos de seringueira encontram-se entre as latitudes de 10°S e 10°N. É nessa faixa que a cultura encontra, aparentemente, condições ideais para seu desenvolvimento, representadas por uma temperatura média anual de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, pluviosidade anual entre 2.000 e 4.000 mm, distribuídos ao longo de todo o ano, solos bem drenados e profundos e um pH ótimo de 4,0 a 5,5 (PRIYADARSHAN; CLÉMENT-DEMANGE, 2004).

Conforme relatam Priyadarshan et al. (2001), o trópico úmido da América Latina vem apresentando dificuldades nesta cultura após o surgimento do *Microcyclus ulei* (mal-das-folhas), doença fúngica que dizimou milhares de hectares de seringais na região Amazônica. Em consequência disto, várias outras regiões do mundo iniciaram seu cultivo, como por exemplo a China, onde seringais estão sendo plantados em latitudes de 18°S a 24°N. Entretanto, de acordo com Gonçalves et al. (2001), no Brasil as novas iniciativas estão se expandindo para latitudes de 19°N a 23°S, incluindo Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e norte do Paraná, evidenciando a grande adaptabilidade da seringueira às diversas condições ecológicas.

O cultivo da seringueira é justificado por ser uma espécie produtora de borracha natural de alta qualidade, quando comparada às demais plantas produtoras de borracha (VENKATACHALAM et al., 2013). Sob o ponto de vista ambiental, é importante considerar o impacto positivo de uma plantação de seringueira. Esta cultura, além de proporcionar uma alternativa econômica, tem um grande potencial para captura e armazenamento de carbono, permitindo encontrar opções para fortalecer a competitividade e sustentabilidade da cadeia de produção de borracha (ORJUELA-CHAVEZ et al., 2014).

2.2 Métodos de propagação da seringueira

A seringueira possui sementes recalcitrantes, isto implica na perda rápida de seu poder germinativo, principalmente quando as condições climáticas propiciam rápida redução do seu teor de água (BONOME et al., 2009). Sementes como estas

são dispersas da planta mãe com alta umidade e mecanismos adaptativos que proporcionam germinação rápida (OBROUCHEVA et al., 2012), e armazená-las com sucesso é ainda um problema (LAN et al., 2012).

Segundo Marattukulam e Mercykutty (2000), a seringueira pode ser propagada tanto por via sexuada como assexuada (vegetativa). No início de sua exploração comercial, a cultura era propagada apenas por meio de sementes. Com o desenvolvimento das técnicas de cultivo, a propagação utilizando gemas vegetativas tornou-se comum. A reprodução sexuada, ou seja, por sementes, ainda hoje é utilizada para a multiplicação de porta-enxertos.

A propagação vegetativa ou assexuada surgiu como uma alternativa à produção sexuada, baseando-se na capacidade de regeneração de um vegetal a partir de células somáticas, tem como principais vantagens a reprodução de indivíduos geneticamente iguais e a reprodução de plantas sem o uso de sementes (ALFENAS et al. 2004). Esta técnica apresenta grande importância quando se pretende multiplicar um genótipo que é heterozigoto e que apresenta características consideradas superiores, que se perdem quando propagadas por sementes (GATTI, 2002). A multiplicação de plantas por meio da propagação vegetativa engloba vários métodos: estaquia, miniestaquia, microestaquia e micropropagação (XAVIER et al., 2009).

Pelo fato de o gênero *Hevea* apresentar grande variabilidade genética, Martins et al. (2000) propõe que a propagação vegetativa seja a mais indicada, pois visa assegurar a integridade genotípica dos clones estabelecidos. Desta forma, aumentam as possibilidades de obtenção de plantas mais homogêneas e produtivas no seringal.

2.3 Micropropagação

A propagação *in vitro*, ou micropropagação, é uma técnica de cultura de tecidos vegetais que utiliza pequenos fragmentos de tecido vivo, isolados de um organismo e cultivados assepticamente em um meio nutritivo sob condições ambientais controladas, até a formação da nova planta, para posterior aclimatização (SILVA, 2010; FLÔRES et al. 2011).

Os protocolos de trabalhos de micropropagação são realizados em etapas distintas: (a) preparação (seleção da planta-matriz fornecedora de explantes e pré-tratamentos para promover maior sanidade do material que será coletado); (b) estabelecimento do cultivo inicial *in vitro*; (c) organogênese (multiplicação e enraizamento das brotações); e (d) aclimação (transferência do material do meio de

cultura para o substrato). Sendo as fases mais críticas o estabelecimento do cultivo e a aclimatização, por exigirem mais cuidados (PASQUAL et al., 2001).

A utilização da micropropagação apresenta vantagens como: (a) possibilidade de obter o maior número de plantas a partir de um explante inicial, independentemente da estação do ano; (b) redução do tempo e da área necessária à multiplicação da espécie; (c) melhores condições sanitárias; (d) reprodução do genótipo da planta-mãe, e (e) propagação vegetativa de espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos (LUZ et al., 2014).

O estado fisiológico da planta-matriz tem grande influência na morfogênese, no crescimento e nas taxas de multiplicação *in vitro*, podendo ser melhorado com o adequado pré-tratamento fitossanitário nas plantas matrizes (ALFENAS et al., 2009). Esse pré-tratamento tem por objetivo manter os agentes microbianos internos (endofíticos) nos níveis mais baixos possíveis, enquanto os externos devem ser totalmente eliminados (WENDLING et al., 2006).

A assepsia do material vegetal é de fundamental importância na micropropagação e, sendo efetuada com sucesso, evitará contaminação no meio de cultura por fungos e bactérias, que ocasionam perdas do material vegetativo e do meio de cultura, acarretando no insucesso da pesquisa (QUISEN; ANGELO, 2008; RAPOSO et al., 2012).

O processo de micropropagação está baseado na totipotencialidade dos explantes, ou seja, no princípio de que cada célula vegetal possui o potencial genético necessário para reproduzir um organismo inteiro, o que o torna uma ferramenta importante para a propagação massal de genótipos superiores (TORRES et al., 1998; CID, 2001, LEMOS, 2003).

Espécies lenhosas vêm sendo propagadas com sucesso através da cultura de tecidos (GOMES et al., 2010). Esta técnica permite a rápida multiplicação de cultivares com características desejáveis, geneticamente idênticos e livres de doenças, sendo realizada por via direta ou indireta (PRAMMANEE et al., 2011). Por via direta, a indução de gemas adventícias se desenvolve diretamente sobre o explante, enquanto que na via indireta há uma fase de proliferação e crescimento de calos por indução dos explantes (ANDRADE, 2002; CANHOTO, 2010).

A micropropagação foi aplicada comercialmente pela primeira vez na década de 1960, na propagação *in vitro* de espécies do gênero *Musa*. Desde então, tem ocorrido uma grande intensificação dos trabalhos de pesquisa, a fim de tornar a

técnica cada vez mais eficiente, produtiva e menos onerosa (SENDIN, 2001; ROCHA, 2005).

2.4 Calogênese

O processo da calogênese é realizado através da indução de calos (grupo ou massa de células com crescimento desordenado, que se multiplicam e se desenvolvem em resposta a injúrias químicas ou físicas), e possui a capacidade de se diferenciar em tecidos e órgãos, como resultado de estresse físico ou fisiológico (TORRES et al., 1998; GEORGE et al. 2008).

A formação de calos pode ser dividida em três fases: indução, divisão celular e diferenciação. Durante a fase de indução, ocorre um estímulo no metabolismo, preparando as células para a divisão celular. Na fase de divisão, os explantes readquirem capacidade meristemática pela desdiferenciação de suas células, promovendo o crescimento do calo pela produção de células parenquimáticas indiferenciadas. Na última fase, algumas regiões do calo rediferenciam-se, formando zonas de atividade meristemática (AITCHISON et al., 1977; GODOY-HERNÁNDEZ; VASQUÉZ-FLOTA 2006).

Durante o processo de diferenciação (rediferenciação) das células presentes nos calos, novos meristemas são formados no tecido e esses originam células parenquimatosas não diferenciadas, sem nenhuma estrutura organizada, característica do órgão ou tecido do qual foram derivadas (GEORGE et al. 2008). Embora o calo permaneça não organizado, o crescimento continua e alguns tipos de células especializadas podem ser formados. Tal diferenciação pode ocorrer em locais aleatórios ou associados a centros de morfogênese, que originam órgãos como raízes, brotações e embriões. A produção de novas plantas de cultura não organizadas é frequentemente referida como regeneração (PAIVA; PAIVA, 2001).

Segundo Fortes (1992) e George (1993), a formação do calo depende principalmente do correto balanço dos reguladores de crescimento, e esse balanço varia conforme a origem, tamanho, idade e pré-tratamentos a que são submetidos os explantes, a constituição do meio nutritivo, as condições físicas do ambiente (luz e temperatura), o genótipo e o estágio fisiológico da planta matriz.

Durante a subcultura de calos, Phillips et al. (1995) relatam que é possível observar cinco fases de crescimento: (a) fase de espera, onde as células estão se preparando para dividir; (b) fase exponencial, em que a taxa de divisão celular atinge

o clímax; (c) fase linear, onde a divisão celular decresce, mas a extensão celular aumenta; (d) fase de desaceleração, quando a taxa de divisão e expansão diminuem; e (e) fase estacionária, quando o número e tamanho das células permanecem constantes.

Um único explante pode gerar diferentes tipos de calos. Sua classificação é realizada de acordo com as formas que apresentem: (a) calo friável: tecido formado por células sobrepostas, que, ao toque, se desagregam em células ou grupos de células (GODOY-HERNANDEZ; VAZQUEZ-FLOTA, 2006; FLORES, 2006); (b) calo compacto: massa celular com aspecto aveludado, formada primariamente a partir do explante inicial, composto por células compactadas entre si, formando um tecido resistente ao corte ou fragmentação; (c) calo oxidado: tecido já velho, geralmente de origem friável, com coloração marrom, sem capacidade para continuar se reproduzindo, estando em fase de senescência (GEORGE et al., 2008).

Williams e Maheswaran (1986) expõem que calos friáveis, sob determinadas condições, podem se tornar embriogênicos e assim se desenvolver em embriões somáticos. Estes, por sua vez, sob determinadas condições de cultivo *in vitro*, podem se desenvolver formando estruturas semelhantes a embriões zigóticos, sem fusão de gametas, dando origem a uma planta.

2.5 Explantes

Segundo Mantell et al. (1994) e Torres et al. (2000), o explante pode ser conceituado como todo segmento de tecido ou órgão vegetal utilizado para iniciar uma cultura *in vitro*. Sendo caracterizado por uma mistura de células em vários estados fisiológicos e bioquímicos de desenvolvimento, que quando expostos a um ambiente *in vitro*, sofrem reações diversificadas nos diferentes tipos celulares que o compõem, fazendo com que somente algumas células competentes respondam a um determinado estímulo, no caso da cultura de tecidos, normalmente a reguladores de crescimento.

A seleção do explante deve ser realizada cuidadosamente, pois o tipo de explante determina, muitas vezes, o grau de sucesso na micropropagação. Teoricamente, qualquer tecido pode ser utilizado como explante, tendo em vista a totipotência das células vegetais. Na prática, entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que tenham maior capacidade de expressar a totipotência (TORRES et al., 1998). A totipotencialidade

celular, formulada por Matthias Schleiden e Theodor Schwann, em 1938, afirma que a célula é autônoma e, portanto, contém a informação genética necessária para regeneração de uma planta completa (CID, 2001).

Um fator a ser levado em consideração na propagação para se iniciar o cultivo *in vitro* é a idade dos explantes. São indicados explantes juvenis, pois uma série de alterações na capacidade morfogênica dos tecidos pode ocorrer com a passagem do estado juvenil para o adulto, embora tecidos maduros também sejam utilizados. Quando uma planta envelhece, sua capacidade regenerativa costuma diminuir, por isso tende-se a utilizar material procedente de plantas jovens (PIERIK, 1990).

Os explantes devem ser retirados de plantas em crescimento ativo e que não estejam passando por qualquer tipo de estresse e ataque de pragas ou doenças (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; TEXEIRA, 2005).

Entre os diversos fatores relacionados à micropropagação, o tipo de explante, no que diz respeito à origem, tamanho, fase e manejo empregado, exerce forte influência nas subseqüentes respostas obtidas *in vitro* (ARAÚJO; CARVALHO 2005). O tamanho do explante a ser utilizado está relacionado com o objetivo do trabalho, pois vai determinar suas chances de sobrevivência e desenvolvimento (WILLADINO; CÂMARA, 2010).

Os explantes mais utilizados na micropropagação de espécies florestais são gemas axilares ou gemas apicais, embriões zigóticos, calos celulares e folhas. Estes precisam ser seccionados para que haja uma intensa proliferação celular com formação de tecidos de cicatrização e zonas de intensa atividade meristemática (PAIVA; PAIVA, 2001; PASQUAL et al., 2001). A escolha de um ou de outro explante dependerá dos objetivos desejados, da disponibilidade do material vegetal e da capacidade de resposta.

Quando o objetivo é a produção de calos, explantes oriundos de tecidos jovens não lignificados são mais apropriados para esse fim, por possuírem alta capacidade de regeneração (PIERIK, 1990). Yu; Meredith (1986) ressaltam que na cultura de calos é muito frequente a utilização de ápices caulinares, folhas, entrenós, cotilédones, raízes, anteras e, inclusive, tecidos altamente diferenciados, como os provenientes de frutos. Entretanto, procura-se utilizar aqueles que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que apresentem maior capacidade de expressar a totipotência (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A cultura realizada através de ápices caulinares apresenta uma grande vantagem, pois esse tipo de explante possui a presença de um tecido meristemático (não diferenciado) em constante divisão e crescimento e, portanto, altamente responsivo aos estímulos fornecidos *in vitro*, propiciando maior estabilidade genética da planta propagada (FARIA et al., 2007; GUERRA et al., 2016).

Folhas juvenis também foram utilizadas como explantes para obtenção de calos em *Annona mucosa* (BARBOZA et al., 2014) e em *Passiflora gibertii* (CARVALHO et al., 2015). Estas são mais responsivas do que as folhas velhas e a parte mediana da folha é mais prolífica do que as laterais. Por este motivo, precisam ser seccionados para que haja uma intensa proliferação celular com formação de tecidos de cicatrização e zonas de intensa atividade meristemática (SCHUCH, 2002).

Outro fator importante é a posição do explante no meio de cultura. Martins et al. (2001) expõe que explantes foliares (*Malus* sp.) com a superfície abaxial em contato com o meio de cultura proporcionaram maior intensidade de calo, independente do meio conter reguladores de crescimento.

O uso de embriões zigóticos imaturos é uma fonte de explante confiável para iniciar a cultura de calo, uma vez que o calo produzido por embriões maduros usualmente não tem potencial morfogenético (OZIAS-AKINS; VASIL, 1983). Por este motivo, a maioria dos programas de embriogênese somática tem utilizado embriões zigóticos imaturos como fonte de explante em diferentes espécies: *Coffea arábica* L. (LACERDA et al., 2015), *Elaeis guineensis* Jacq. (GOMES et al., 2016), *Jatropha curcas* L. (VASCONCELOS, 2016), *Zea mays* (SALGADO et al., 2017).

Mendanha et al. (1998) foram pioneiros no desenvolvimento de pesquisas com o cultivo *in vitro* de seringueira no Brasil. Utilizando gemas axilares e folhas como fonte de explantes, eles verificaram a proliferação calogênica satisfatória nos dois tipos de explantes, mas o desenvolvimento posterior destes calos em embrióides não ocorreu. Vale ressaltar que estes estudos utilizaram explantes oriundos de plântulas germinadas *in vitro*.

Vários tipos de explantes têm sido utilizados para a indução da embriogênese somática indireta em seringueira, ou seja, onde os explantes passam pela fase de calo. Zhou et al. (2010) desenvolveram um protocolo eficiente de micropropagação via embriogênese somática para *H. brasiliensis* através de explantes de segmentos radiculares oriundos de plântulas germinadas *in vitro*. Modeste et al. (2012) utilizaram

como fonte de explantes tegumento interno de frutos maduros e Hua et al. (2010) obtiveram calo através da cultura de anteras.

2.6 Meios de cultura

O meio de cultura é basicamente composto de sais minerais (macro e micronutrientes), nitrogênio reduzido, vitaminas, aminoácidos, carboidratos, agentes solidificantes, água e reguladores de crescimento. Estas substâncias são essenciais para o crescimento dos tecidos, controlando em grande parte o padrão de desenvolvimento *in vitro* (D'ONOFRIO; MORINI, 2006; VILLA et al., 2009).

Segundo George (2008), os meios mais utilizados no cultivo *in vitro* são o MS, desenvolvido por Murashigue e Skoog (1962), o WPM (Woody Plant Médium), formulado por Lloyd e Mc Cown (1981) e o de White (WHITE, 1943). Segundo Harry e Thorpe (1994), apesar de existir uma variedade de meios e concentrações salinas sendo testado, o meio MS continua sendo o mais empregado na micropropagação de espécies lenhosas.

Inicialmente o meio MS foi formulado para o tabaco (*Nicotiana L.*). Este possui concentrações altas de amônio, nitrato, nitrogênio e potássio (MURASHIGUE; SKOOG, 1962). A alta concentração de sais encontrada neste meio tem proporcionado ganhos significativos no crescimento *in vitro* de diversas espécies, sendo hoje o meio mais utilizado na cultura de tecidos vegetais.

A composição dos meios nutritivos tem o intuito de disponibilizar as substâncias necessárias ao crescimento e desenvolvimento *in vitro* (SILVA, 2010). O pH dos meios de cultura de células vegetais é normalmente ajustado com ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH), depois de adicionar todos os componentes, para um valor ligeiramente ácido, entre 5 e 6 (TORRES et al., 1998). Esse é um valor com alta disponibilidade de nutrientes. É importante ressaltar também que, meios geleificados com ágar, o pH deve ser ajustado preferencialmente nessa faixa, pois em pH 5,0 ocorre a hidrólise de polissacarídeos, enquanto que em pH 6,0-6,2 verifica-se a precipitação de sais (GEORGE, 1996).

O agente geleificante é fundamental no cultivo *in vitro* sobre meios nutritivos semi sólidos, considerando que estes devem ser firme suficiente para suportar as plantas, sem ser rígido demais para inibir a difusão de água e nutrientes (CID, 2001). A maioria dos trabalhos conduzidos *in vitro* utiliza como agente geleificante o ágar, este é de natureza polissacarídica, produzido por algas (*Gelidium amansii*) (CID,

2001). Um agente geleificante alternativo ao ágar é o Phytigel, um heteropolissacarídeo produzido pela bactéria *Pseudomonas elodea*. Quando comparado ao ágar, é considerado com maior grau de pureza (GEORGE, 1993), por ser isolado a partir de um único organismo, o Phytigel é altamente purificado, não contendo contaminantes (CHEVREAU et al., 1997).

Vietez e San-José (1996) ressaltam a necessidade do suprimento exógeno de reguladores de crescimento ao meio nutritivo, pois o balanço hormonal entre os níveis de citocininas e auxinas, exógenas e endógenas, propiciam maior proliferação celular.

2.7 Hormônios e reguladores de crescimento

Hormônios vegetais são compostos químicos endógenos que são conduzidos para células responsivas, atuando diretamente na expressão de muitos genes (FARIA, 2011). Quando sintéticos, são considerados reguladores de crescimento. Trata-se de substâncias exógenas aplicadas às plantas, que desempenham funções semelhantes aos hormônios vegetais, possibilitando alterar o crescimento e desenvolvimento das plantas (SILVA, 2010; SILVA, 2014).

Os reguladores de crescimento vegetal são adicionados ao meio de cultura para suprir possíveis deficiências endógenas nos explantes e induzir os processos de desdiferenciação e rediferenciação celular (LÉDO et al., 2008). Estes são utilizados em diferentes concentrações e combinações com a finalidade de garantir a produção das mudas. As combinações entre o uso de reguladores vegetais e o tipo de explante são definidas de acordo com a resposta morfogênica desejada (AOYAMA et al., 2012).

Dentre os principais reguladores de crescimento destacam-se as auxinas e as citocininas, porém, um dos fatores que mais influenciam no processo de desenvolvimento *in vitro* é a concentração utilizada (LÉDO et al., 2008). As auxinas regulam aspectos do desenvolvimento dos vegetais, incluindo o alongamento caulinar, a dominância apical e os movimentos trópicos. As mais usadas são AIA (ácido indol-3-acético), AIB (ácido indol-3-butírico), ANA (ácido naftalenoacético) e 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético). As citocininas estimulam a divisão celular, e são indispensáveis durante a fase de multiplicação. Em concentrações elevadas, induzem o crescimento de parte aérea e inibem a formação de raízes. As citocininas mais usadas são KIN (cinetina), BAP (6-benzilaminopurina), Zea (zeatina) e TDZ (thidiazuron) (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A combinação de reguladores de crescimento vegetal também pode favorecer o crescimento de calos na superfície dos explantes. Apesar de não ser uma rota preferencial, o cultivo de calos tem subsidiado estudos relacionados à embriogênese somática e a produção *in vitro* de metabólitos secundários (GONÇALVES; ROMANO, 2013). De acordo com Cangahuala-Inocente et al. (2007), o uso de auxinas, tais como, 2,4-D, picloran e dicamba, é indispensável à formação de calos, uma vez que são responsáveis pelo início da divisão celular e pelo controle dos processos de crescimento e alongamento celular, sendo eficientes para induzir a calogênese e a embriogênese.

A manipulação isolada ou combinada de reguladores de crescimento está diretamente relacionada com o sucesso do cultivo *in vitro* (VIDAL et al., 2013). Visto que, a concentração e relação auxina/citocinina são fatores determinantes na diferenciação celular e no padrão de desenvolvimento (GUEYE et al., 2009).

Altos níveis de auxina induzem a formação de raízes; enquanto altas concentrações de citocinina induzem a formação de gemas adventícias; e quando existe uma relação intermediária entre as duas, se induz o calo (SANTOS et al. 2003).

Segundo Tarrahi e Rezanejad (2013), o regulador de crescimento 2,4-D é uma importante auxina sintética, normalmente usada no meio de cultura como agente de indução de calos.

A eficiência dos explantes em gerar calos varia de espécie para espécie. Algumas são induzidas apenas com o uso do 2,4-D, outras necessitam de uma combinação de diferentes reguladores de crescimento, como: AIA e BAP; ANA e BAP; ANA e KIN (NEWMAN; KRISHNARAJ; SAXENA, 1996).

Além dos reguladores de crescimento, a aplicação de antioxidantes no meio de cultivo pode contribuir para refinar protocolos de micropropagação, pois o acúmulo de polifenóis pode prejudicar o desempenho da regeneração nos explantes cultivados *in vitro*. Os compostos antioxidantes polivinilpirrolidona (PVP) e carvão ativado atuam através da ação das enzimas fenolases que aderem a quinonas e compostos fenólicos, impedindo a expansão e controlando a oxidação pelo meio de cultivo (PASQUAL et al., 1997).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular da Embrapa Acre, em Rio Branco, Acre. Todo material vegetal de *Hevea* spp. utilizado para a realização dos experimentos foram provenientes do seringal de cultivo e do jardim clonal da Embrapa Acre.

Para realização dos experimentos utilizou-se como meio de cultura sais e vitaminas de MS (MURASHINGUE, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, e o pH ajustado em 5,8 antes da adição do agente geleificante. O agente geleificante utilizado em quase todos os experimentos foi o ágar (6 g L⁻¹), com exceção ao experimento com segmentos nodais, em que foi utilizado Phytigel (2 g L⁻¹). Após o preparo, os meios de cultura foram distribuídos em tubos de ensaio (20 x 150 mm), placas de Petri (140 x 15 mm) e frascos de vidro com capacidade de 250 mL. A esterilização do meio foi realizada em autoclave por 15 minutos a 121°C e 1,2 atm de pressão.

O processo de manipulação do material vegetal foi realizado em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar, utilizando-se pinças, bisturis e placas de Petri previamente esterilizados em autoclave.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob temperatura 25 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas, e intensidade luminosa de 30 μmol.m⁻².s⁻¹, com lâmpadas fluorescentes Philips TDL do tipo branco-frias.

3.1 Indução de calogênese em folhas de seringueira (*Hevea* spp.)

Para o estabelecimento do cultivo *in vitro*, foram utilizadas como fonte de explantes folhas jovens de seringueira recém-expandidas e não danificadas por insetos ou fungos, coletadas de árvores matrizes do clone FDR 5865.

As folhas foram coletadas e conduzidas ao laboratório, onde inicialmente foram cortadas no sentido longitudinal, em forma geométrica, com aproximadamente 1 x 1 cm, para visualização e contabilização dos calos ao final do estudo (Figura 2).

Inicialmente foi realizada uma pré-asepsia nos explantes foliares, que foram lavados em água corrente com detergente comercial neutro, durante 10 minutos, seguidos de uma tríplice lavagem em água destilada e autoclavada.

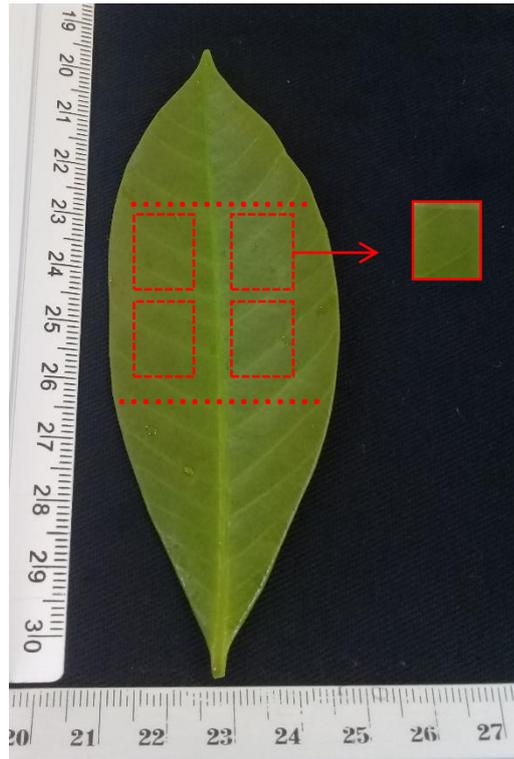


Figura 2. Foliolo de seringueira (*Hevea* spp.) indicando as regiões utilizadas como fonte de explante no cultivo *in vitro*.

Após a pré-asepsia, os explantes foram encaminhados à câmara de fluxo laminar, onde foram imersos por 1 minuto em solução de álcool etílico 70% (v/v) seguido de hipoclorito de sódio 2,5% com cinco gotas de detergente comercial neutro por 20 minutos. Em seguida, passaram por uma tríplice lavagem em água destilada e autoclavada, para eliminar o excesso de substâncias desinfestantes, e foram imersos em solução antioxidante de PVP (1 g L^{-1}), até o momento da inoculação.

Após esse processo, o material foi inoculado com a face abaxial da folha em contato com o meio de cultura em frascos com a capacidade de 250 mL contendo 30 mL de meio de cultura MS, em diferentes concentrações do regulador de crescimento 2,4-D ($0,00 \text{ mg L}^{-1}$, $0,25 \text{ mg L}^{-1}$, $0,50 \text{ mg L}^{-1}$, $1,00 \text{ mg L}^{-1}$, $2,00 \text{ mg L}^{-1}$, $4,00 \text{ mg L}^{-1}$) combinados com ANA ($1,00 \text{ mg L}^{-1}$), BAP ($1,00 \text{ mg L}^{-1}$) e PPM[®] (Plant Preservative Mixture) ($0,00 \text{ ml L}^{-1}$, $1,00 \text{ ml L}^{-1}$), um biocida de amplo espectro (Tabela 1).

Tabela 1. Tratamentos com diferentes concentrações do regulador de crescimento 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e PPM® (Plant Preservative Mixture) na indução de calos em folhas jovens de seringueira (*Hevea spp.*).

Tratamentos	Concentração de 2,4-D (mg L ⁻¹)	Concentração de PPM® (ml L ⁻¹)
T1	0,00	0,00
T2	0,25	0,00
T3	0,50	0,00
T4	1,00	0,00
T5	2,00	0,00
T6	4,00	0,00
T7	0	1,00
T8	0,25	1,00
T9	0,50	1,00
T10	1,00	1,00
T11	2,00	1,00
T12	4,00	1,00

Após a inoculação, o material foi conduzido para sala de crescimento, onde ficou na ausência de luz durante 30 dias. Após este tempo, o cultivo ficou exposto à luz por mais 30 dias. As avaliações foram realizadas após 30, 45 e 60 dias de cultivo. As variáveis estudadas foram: sobrevivência, formação de calos, oxidação fenólica, contaminações fúngicas e bacterianas.

O delineamento experimental utilizado foi fatorial com dois fatores, onde o fator A era as diferentes concentrações de 2,4-D e o fator B era as concentrações de PPM®, perfazendo 12 tratamentos e seis repetições. Cada repetição foi composta por um frasco contendo quatro explantes, totalizando 72 parcelas.

3.2. Indução da calogênese em embriões zigóticos de seringueira (*Hevea spp.*)

Frutos em fase final de maturação foram coletados de árvores matrizes do Clone Fx 2261. Os frutos tiveram suas sementes retiradas e conduzidas ao laboratório, em seguida foram lavadas em água corrente e detergente neutro durante cinco minutos, seguidos por três lavagens em água destilada e autoclavada.

Posteriormente, seus tegumentos foram retirados com o auxílio de um descascador de sementes manual. Em seguida, as amêndoas foram lavadas em água destilada e autoclavada. Com auxílio de pinça e bisturi previamente esterilizados, os embriões zigóticos foram retirados, (Figura 3), colocados em saquinhos de filtros (8 mm x14 mm x05 mm) e imersos em água destilada autoclavada.



Figura 3. Semente de seringueira (*Hevea* spp.) indicando as fases de extração do embrião zigótico (círculo em destaque) utilizado como fonte de explante no cultivo *in vitro*.

Em seguida, em câmara de fluxo laminar, os embriões foram imersos em álcool 70% (v/v) por 15 segundos, em solução de hipoclorito de sódio 1%, por 10 minutos, e então lavados por três vezes em água destilada e autoclavada, ficando por 10 minutos na última água para reidratação dos embriões zigóticos.

Utilizando-se uma tesoura esterilizada, os filtros foram abertos e os embriões foram inoculados em frascos de vidro, com a capacidade de 250 mL, contendo 30 mL de meio de cultura MS.

Foram testadas 6 diferentes concentrações do regulador de crescimento 2,4-D (0,10 mg L⁻¹, 0,25 mg L⁻¹, 0,50 mg L⁻¹, 1,00 mg L⁻¹, 2,00 mg L⁻¹) e na sua ausência, combinado com ANA (1 mg L⁻¹), conforme a Tabela 2.

Tabela 2. Tratamentos com diferentes concentrações do regulador de crescimento 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e ANA (ácido naftalenoacético) na indução de calos em embriões zigóticos de seringueira (*Hevea spp.*).

Tratamentos	Concentração de 2,4-D (mg L ⁻¹)	Concentração de ANA (mg L ⁻¹)
T1	0,00	1,00
T2	0,10	1,00
T3	0,25	1,00
T4	0,5	1,00
T5	1,00	1,00
T6	2,00	1,00

Após a inoculação, o material foi mantido em sala de crescimento, na ausência de luz, durante 30 dias. Após este período, foi exposto à luminosidade por mais 30 dias. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis tratamentos e seis repetições, sendo três explantes por parcela (frasco).

As avaliações foram realizadas a cada 15 dias após seu estabelecimento, durante 90 dias. As variáveis analisadas foram: porcentagem de sobrevivência, contaminações fúngicas e bacterianas, formação de calos, coloração e consistência dos calos (friável ou compacto).

3.3 Indução da calogênese em segmentos nodais de seringueira (*Hevea spp.*)

O material vegetativo foi coletado de árvores matrizes do Clone FDR 5865. Em laboratório, ele foi dividido em seções caulinares contendo uma gema (Figura 4). Posteriormente, foi lavado com água corrente e detergente neutro, durante 5 minutos, para lixiviação dos compostos fenólicos, e então lavados em água destilada e autoclavada por três vezes.



Figura 4. Segmentos nodais de Seringueira (*Hevea spp.*), com aproximadamente 5 mm de comprimento, com uma gema axilar, utilizado como fonte de explante no cultivo *in vitro*.

Em seguida, em câmara de fluxo laminar, onde o material foi mergulhado, por 20 minutos, em solução de desinfestação, composta pelo fungicida Amistar® (0,34 g L⁻¹) e por cloreto de benzalcônio (0,5 g L⁻¹), lavado em água destilada e autoclavada e imerso em álcool etílico 70% (v/v) por um minuto. Após este procedimento, os explantes foram mergulhados em hipoclorito de sódio 2,5% com 3 gotas de detergente 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 10 mL de meio de cultura MS, suplementado com PPM® (Plant Preservative Mixture) (3 ml L⁻¹), carvão ativado (1 g L⁻¹) e diferentes concentrações dos reguladores de crescimento 2,4-D (0,10 mg L⁻¹, 0,25 mg L⁻¹, 0,50 mg L⁻¹, 1,00 mg L⁻¹, 2,00 mg L⁻¹) e na sua ausência, combinado com ANA (1,00 mg L⁻¹), e geleificados com ágar (6 g L⁻¹) ou Phytigel (2 g L⁻¹), conforme a Tabela 3.

Tabela 3. Tratamentos com diferentes concentrações dos reguladores de crescimento 2,4 D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e ANA (ácido naftalenoacético) na indução de calos em segmentos nodais de seringueira (*Hevea spp.*).

Tratamentos	Concentração de 2,4-D (mg L ⁻¹)	Concentração de ANA (mg L ⁻¹)	Agente geleificante
T1	0,00	1,00	Agar
T2	0,10	1,00	Agar
T3	0,25	1,00	Agar
T4	0,50	1,00	Agar
T5	1,00	1,00	Agar
T6	2,00	1,00	Agar
T7	0,00	1,00	Phytigel
T8	0,10	1,00	Phytigel
T9	0,25	1,00	Phytigel
T10	0,50	1,00	Phytigel
T11	1,00	1,00	Phytigel
T12	2,00	1,00	Phytigel

Após a inoculação, foram mantidos em sala de crescimento na ausência de luz, durante 30 dias. Após este período, foram transferidos para presença de luz por mais 30 dias. O delineamento experimental foi fatorial com dois fatores, no qual o fator A

correspondia a doses de 2,4-D e o fator B, o agente geleificante, constituído de 12 tratamentos e doze repetições, com um explante por parcela. As variáveis observadas foram: porcentagem de sobrevivência, contaminações fúngicas e bacterianas, formação de calos e coloração e consistência dos calos (friável ou compacto).

3.4. Indução de calogênese em anteras de seringueira (*Hevea* spp.)

Botões florais imaturos (Figura 5.a) foram coletados de árvores matrizes do Clone IAC 35. O material coletado foi conduzido ao laboratório e posto em sacos de filtro de 8 mm x 14 mm x 0,5 mm (Figura 5.b), para melhor manuseio do material, e imersos em água destilada e autoclavada.

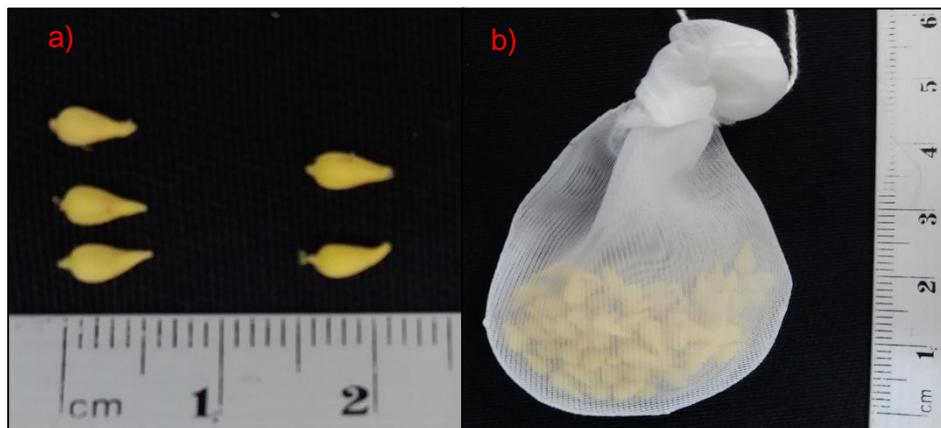


Figura 5. a) Botões florais imaturos de seringueira (*Hevea* spp.), b) Botões florais imaturos de seringueira (*Hevea* spp.) postos em sacos de filtro.

Em câmara de fluxo laminar, o material foi submetido à desinfestação com etanol 70% (v/v) por 20 segundos e hipoclorito de sódio 2% por 10 minutos. Após 4 lavagens em solução estéril de PVP (1 g L⁻¹), os botões florais foram retirados do filtro e, com o uso de um estereomicroscópio, iniciou-se o processo de extração das anteras, por meio de uma incisão em um dos lados dos botões.

As anteras extraídas (Figura 6) foram postas em placa de Petri contendo solução estéril de PVP (1 g L⁻¹) e posteriormente inoculadas em placas de Petri (90x 15 mm) preenchidas com 40 mL de meio de cultura MS, suplementado com PPM[®] (Plant Preservative Mixture) (3 mL L⁻¹) e diferentes concentrações dos reguladores de crescimento, 2,4-D, KIN e de ANA, conforme a Tabela 4.

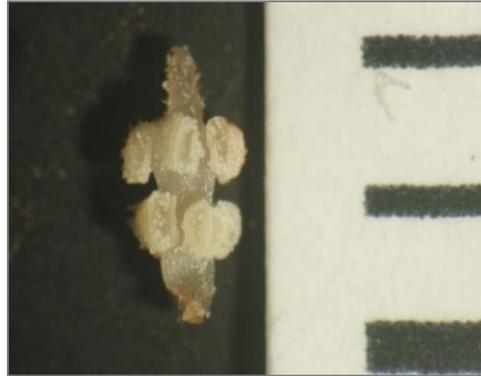


Figura 6. Anteras de seringueira (*Hevea* spp.), com aproximadamente 2 mm de comprimento, utilizadas como fonte de explante no cultivo *in vitro*.

Tabela 4. Tratamentos com diferentes concentrações dos reguladores de crescimento 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), KIN (cinetina) e ANA (ácido naftalenoacético) na indução de calos em anteras de seringueira (*Hevea* spp.).

Tratamentos	Concentração de 2,4-D (mg L ⁻¹)	Concentração de KIN (mg L ⁻¹)	Concentração de ANA (mg L ⁻¹)
T1	0,00	0,00	0,00
T2	1,00	1,00	1,00
T3	1,00	0,00	1,00
T4	0,00	1,00	1,00
T5	1,00	1,00	0,00
T6	1,50	1,50	1,50
T7	1,50	0,00	1,50
T8	0,00	1,50	1,50
T9	1,50	1,50	0,00

Após a inoculação, o material foi conduzido à sala de crescimento, onde ficou na ausência de luz durante 30 dias. Após este período, o cultivo ficou exposto à luminosidade por mais 30 dias. As avaliações foram realizadas após 30 e 60 dias de cultivo.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 9 tratamentos, constituído de cinco repetições, cada repetição consistiu em uma placa de Petri contendo 5 anteras. As variáveis analisadas foram: porcentagem de sobrevivência, oxidação, contaminações fúngicas e bacterianas, formação de calos e coloração e consistência dos calos (friável ou compacto).

3.5. Indução da calogênese em diferentes fontes de explantes oriundas de plântulas de seringueira (*Hevea spp.*) germinadas *ex vitro*

Sementes de seringueira foram coletadas de árvores matrizes do Clone IAC 35. As sementes foram conduzidas para o laboratório, onde foram lavadas com detergente em água corrente. Na sequência foi efetuada a remoção do tegumento das sementes com o auxílio de um descascador de sementes manual, seguido de três enxágues das sementes em água destilada e esterilizada.

Para a cultura de plântulas utilizou-se 300 frascos de vidro com capacidade de 250 ml, contendo algodão umedecido em água, ambos esterilizados em autoclave a 121° C e 1,2 atm de pressão, por 15 minutos. Foram selecionadas 300 sementes, onde cada uma foi colocada dentro de um frasco de vidro (Figura 7). As culturas foram mantidas sob temperatura de 27 a 30°C, estas eram regadas por pulverização manual uma vez por dia e o crescimento e o desenvolvimento das plântulas foram acompanhados diariamente.



Figura 7. Sementes de seringueira (*Hevea spp.*) com seus tegumentos removidos e postos em frascos de vidro para germinação *ex vitro* em laboratório.

Após 15 dias de germinação, foi realizado o corte dos explantes sendo selecionadas 180 plântulas vigorosas, todas no mesmo estágio de crescimento. Cada plântula foi segmentada em diferentes fontes de explantes: folha, pecíolo, gema apical, caule, intertegumento e raiz. Depois de segmentadas e separadas (Figura 8), as fontes de explantes foram lavadas com água corrente e detergente por 10 minutos e então lavadas em água destilada e autoclavada por três vezes.

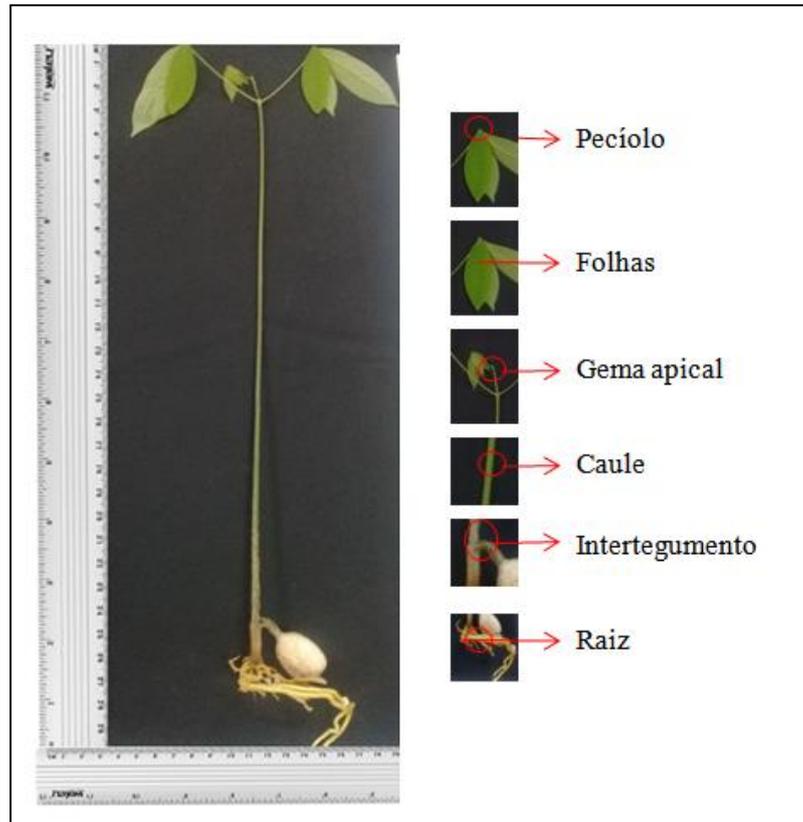


Figura 8. Plântula de seringueira (*Hevea* spp.), após 15 dias de germinação, utilizada como fonte de explantes no cultivo *in vitro*.

Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram imersos em solução álcool etílico 70% (v/v) por um minuto, seguido de hipoclorito de sódio 2,5% com algumas gotas de detergente por 5 minutos para explantes foliares, e 15 minutos para as demais fontes de explantes, seguidos de três lavagens em água destilada e autoclavada.

Os diferentes tipos de explantes (folhas, pecíolos, gema apical, caule, intertegumento e raiz) foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura cultura MS₁ e MS₂, suplementado com PPM[®] (Plant Preservative Mixture) (3 mL L⁻¹) e diferentes combinações dos reguladores de crescimento 2,4-D (2 mg L⁻¹), L-Cisteína (125 mg L⁻¹) com BAP (1 mg L⁻¹, 2 mg L⁻¹), conforme as tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Diferentes meios de cultura utilizados para indução da calogênese em diferentes fontes de explantes oriundas de plântulas de seringueira (*Hevea* spp.) germinadas em laboratório.

MEIO	Concentração de 2,4-D (mg L ⁻¹)	Concentração de L-Cisteína (mg L ⁻¹)	Concentração de BAP (mg L ⁻¹)
MS ₁	2,00	125	1,00
MS ₂	2,00	125	2,00

Tabela 6. Tratamentos utilizados para as diferentes fontes de explante de seringueira (*Hevea* spp.) na indução da calogênese.

Tratamentos	Meio	Explante
T1	MS ₁	Folha
T2	MS ₂	Folha
T3	MS ₁	Pecíolo
T4	MS ₂	Pecíolo
T5	MS ₁	Gema apical
T6	MS ₂	Gema apical
T7	MS ₁	Caule
T8	MS ₂	Caule
T9	MS ₁	Intertegumento
T10	MS ₂	Intertegumento
T11	MS ₁	Raiz
T12	MS ₂	Raiz

Após a inoculação, foram mantidos em sala de crescimento, na ausência de luz durante 30 dias, após este período, foram transferidos para presença de luz, por mais 30 dias. As avaliações foram realizadas a cada 30 dias após seu estabelecimento, durante 90 dias.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, fatorial 2X6 (dois tipos de meio e seis fontes de explantes), com quinze repetições, totalizando 180 parcelas, com um explante por parcela. As variáveis analisadas foram: porcentagem de sobrevivência, oxidação, contaminações fúngicas e bacterianas, formação de calos e coloração e consistência dos calos (friável ou compacto).

3.6. Análises Estatísticas

Após testar a normalidade dos erros por meio do teste Kolmogorov–Smirnov, e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett, as variáveis foram transformadas, sempre que necessário, pela função: raiz de $x + 0,5$, sendo x o valor observado. As variáveis foram submetidas à análise de variância e, quando o valor de F foi significativo, utilizou-se a comparação das médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro para tratamentos qualitativos. Já para os tratamentos

quantitativos, foi realizada análise de regressão polinomial ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Foi utilizado o pacote estatístico Sisvar (Sistema para Análise de Variância) para Windows® versão 5.1 (FERREIRA, 2014). A precisão dos ensaios foi estimada pelo índice de variação (IV), calculado por $CV \sqrt{N}$, em que o IV é igual ao coeficiente de variação (CV) dividido pela raiz quadrada do número de repetições (N) (PIMENTEL-GOMES, 2009). Os gráficos foram elaborados no Microsoft Office Excel. O cálculo da máxima eficiência técnica (MET) (valor de X da variável independente para o qual Y (variável dependente) é máximo) para cada variável foi realizado de acordo com metodologia descrita em Storck et al. (2000), por meio da seguinte fórmula: $X = -b_1 / 2b_2$, em que: X = ponto da máxima eficiência técnica; b1 e b2 = coeficientes da equação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Indução de calogênese em folhas de seringueira (*Hevea spp.*)

Após 60 dias de incubação em sala de crescimento, verificou-se que para a variável sobrevivência, houve efeito significativo apenas para o fator B (concentrações de PPM®), onde a média de sobrevivência na presença desta substância foi de 93,05% (Tabela 7). O fator A, que corresponde a diferentes concentrações de 2,4-D, não teve efeito significativo, assim como a interação entre estes dois fatores.

Tabela 7. Porcentagem de sobrevivência de explantes foliares de seringueira (*Hevea spp.*) em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.

Tratamento	Sobrevivência
	Média
2,4-D*	72,91 ^b
2,4-D + PPM**	93,05 ^a
CV (%)	16,44

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. * Auxina: 2,4-D - Ácido 2,4-diclorofenoxiacético **Biocida: PPM® - Plant Preservative Mixture.

Avaliando a oxidação fenólica, após 15 dias de estabelecimento do cultivo *in vitro*, observou-se o escurecimento dos explantes (Figura 9) em todos os tratamentos avaliados.

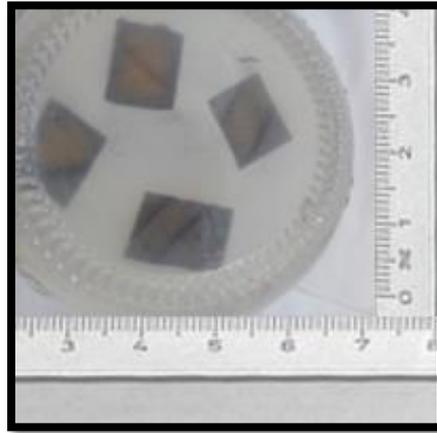


Figura 9. Oxidação fenólica em explante foliar de seringueira (*Hevea* spp.), em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.

As análises demonstraram que para essa variável houve efeito significativo apenas para o fator B (uso do PPM[®]), onde a média de oxidação foi de 93,05% na presença dessa substância. O fator A (concentrações de 2,4-D) não teve efeito significativo, assim como a interação entre estes dois fatores. Mesmo não havendo diferença estatística significativa entre eles, conforme pode ser observado na Figura 10, verificou-se que o uso do PPM[®] proporcionou uma maior porcentagem de oxidação fenólica.

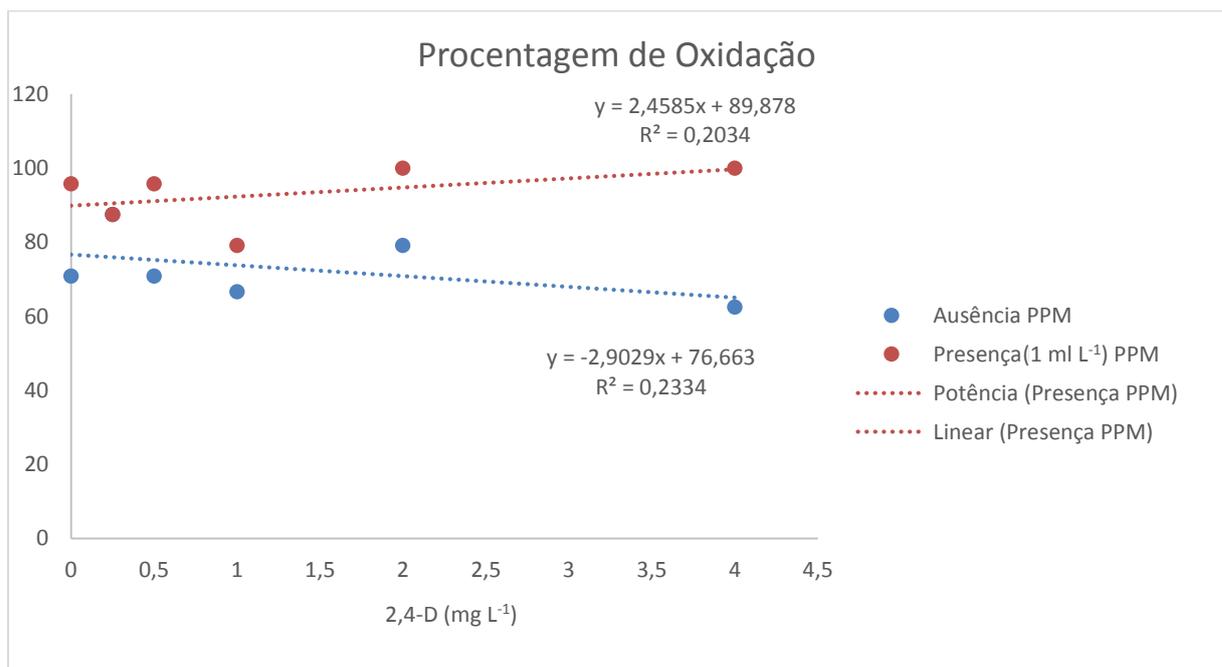


Figura 10. Porcentagem de oxidação fenólica em explantes foliares de seringueira (*Hevea* spp.), em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.

A oxidação é um dos mais frequentes problemas enfrentados, especialmente na fase de estabelecimento do cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. Isso ocorre após o ferimento do tecido, em função da ação de enzimas polifenases com os compostos fenólicos, resultando na formação de quinonas (substância fitotóxica). Estas podem inibir o crescimento celular ou até mesmo causar a morte do tecido. Tal problema pode ser reduzido com o uso de antioxidantes ou de adsorventes destas substâncias liberadas (SATO et al., 2001; AZOFEIFA, 2009).

Avaliando as contaminações fúngicas e bacterianas, as análises estatísticas demonstraram efeito significativo apenas para o fator B, ou seja, a presença de 1 ml L⁻¹ de PPM[®] no meio nutritivo reduziu a taxa de contaminação em todo o experimento, conforme pode ser observado na Figura 11. O fator A (concentrações de 2,4-D) não apresentou efeito estatístico significativo, assim como a interação entre estes dois fatores. Mesmo não havendo diferença estatística significativa entre eles, o procedimento de desinfestação empregado durante a fase de manipulação dos explantes, aliado ao uso do PPM[®], mostrou-se eficiente na redução das contaminações, apresentando baixo índice de contaminação fúngica de 23,61% (dados não apresentados) e ausência de contaminação bacteriana (Figura 11).

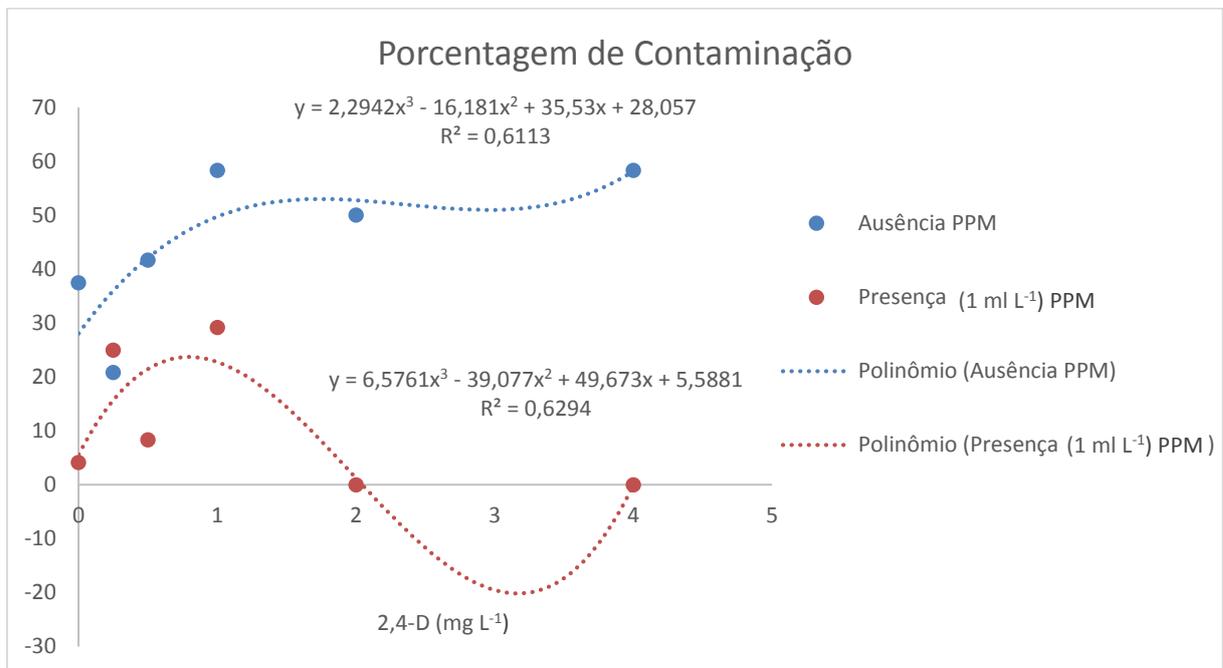


Figura 11. Porcentagem de contaminação em explantes foliares de seringueira (*Hevea* spp.) em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.

Para se obter maior êxito no estabelecimento de condições *in vitro* de *Hevea spp.* por meio de explantes foliares, outros tratamentos assépticos deverão ser testados, aliados ao uso do PPM[®], a fim de controlar a contaminação fúngica.

Contaminações são obstáculos à cultura de tecidos de espécies lenhosas, merecendo atenção especial. É importante destacar que muitos contaminantes apareceram após algumas semanas de cultivo, o que indica a possível presença de microrganismos endofíticos nos tecidos (MROGINSKI et al., 1999; PALU et al., 2011). Para contornar esse problema, têm-se utilizado o Plant Preservative Mixture[®] (PPM), um biocida sintético que contém ingredientes ativos que penetram na parede celular de fungos e bactérias, inibindo a atividade de enzimas chaves do metabolismo de ciclos centrais, como a do ácido cítrico e a cadeia transportadora de elétrons, e com isso consegue neutralizar e impedir o crescimento destes micro-organismos (PLANT CELL TECHNOLOGY, 2015).

O PPM[®] é uma substância relativamente nova, o seu uso tem sido satisfatório na eliminação de contaminantes em várias espécies na cultura de tecidos vegetais. Em *Pongamia pinnata*, o estabelecimento de culturas assépticas é limitado pelas contaminações microbianas. Nesta espécie, só é possível estabelecer culturas assépticas com o uso do PPM[®] e Cefotaxima (SUJATHA; HAZRA, 2007).

Compton e Koch (2001), estudando o efeito de diferentes dosagens dessa substância na organogênese *in vitro* de melão (*Cucumis melo* L.), petúnia (*Petunia* Juss) e tabaco (*Nicotiniana* L.), verificaram que, dependendo da espécie, as diferentes dosagens do biocida podem ou não afetar a regeneração *in vitro*, ou seja, cada espécie terá uma resposta morfogenética diferente. No presente estudo foi utilizada uma dosagem constante deste biocida (1 ml L⁻¹), são necessárias outras pesquisas com dosagens mais baixas pra verificar o efeito dessa substância sobre o estabelecimento de condições *in vitro*, em explantes foliares de *Hevea spp.*

Com relação à formação calogênica, observou-se diferença significativa para esta variável entre os tratamentos empregados. A indução de calo ocorreu em apenas um explante, iniciando sua formação após 30 dias de cultivo. Apesar da baixa frequência de resposta, o tratamento contendo 1 mg L⁻¹ de 2,4-D e 1 ml L⁻¹ de PPM[®] formou um calo, que apresentou consistência compacta e coloração branca (Figura 12).

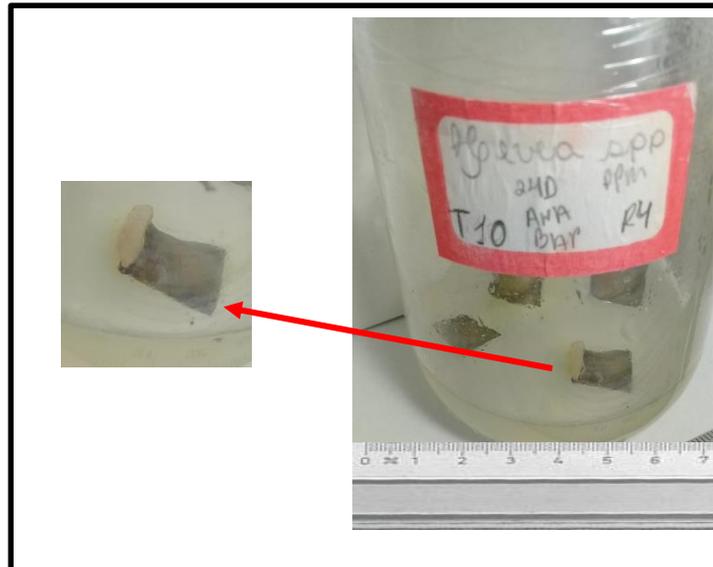


Figura 12. Formação de calo a partir de explante foliar de seringueira (*Hevea* spp.) após 60 dias de incubação em meio de cultura MS suplementado com 1 mg L^{-1} de 2,4-D e 1 ml L^{-1} de PPM.

Após 60 dias de cultivo, o calo foi transferido para o meio de cultivo MS de mesma formulação de origem, a fim de promover continuidade em seu desenvolvimento. Porém, este oxidou e morreu após 90 dias de cultivo (Figura 13).

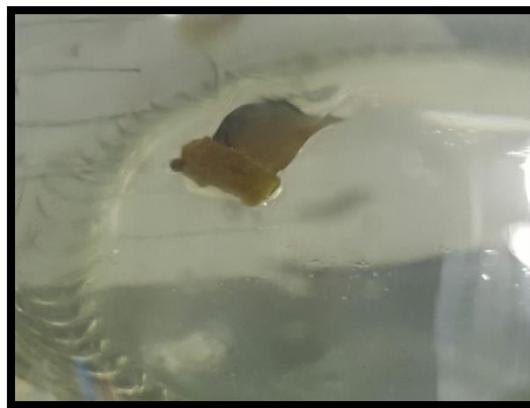


Figura 13. Explante foliar de seringueira (*Hevea* spp.) com a presença de calo oxidado, após 90 dias de incubação em meio de cultura MS.

Martins et al. (2001) relatam que a intensidade de calo é maior quando utilizada a superfície abaxial do disco foliar. Ferradine et al. (1996) utilizaram o mesmo tipo de explante e obtiveram bons resultados na calogênese de macieira M.26 (*Malus* sp.). Bartish e Korkoroi (1997) relataram que o uso da superfície abaxial da folha em contato com o meio foi mais efetivo na formação de brotos em *Malus* sp.

O uso da auxina ácido 2,4-D associado a outros reguladores de crescimento vegetal, como ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenoacético (ANA), cinetina (KIN) e benzilaminopurina (BAP), em explantes

foliares e gemas axilares, foi eficiente na formação de calos em *Hevea brasiliensis*, apesar da não regeneração destes em de embriões somáticos (MENDANHA et al., 1998).

Segundo Torres e Caldas (1990), concentrações elevadas de auxinas podem inibir, dependendo da espécie, a formação de calos friáveis em tecidos foliares. Por outro lado, Werner et al. (2007) utilizaram folíolos de *Caesalpinia echinata* e observaram resultados positivos quanto à formação de calos, quando usadas altas concentrações da auxina 2,4-D (5, 10, 20, 50 e 100 mg L⁻¹). Esses resultados apontam que concentrações maiores podem ser usadas para a indução da calogênese. As auxinas são capazes de iniciar a divisão celular e controlar os processos de crescimento e alongamento celular. O 2,4-D tem efeito no metabolismo do RNA, induzindo a transcrição de RNAs mensageiros capazes de decodificar proteínas para o crescimento, e podem induzir a proliferação celular desordenada (GEORGE, 1996).

Para a espécie estudada, infere-se que o uso de altas concentrações do 2,4-D não favoreceu a formação de calos. Contudo, estudos relatam que apesar do 2,4-D ser a auxina sintética mais comumente utilizada para a indução de calos, em explantes foliares tem sido reportado sua atividade fitotóxica (COSTA et al., 2008).

Corroborando esta afirmação, o uso de 2,4-D em explantes foliares de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) não foi efetivo para a calogênese e apresentou efeito tóxico sobre o explante (COSTA et al., 2008). E ainda, Albino et al. (2010) verificaram que o uso do 2,4-D promoveu a calogênese em explantes foliares de insulina vegetal (*Cissus sicyoides*) após 45 dias, porém após este tempo os explantes começaram a necrosar e morreram.

De acordo com Preece (2008), o desenvolvimento de calo pode ser independente de auxinas e citocininas, dependente de auxinas, dependente de citocininas ou dependente de ambas. Algumas espécies são induzidas apenas com 2,4-D, enquanto outras necessitam da combinação de diferentes fitoreguladores, como ácido indolacético (AIA), 6-benzilaminopurina (6-BAP) e ácido naftalenoacético (ANA) (NEWMAN et al., 1996).

No caso da espécie estudada, provavelmente a indução de calo pode ser dependente de um balanço hormonal intermediário de auxinas e citocininas. Assim, infere-se que as diferentes concentrações do regulador de crescimento 2,4-D (0,1 mg L⁻¹, 0,25 mg L⁻¹, 0,5 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹, 2 mg L⁻¹), combinados com ANA (1 mg L⁻¹) e BAP (1 mg L⁻¹), testadas no meio de cultura não foi suficiente para balancear o

conteúdo endógeno de citocinina/auxina do explante, interferindo na formação de massa calogênica. Este fato provavelmente explica o baixo índice de formação de calos ao final do experimento. O presente resultado corrobora com o estudo de Londe (2005), o qual descreve que a auxina 2,4-D testada em explantes de cajuí (*Anacardium humile* A. St.-Hil.) não promoveu efeito significativo na formação de calos.

4.2. Indução da calogênese em embriões zigóticos de seringueira (*Hevea* spp.)

No presente estudo, o processo de desdiferenciação e indução de calos em embriões zigóticos de *Hevea* spp. se iniciou após 15 dias de cultivo, com o intumescimento dos embriões e a formação de 29,5% de calos em meio nutritivo. Passados 90 dias de estabelecimento, não foram observadas oxidações e nem contaminações, sendo estas umas dos principais obstáculos ao cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. Em consequência disto, a média de sobrevivência dos embriões cultivados foi de 74% (Tabela 8). Ao final do experimento, todos os tratamentos empregados promoveram a formação de calos nos explantes em média de 38%, não sendo observadas diferenças estatísticas entre eles (Tabela 8).

Tabela 8. Porcentagem de sobrevivência e formação de calos em embriões zigóticos de seringueira (*Hevea* spp.), em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.

Tratamento	Sobrevivência	Calos
	Média	Média
T1	83 ^a	22 ^a
T2	66 ^a	38 ^a
T3	61 ^a	44 ^a
T4	78 ^a	44 ^a
T5	83 ^a	55 ^a
T6	72 ^a	27 ^a
Média geral (%)	74	38

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Apesar de não ocorrerem diferenças significativas entre os tratamentos utilizados, pode-se dizer que o tratamento contendo 1 mg L⁻¹ de 2,4-D combinado com 1 mg L⁻¹ de ANA (T5) possibilitou melhores resultados tanto para sobrevivência (83%)

dos explantes quanto para formação de calo (55%), conforme pode ser observado na Figura 14.

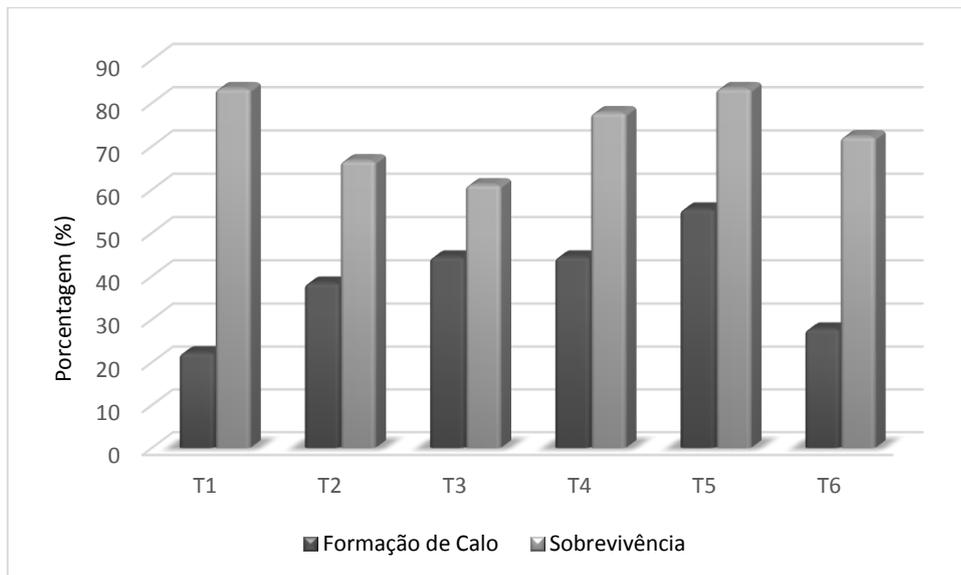


Figura 14. Porcentagem de sobrevivência e formação de calos em embriões zigóticos de seringueira (*Hevea* spp.), em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.

O processo de desdiferenciação ocorreu a partir da região proximal dos embriões zigóticos, mediante a ruptura e posterior formação de calos primários de coloração marrom claro, e que apresentaram consistência compacta e características não embriogênicas (Figura 15).



Figura 15. Embrião zigótico de seringueira (*Hevea* spp.) após 90 dias de incubação em meio de cultura MS suplementado com 1 mg L^{-1} de 2,4-D (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético) combinado com 1 mg L^{-1} de ANA (Ácido Naftalenoacético), com a formação de calo compacto de cor marrom claro.

A utilização de embriões zigóticos como explante apresenta vantagens. 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). Por este motivo, 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 arabica* L. (LACERDA et al., 2015), *Elaeis guineensis* Jacq. (GOMES et al., 2016), *Jatropha curcas* L. (VASCONCELOS, 2016), *Zea mays* (SALGADO et al., 2017). Zhou et al. (2010) desenvolveram um protocolo eficiente de micropropagação via embriogênese somática para *H. brasiliensis* através de explantes de segmentos radiculares oriundos de plântulas germinadas *in vitro*.

Embriões zigóticos são excelentes explantes para propagação clonal *in vitro*, por sua natureza juvenil e seu alto potencial regenerativo, o seu emprego pode contribuir para superação de barreiras genéticas à germinação, produção de plantas assépticas, elucidação de aspectos inerentes à nutrição. Rekha et al. (2014) relataram o desenvolvimento de plantas transgênicas para a proteína osmotina, que confere tolerância aos estresses abióticos, como a seca e frio em *Hevea brasiliensis*. Para realizar a transgenia foi necessário a obtenção de calos embriogênicos obtidos de embriões imaturos que cresceram em meio MS contendo AG³ (3 mg.L⁻¹), Kin (3 mg L⁻¹) e Zeatina (0,4 mg L⁻¹).

Estudos realizados com indução de calos reportam o intumescimento e aumento do volume dos embriões zigóticos a partir de quatro semanas de cultivo, conforme observado por Silva et al. (2010) para *Elaeis guineensis* (dendzeiro) e por Padilha (2013) em *Acrocomia aculeata*. Ainda, Luis e Scherwinski-Pereira (2014) afirmam que durante a indução de embriogênese somática em *Acrocomia aculeata* os embriões zigóticos cultivados em meio adicionado de Picloram mostraram crescimento duas vezes maior, com a dilatação, seguida de formação de calos primários.

A dilatação da região proximal e distal do embrião zigótico é importante e comumente observada no processo de indução de embriogênese somática, pois o intumescimento do explante apresenta um papel fundamental para a divisão celular, além de resultar na formação dos calos embriogênicos (BENKIRANE et al., 2000).

A formação de calos primários depende da espécie estudada. PEREIRA et al. (2004) verificou 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 primários foi constatada após 15 dias de cultivo.

Segundo Fernando et al. (2001), o início do processo de alteração dos embriões zigóticos para calos primários se dá por meio de divisões celulares que ocorrem geralmente em células meristemáticas, por serem multipotentes e potencialmente originarem outras células embriogênicas, como observado nos estudos em *Bactris gasipaes*, *Mendicago trunulata* e *Capsicum chinense*, respectivamente (ALMEIDA et al., 2012; WANG et al., 2011; SANTANA-BUZZY et al., 2009). O grande problema envolvido na produção de embriões somáticos passando pela fase de calos pode levar a ocorrência de variações somaclonais, por se tratar de uma condição de múltiplas divisões (GHANTI et al., 2010).

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). Apesar da baixa frequência de resposta à indução de calos em embriões zigóticos (38%) no presente estudo, outras combinações ou outros tipos de fitorreguladores precisam ser testados, aliados ao 2,4-D combinado com ANA, a fim de induzir calos friáveis e embriogênicos nesta espécie.

4.3 Indução da calogênese em segmentos nodais de seringueira (*Hevea spp.*).

Durante o período observado (90 dias), verificou-se uma baixa taxa de sobrevivências dos explantes em todos os tratamentos, com uma média de apenas 5,55% de explantes vivos. Porém, houve efeito significativo na interação entre os dois agentes geleificantes testados ($p < 0,05$), no tratamento utilizando $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D, conforme pode ser observado na Tabela 9.

Tabela 9. Porcentagem de sobrevivência em segmentos nodais de seringueira (*Hevea* spp.), em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.

2,4-D* (mg L ⁻¹)	Agente Geleificante	
	Ágar	Phytigel
0	08,33 ^a	0 ^a
0,1	25,00 ^a	0 ^b
0,25	0 ^a	08,33 ^a
0,5	08,33 ^a	0 ^a
1	0 ^a	16,66 ^a
2	0 ^a	0 ^a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. * Auxina: 2,4-D - Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

O agente geleificante é fundamental no cultivo *in vitro* sobre meios nutritivos semi sólidos, considerando que estes devem ser firmes o suficiente para suportar as plantas, sem ser rígido demais para inibir a difusão de água e nutrientes (CID, 2001). A maioria dos trabalhos conduzidos *in vitro* utiliza como o geleificante o ágar, agente de natureza polissacarídica produzido por algas (*Gelidium amansii*) (CID, 2001). Um geleificante alternativo ao ágar é o Phytigel, um hetero polissacarídeo produzido pela bactéria *Pseudomonas elodea*. Quando comparado com o ágar é considerado com maior grau de pureza (GEORGE, 1993), por ser isolado a partir de um único organismo, o Phytigel é altamente purificado não contendo contaminantes (CHEVREAU et al., 1997).

A preferência por um ou outro agente de solidificação depende da espécie e das condições de cultivo. Williams e Taji (1987) encontraram maior percentagem de sobrevivência no solidificante Phytigel[®] do que no ágar, em culturas de várias espécies lenhosas, como o *Eucalyptus grandis*, por exemplo. Burgos e Aburquerque (2003) ressaltam que a resposta das plantas aos agentes geleificantes pode variar de acordo com a espécie vegetal ou mesmo entre genótipos de uma mesma espécie.

Carvalho et al. (2004) testaram os agentes solidificantes ágar (6 g.L⁻¹) e Phytigel[®] (2 g.L⁻¹) no estabelecimento *in vitro* do caqui (*Diospyros kaki*, L.) e recomendaram o ágar como o melhor agente solidificante para o meio de cultivo deste gênero, resultando em maior número de brotos regenerados.

Em estudos realizados por Minamiguchi (2013), avaliando diferentes agentes geleificantes no cultivo *in vitro* de micropropágulos de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.), verificou-se que não houve diferença significativa entre os agentes geleificantes Phytigel[®] e ágar para essa espécie.

Durante o procedimento de cortes dos seguimentos nodais de seringueira para posterior desinfestação, observou-se o exsudado de látex, característico da espécie, no material vegetativo. Essas 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, a qual está relacionada à formação de compostos fenólicos (TAIZ; ZEIGER, 2004); 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 (1 g L^{-1}), adicionado ao meio de cultura, o qual não foi eficiente, pois cerca de 74,3% de todo o experimento apresentou oxidação fenólica, proporcionando efeito significativo estatisticamente ($p < 0,05$) (Figura 16).

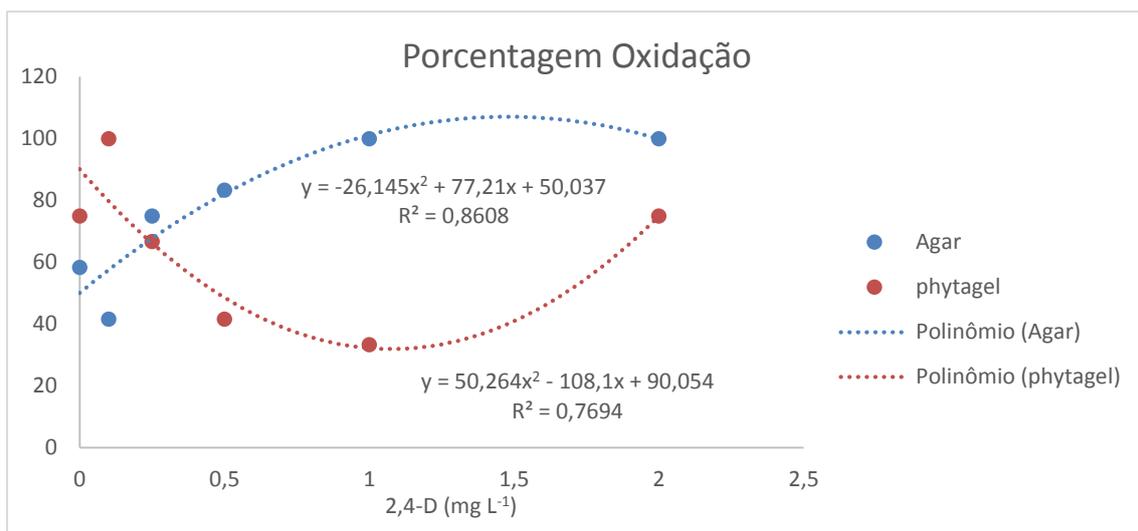


Figura 16. Porcentagem de oxidação em segmentos nodais de seringueira (*Hevea spp.*) após 90 dias de incubação em meio de cultura MS, em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.

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). Os antioxidantes químicos mais utilizados são carvão ativado, ácido ascórbico e PVP (GEORGE, 1996). Para Ledo et al. (2002), além de ferimentos e outros fatores inerentes ao explante, a oxidação pode ser provocada pelos próprios reguladores de crescimento, e no caso da espécie estudada, a exsudação do látex pode ter influenciado nesse processo.

De forma geral, as oxidações não inviabilizam o desenvolvimento dos calos, 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 de estabelecimento deste cultivo, os explantes estavam oxidados, iniciando o processo de necrose (Figura17), onde cerca de 52% de todos explantes necrosaram ao final do 90 dias de observação. A análise deste resultado mostrou efeito significativo estatisticamente (Figura 18).



Figura 17. Segmentos nodais de seringueira (*Hevea* spp.) após 60 dias de incubação em meio de cultura Ms, em processo de oxidação e necrose.

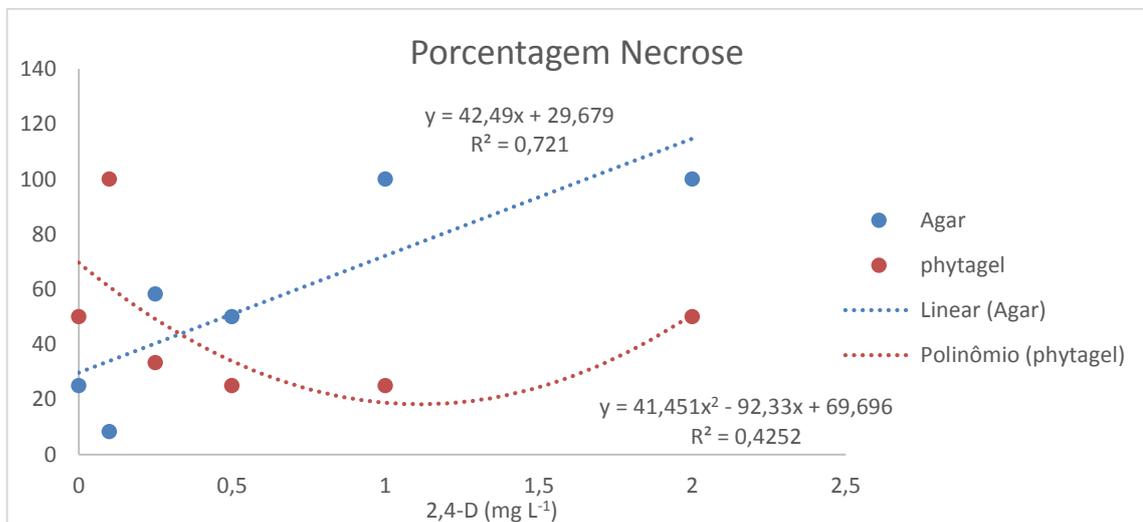


Figura 18. Porcentagem de necrose em segmentos nodais de seringueira (*Hevea* spp.) após 90 dias de incubação em meio de cultura Ms, em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.

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). Caso semelhante foi observado por Biasi et al. (1994), que ao trabalhar com a propagação

de abacateiro *in vitro*, relataram que os antioxidantes (ácido ascórbico ou ácido cítrico nas concentrações de 100 e 200 mg L⁻¹) não foram eficientes para essa cultura. Necrose e oxidação dos explantes costumam ser relatadas como um dos aspectos mais importantes relacionados com a cultura de tecidos de algumas espécies de plantas, em especial as espécies lenhosas.

Xavier et al. (2009) apontaram as contaminações e a oxidação fenólica como 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.) alcançaram 9,7% para contaminação fúngica, e 84,02 % para contaminação bacteriana (Figura 19). Deste modo, a análise realizada para contaminações apresentou efeito significativo apenas para contaminação bacteriana (Figura 20).

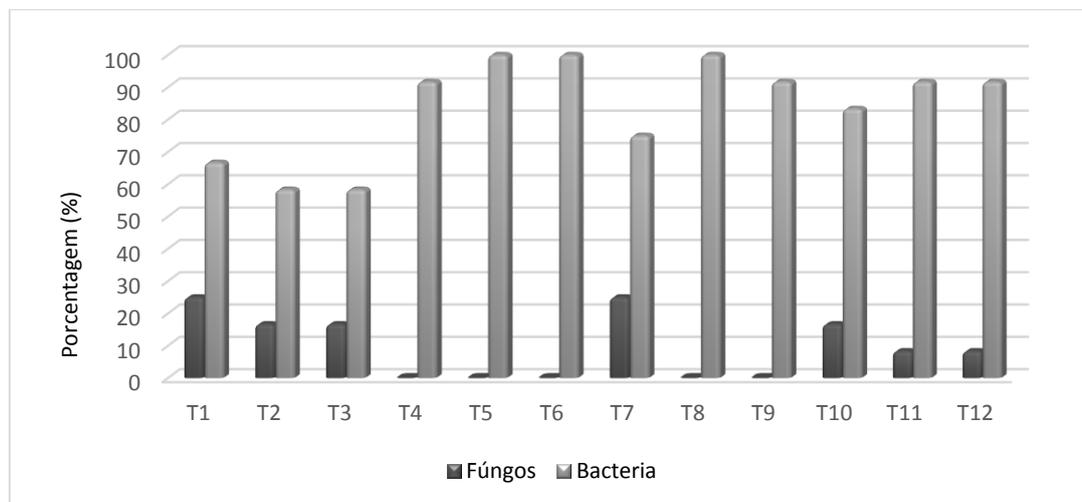


Figura 19. Porcentagem de contaminação fúngica e bacteriana em segmentos nodais de seringueira (*Hevea* spp.), em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.

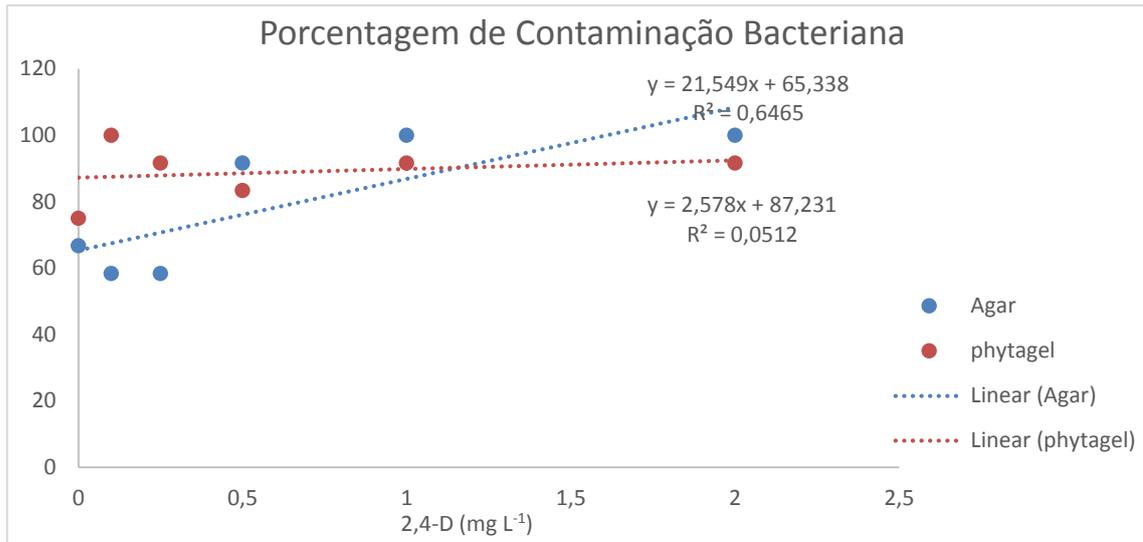


Figura 20. Porcentagem de contaminação bacteriana em segmentos nodais de seringueira (*Hevea* spp.), em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.

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 do campo. Niedz 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 jovem como fonte de explante, em virtude do baixo nível de contaminação e do elevado potencial morfogênico (BARCELÓ-MUÑOZ et al., 1999).

No presente trabalho observa-se que 8 explantes sadios foram obtidos ao final deste experimento, provavelmente este fator pode ter influenciado ao não aparecimento de calos. 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 sadios.

Para Wang et al. (2006), 2,4-D costuma ser a auxina mais eficiente na formação de calos em diferentes tipos de explantes cultivados *in vitro*. Apesar de bastante citado na literatura, devido aos seus efeitos benéficos na indução de calos para diversas espécies de plantas como *Byrsonima intermedia* Juss. (NOGUEIRA et al., 2007), *Cecropia glaziovii* (ALVES, 2010), *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg (SILVA, 2016).

4.4. Indução de calogênese em anteras de seringueira (*Hevea* spp.)

Para este experimento não foi observado respostas em nenhum dos tratamentos, todos os explantes oxidaram nos primeiros 15 dias de estabelecimento do cultivo *in vitro*, e após 45 dias esta oxidação causou a morte de 100% dos explantes (Figura 21), não sendo possível a indução de calos e, conseqüentemente, fazer a análise estatística.

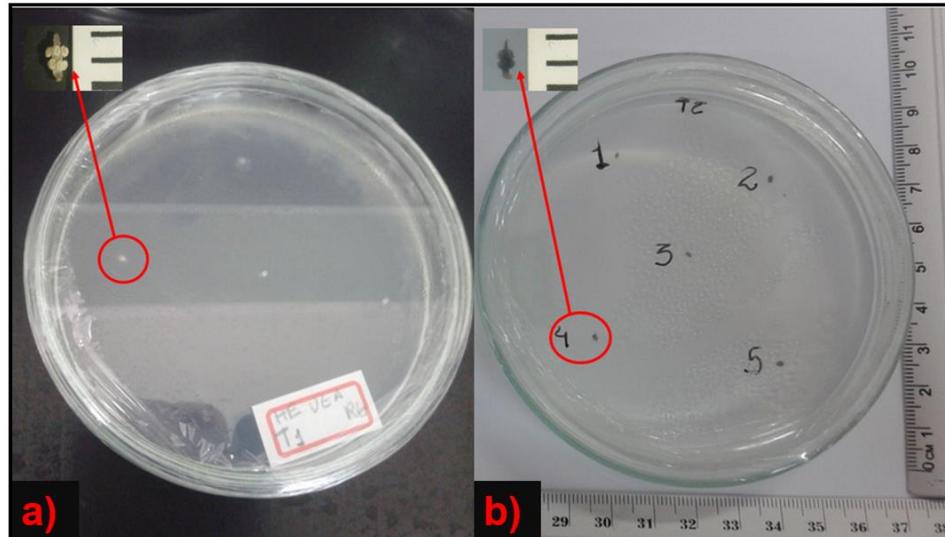


Figura 21. a) Antera de seringueira (*Hevea* spp.) recém extraída e estabelecida no cultivo *in vitro*. b) Antera de seringueira (*Hevea* spp.) após 45 dias de cultivo *in vitro*, apresentando oxidação e morte dos explantes.

Aos 30 dias de cultivo não ocorreu formação de calos neste experimento. Além disso, houve, no decorrer do tempo, a perda de coloração dos explantes e o seu escurecimento, indicando a oxidação dos mesmos. É possível deduzir que o procedimento asséptico empregado neste experimento, apesar de ter sido eficiente para o controle das contaminações, promoveu a oxidação dos explantes, interferindo assim no processo de calogênese e levando-os à morte.

O sucesso da técnica de micropropagação tem como ponto de partida a recomendação de um protocolo de assepsia (eficiente) e o estabelecimento *in vitro* com um maior número de explantes assépticos, menor produção de compostos fenólicos (oxidação) e maior sobrevivência dos explantes para as etapas seguintes. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), o estabelecimento de uma cultura asséptica é a fase mais crítica da micropropagação.

O problema de oxidação fenólica é comum em espécies lenhosas e pode ser reduzido com o uso de antioxidantes, adsorventes destas substâncias liberadas ou com a substituição do agente desinfetante. Em algumas espécies, este agente é

responsável por majorar o problema de escurecimento do tecido. Este é o caso de explantes de *Syzygium cuminii* (YADAV et al., 1990) e de *Anacardium occidentale* (JHA e DAS, 2004; ALIYU, 2005). Quando a participação do agente desinfetante no problema de oxidação é evidente, outros agentes devem ser testados. Assim, Seneviratne e Wijesekara (1996), que trabalharam com surtos de *Hevea brasiliensis* para o seu estabelecimento *in vitro*, descobriram que a desinfecção dos explantes com hipoclorito de sódio (NaOCl), em diferentes concentrações, promoveu escurecimento de tecidos e a exsudação de fenóis. Por sua vez, o uso de cloreto de mercúrio (HgCl_2) como agente desinfetante causou menos problemas de escurecimento nos tecidos. Em *Strelitzia reginae*, o uso de 0,3% de HgCl_2 foi menos prejudicial do que 9% de hipoclorito de cálcio (ZIV; HALEVY, 1983).

Em um estudo realizado por Pasqual et al. (2002), com indução de calos em anteras de café (*Coffea arabica* L.), a melhor assepsia das anteras foi obtida em hipoclorito de sódio (NaOCl) 2% durante 15 min; o uso do PVP na dosagem de 200 mg.L^{-1} otimizou a formação de calos, bem como diminuiu a oxidação. Porém, no presente estudo, a assepsia realizada em hipoclorito de sódio 2% por 10 minutos e o 1 g L^{-1} de PVP (polivinilpirrolidona) não foi eficiente pra controlar a oxidação na espécie estudada (*Hevea* spp.).

Vale ressaltar um estudo realizado com *Hevea brasiliensis* Mueel Arg. por Srichuay et al. (2014), no qual flores masculinas foram assepticamente abertas e as anteras foram retiradas para cultura em meio de indução de calo suplementado com 5% de sacarose, 1 mg L^{-1} de 2,4-D, 1 mg L^{-1} KIN e 1 mg L^{-1} ANA, resultaram em 86,25% de indução de calos. Tal protocolo foi utilizado no presente estudo, porém, pode-se dizer que a falta de um protocolo asséptico eficiente interferiu na indução da calogênese na espécie estudada.

De acordo com GEORGE, (1993) a concentração e o tempo de exposição aos desinfestantes dependem do material vegetal, e diferentes partes da planta apresentam respostas variadas quanto à sensibilidade dos tecidos. Uma desinfestação eficiente elimina os microrganismos e não causa danos ou morte aos tecidos. Contudo, os efeitos benéficos e modo de ação do hipoclorito de sódio no cultivo *in vitro* de vegetais não estão bem elucidados, sendo foco para futuros estudos a serem desenvolvidos.

3.5. Indução da calogênese em diferentes fontes de explantes oriundas de plântulas de seringueira (*Hevea spp.*) germinadas *ex vitro*

Após 90 dias de incubação em sala de crescimento, verificou-se que para a variável sobrevivência, houve efeito significativo apenas para o fator B, diferentes fontes de explantes, onde a média de sobrevivência foi de 58,88% (Tabela 10). O fator A, que corresponde aos dois meios de cultura testados, não teve efeito significativo, assim como a interação entre estes dois fatores.

Tabela 10. Porcentagem de sobrevivência das diferentes fontes de explantes de seringueira (*Hevea spp.*) em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.

Fonte de Explante	Sobrevivência
Gema apical	76,67 ^{ab}
Caule	73,33 ^b
Folha	90 ^{ab}
Pecíolo	100 ^a
Intertegumento	0 ^c
Raiz	13,33 ^c
Média (%)	58,88

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Após 30 dias de estabelecimento do cultivo *in vitro*, foi observado o escurecimento em algumas fontes de explantes (Figura 22), característico de oxidação fenólica.

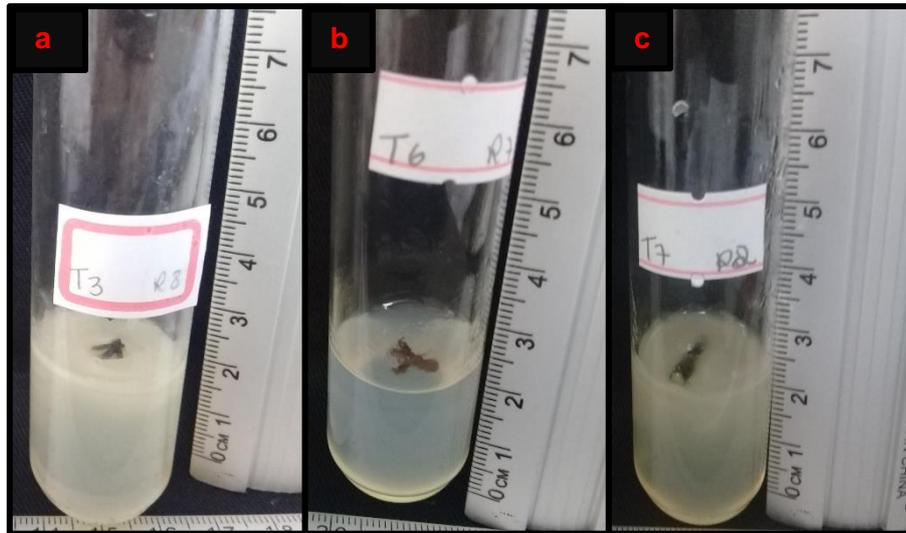


Figura 22. Oxidação fenólica em diferentes explantes (pecíolo (a), gema apical (b), caule (c)) de seringueira (*Hevea* spp.) após 30 dias de estabelecimento do cultivo *in vitro*.

As análises demonstraram que para esta variável houve efeito significativo para a interação deste dois fatores (meio de cultura e fontes de explantes), conforme pode ser observado na Figura 23, onde a média de oxidação fenólica foi de 55,56%.

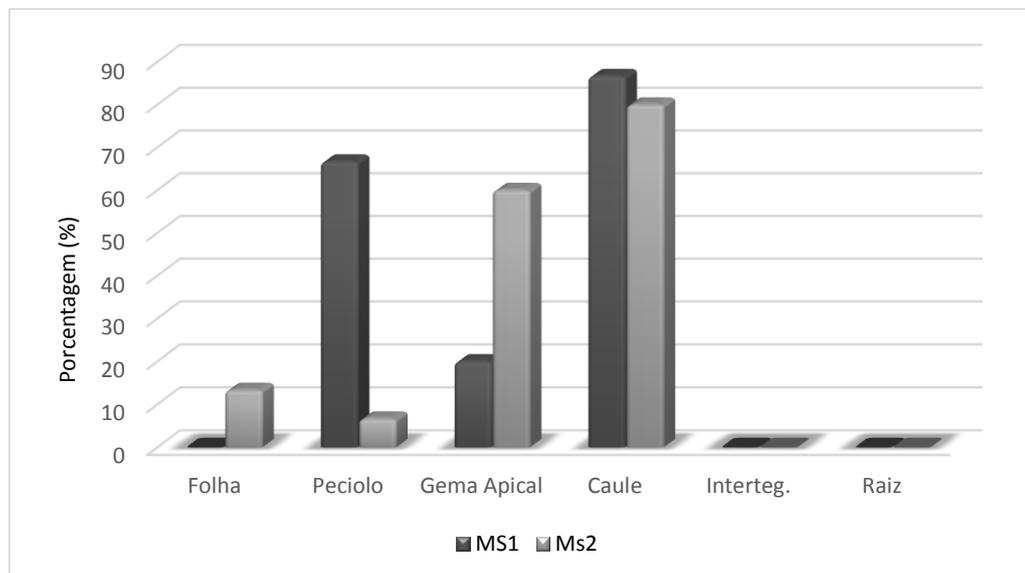


Figura 23. Porcentagem de oxidação em diferentes fontes de explantes de seringueira (*Hevea* spp.) após 90 dias de incubação em meio de cultura MS, em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.

A oxidação é um dos mais frequentes problemas enfrentados, especialmente na fase de estabelecimento do cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. Sendo estes compostos, muitas vezes, produzidos em áreas injuriadas dos explantes (ANDRADE et al., 2000). Além de ferimentos e outros fatores inerentes ao explante, a oxidação pode ser provocada pelos próprios reguladores de crescimento (LEDO et al., 2002),

no caso da espécie estudada, a exsudação do látex pode ter influenciado nesse processo.

As perdas por contaminação durante a fase de estabelecimento deste experimento alcançaram 31,66% para contaminação fúngica e 17,22% para contaminação bacteriana (Figura 24). As análises estatísticas demonstraram efeito significativo apenas para o fator A, diferentes fontes de explantes, conforme pode ser observado na Figura 24. O fator B (MS₁ e MS₂) não apresentou efeito estatístico significativo, assim como a interação entre estes dois fatores.

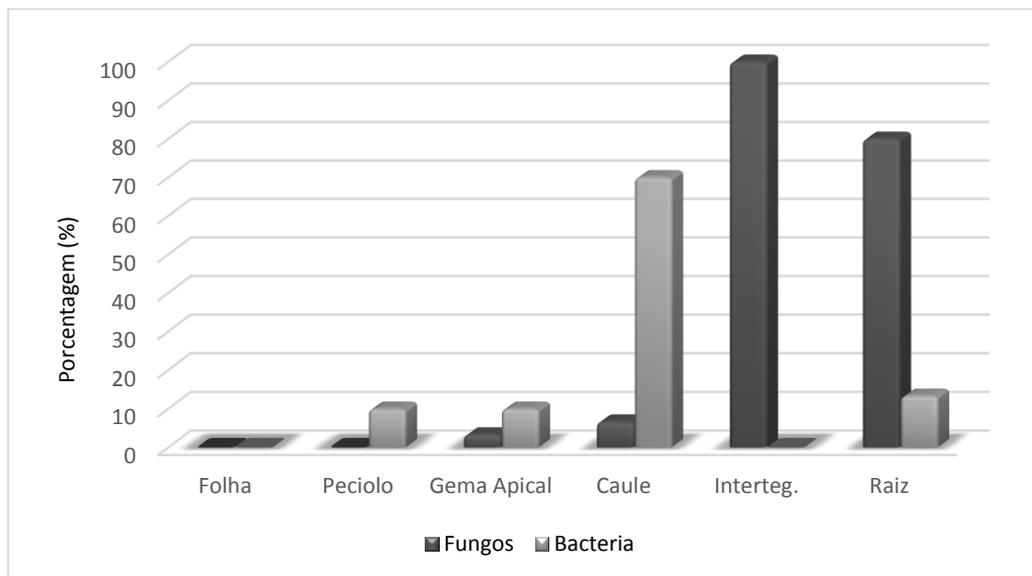


Figura 24. Porcentagem de contaminação fúngica e bacteriana em diferentes fontes de explantes de seringueira (*Hevea* spp.) após 90 dias de incubação em meio de cultura MS, em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.

As contaminações e a oxidação fenólica vêm sendo relatadas como os principais gargalos do estabelecimento de cultivos *in vitro* em espécies florestais, considerando que níveis reduzidos de contaminação e de oxidação não inviabilizam a cultura de tecidos (XAVIER et al., 2009). Vale ressaltar que muitos contaminantes apareceram após algumas semanas de estabelecimento do cultivo *in vitro*, o que indica a possível presença de microrganismos endofíticos nos tecidos (MROGINSKI et al., 1999; PALU et al., 2011). Em virtude do baixo nível de contaminação e do elevado potencial morfogenético, tem-se utilizado material juvenil como fonte de explante (BARCELÓ-MUÑOZ et al., 1999).

O processo de desdiferenciação e indução de calos no presente estudo com *Hevea* spp. iniciou-se após 15 dias de cultivo, com o intumescimento dos explantes cultivados (Figura 25).

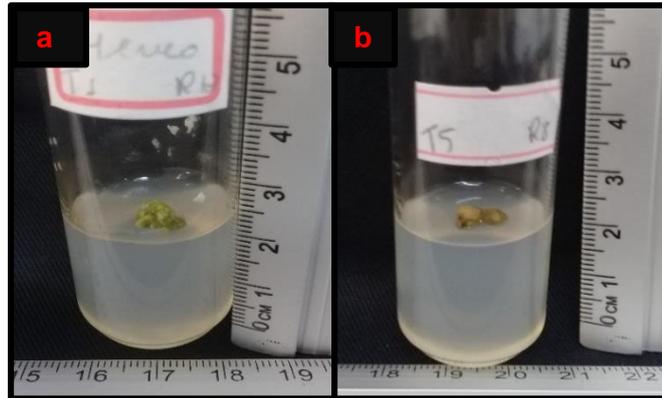


Figura 25. Explante foliar (a) e gema apical (b) de seringueira (*Hevea* spp.) entumecidos, após 15 dias de cultivo, em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.

Estudos realizados com indução de calos em embriões zigóticos citam o intumescimento e aumento do volume dos explantes cultivados, conforme observado em *Elaeis guineensis* (SILVA et al., 2010) e *Acrocomia aculeata*. (PADILHA, 2013).

Passados 90 dias de estabelecimento, os tratamentos empregados promoveram 47,77 % de formação de calos, nas diferentes fontes de explantes testadas, sendo observadas diferenças estatísticas significativas para interação dos fatores analisados, conforme pode ser observado na Figura 26.

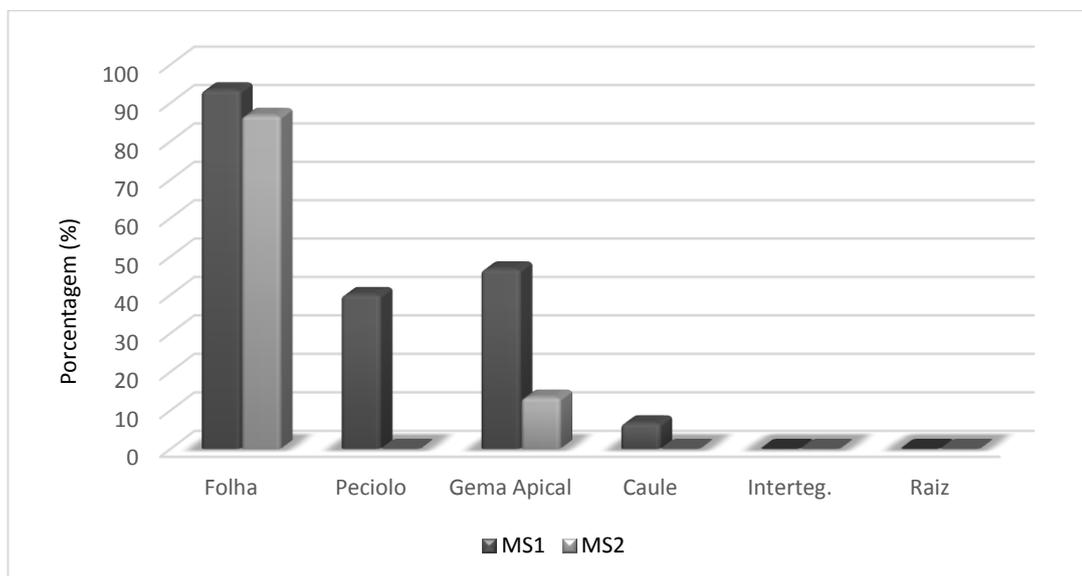


Figura 26. Porcentagem de formação de calos em diferentes fontes de explantes de seringueira (*Hevea* spp.) após 90 dias de incubação em meio de cultura MS, em resposta aos tratamentos para indução de calogênese.

Em todos os tratamentos testados pode-se observar (Figura 20) que o meio de cultura MS₁, suplementado de 2,4-D (2 mg L⁻¹), L- Cisteína (125 mg L⁻¹) e BAP (1 mg L⁻¹), proporcionou melhor indução de massa calogênica, com média de 31,11%,

enquanto o meio MS₂, suplementado de 2,4-D (2 mg L⁻¹), L-Cisteína (125 mg L⁻¹) e BAP (2 mg L⁻¹), proporcionou apenas 16,66%, em média.

O calo pode ser classificado de acordo com as formas que apresente. Godoy-Hernandez e Vazquez-Flota (2006) relatam que quando o tecido formado por células sobrepostas que, ao toque, se desagregam em células ou grupos de células, estes são determinados como calos friáveis, os quais são promissores quando se busca a embriogênese somática (FLORES, 2006). Por outro lado, quando este apresenta massa celular com aspecto aveludado, formada primariamente a partir do explante inicial, composto por células compactadas entre si, formando um tecido resistente ao corte ou a fragmentação, são determinados calos compactos (GEORGE et al., 2008).

Dentre os explantes testados, os foliares propiciaram maiores médias de massa calogênica (90%), seguidos de gema apical (30%), pecíolo (20%) e caule (3,33%), apesar de não sofrerem completa desdiferenciação em seus tecidos, apresentando, ao final do terceiro mês de cultivo, um aspecto de formação calogênica pouco friável, onde foram observados grupos de aglomerados compactos, com coloração variando de bege, marrom claro e branco, como podem ser observados na figura 27. Estas características podem ser resultantes da influência dos reguladores e/ou das diferentes fontes de explantes utilizadas.

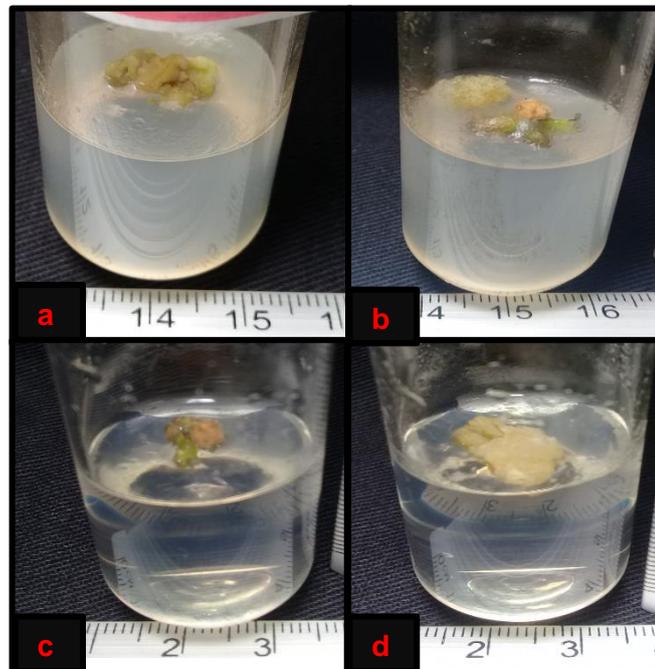


Figura 27. Explante foliar (a), gema apical (b), pecíolo (c) e caule (d) de seringueira (*Hevea* spp.) após 90 dias de incubação em meio de cultura MS com a presença de calos compactos com coloração variando de bege, marrom claro e branco.

Castro et al. (2009) relatam que as folhas são os melhores explantes para a indução de calos em barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*), e que os melhores resultados foram obtidos na ausência de luz. Porém, Werner et al. (2009) não verificaram diferenças significativas na porcentagem de formação de calos em folíolos jovens e juvenis de pau-brasil (*Caesalpinia echinata*) cultivados na luz e no escuro.

Em algumas espécies, a indução de calos é possível apenas com 2,4-D, enquanto outras necessitam da combinação de diferentes reguladores, como AIA, BAP e ANA (NEWMAN et al., 1996). Alves (2010) relatou a formação de calos friáveis em pecíolos, folhas e estípulas de embaúba (*Cecropia glaziovii*), em meio contendo 2,4-D combinado de BAP. O mesmo autor observou que os calos originados dos pecíolos eram de coloração amarela clara. Em estudos realizados com seringueira, 2,4-D apresentou eficiência na indução de calos, o que tem sido relatado por muitas pesquisas (JAYASREE et al., 1999; KOUASSI et al., 2008; SOBHA et al., 2003; ZHOU et al., 2012). Assim, o presente estudo sugere que outras combinações ou outros tipos de fitorreguladores precisam ser testados, aliados ao uso de 2,4-D, L-Cisteína e BAP, a fim de induzir calos friáveis e embriogênicos nesta espécie.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados neste trabalho é possível concluir que:

1. A oxidação fenólica é um dos principais problemas para a obtenção de calos em seringueira, independente da fonte de explante utilizada;
2. Embriões zigóticos são explantes promissores para a calogênese;
3. Explantes oriundos de tecido jovens apresentam maior porcentagem de formação calogênica;
4. As contaminações endógenas são mais encontradas em segmentos nodais de plantas adultas.
5. As contaminações endógenas, aliadas à oxidação fenólica, inviabilizaram a formação de calos em explantes de seringueira.
6. As anteras deste gênero são sensíveis ao tratamento de desinfestação com hipoclorito de sódio 2%. Assim, recomenda-se o uso outra substância desinfestante, que possua menor efeito oxidativo, ou o uso de dosagens mais baixas de hipoclorito de sódio.
7. Explantes de folha, gema apical e pecíolo, oriundos de plântulas germinadas no laboratório, proporcionaram maior porcentagem de calos na espécie estudada.
8. Todos os calos obtidos no presente estudo apresentaram aspecto compacto. Sendo assim, estudos futuros, com o objetivo de obter calos friáveis, devem se concentrar no uso de explantes oriundos de tecidos jovens.

REFERÊNCIAS

- AITCHISON, P.A.; MACLEOD, A.J.; YEOMAN, M.M. Growth patterns in tissue (callus) cultures. In: STREET, H.E. (Ed). **Plant Tissue and Cell Culture**. 2 ed. University of California Press. Berkeley, p.267-306, 1977.
- ALBINO, B. É. S.; SANTOS, B. R.; MELLO, M. M. M.; BARBOSA, S.; POLO, M.; FERREIRA, E. B. Utilização do 2,4-D na indução de calogênese em Insulina-Vegetal. In: XIX Congresso de Pós-graduação da UFLA, 2010, Lavras. Anais do XIX Congresso de Pós-graduação da UFLA, 2010.
- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA R. G., TEOTÔNIO, F. A. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Editora UFV, Viçosa, 442 p., 2004.
- ALIYU, O. Application of tissue culture to cashew (*Anacardium occidentale* L.) breeding: An appraisal. African Journal of Biotechnology v.4, p.1485-1489, 2005.
- ALVES, M.N. Tissue culture of *Cecropia glaziovii* Sneth (Urticaceae) vegetative micropropagation and plant regeneration from callus. **Ciência e Agrotecnologia**, v.34, p. 1245-1252, 2010.
- 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.
- ANDRADE, S.R.M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. 58. ed., Planaltina: Embrapa cerrados, 16p. 2002.
- AOYAMA, E. M.; GONTIJO, A.B.P.L.; FARIA, D.V. Propagação em bromeliaceae: Germinação de sementes e cultivo *in vitro*. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**. Goiânia, v. 8, n. 15; p. 1452- 1471. 2012.
- ARAÚJO, L. H. A.; CARVALHO, J. M. F. C. **Técnicas de cultivo *in vitro***. Areia: UFPB/ Centro de Ciências Agrárias (Programa de Pós-Graduação), João Pessoa 4 p., 2005. AUGUSTO, C.S.S. **Micropropagação da Amoreira-Preta cv. Brazos**. 2001. 132 p. Dissertação. (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal de Paraná, Curitiba, 2001.
- AZOFEIFA, A. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. **Agronomía Mesoamericana**. Universidad de Costa Rica, CR. v. 20, n. 1, p. 153-175, 2009.
- BARBOZA, T. J. S.; LAGE, D. A.; MOSS, V. B.; SOUZA, C. A.; ALBARELLO, N. Effect of different culture media and plant growth regulators for the optimization of callus induction of *Annona mucosa* (Jacq.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 16, n. 4, p. 905-911, 2014.
- BARCELÓ-MUÑOZ, A. Micropropagation of adult avocado. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 58, p.11-7, 1999.
- BARTISH, V. I.; KORKHORO, V.I. The Composition of nutrient medium and the efficiency of shoot induction *in vitro* from apple leaf explants. Russian. **Journal of Plant Physiology**. Stuttgart, v. 44, n. 3, p. 381-385, 1997.

BIASI, L. A.; KOLLER, O. C.; KAMPF, A. N. Micropropagação do abacateiro 'Ouro Verde' a partir de segmentos nodais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, p. 1051-1058, 1994.

BONOME, L.T. DA S.; OLIVEIRA, L.E.M.; GRACIANO, M.H.P.; MATTOS, J.O.S.; MESQUITA, A.C. Influência do tratamento fungicida e da temperatura sobre a qualidade fisiológica de sementes de seringueira durante o armazenamento. **Agrarian**, Lavras, v.2, n.5, p.97-112, 2009.

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.

CAMPELO JÚNIOR, J. H. Estimativa da transpiração em seringueira. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, v.8, n.1, p. 35-42, 2000.

CANGAHUALA-INOCENTE, C.G. et al. Competência embriogenética em tecidos florais de *Accasellonwiana* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biociência**, Porto Alegre, v.5, supl.2, p. 87-89, 2007.

CANHOTO, J. M. **Biotecnologia Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação Genética**. Imprensa da Universidade de Coimbra. Coimbra. 407 p., 2010.

CARVALHO, A. C. P. P. et al. Glossário de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture & Micropropagation**. Lavras, v.7, n.1, 2011.

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.

CARVALHO, M. A. F.; PAIVA, R.; HERRERA, R. C.; ALVES, E.; CASTRO, M. E.; PAIVA, P. D. O; VARGAS, D. P. "Indução, análises morfológicas e ultraestruturais de calos de maracujazeiro nativo". **Revista Ceres**, Viçosa, v. 62, n.4, p. 340-346, 2015.

CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. Criopreservação no melhoramento vegetal. (**Boletim Técnico - Documentos**, 115). Campina Grande: Embrapa Algodão. 26p., 2003.

CASTRO, A. H. F.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A.A.; VITOR, S.M.M. Calogênese e teores de fenóis e taninos totais em barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville]. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 385-390, 2009.

CID, L. P. B. A propagação in vitro de plantas. O que é isso? **Biotecnologia Ciência & desenvolvimento**, Brasília, n.19, p.16-21, 2001.

COMPTON, M.E.; KOCH, J.M. Influence of Plant Preservative Mixture (PPM) on adventitious organogenesis in melon, petunia and tobacco. **In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant**, v. 37, p. 259-261, 2001.

COSTA A. S.; ARRIGONI-BLANK M. F.; BLANK AF.; MENDONÇA A. B.; AMANCIO V. F.; LEDO A. S. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 68-72, 2007.

- COSTA, F. R. S.; LOUREIRO, T. S.; PEREIRA, J. E. S. Influência de auxinas e tipos de explantes na indução de calos friáveis em *Piper hispidinervum* C. DC¹. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n. 2, p. 269-274, 2008.
- CORNISH, K. Similarities and differences in rubber bio chemistry among plant species. **Phytochemistry**, Oxford, v. 57, n 7, p. 1123- 1134, 2001.
- D'ONORIO, C.; MORINI, S. Somatic embryo, adventitious root and shoot regeneration *in vitro* grown quince leaves as influenced by treatments of different length with growth regulators. **Scientia Horticulturae**, Pisa, Italy, v. 107, n 2. p. 194-199, 2006.
- FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. C. ; LEDO, C. A. S.; JUNGHANS T. G.; SOUZA, A. S. ; CUNHA, M. A. P. Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. **Bragantia**, Campinas, v.66, n.4, p.535-543, 2007.
- FARIA, D.V. **Indução *in vitro* de brotos em *Aechmea ramosa* var. *ramosa* MART. EX SCHULT. F. (BROMELIACEAE)**. Conclusão de curso- Bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Espírito Santos- ES. 36p. 2011.
- FERNANDES, T. G.; SOARES, C.P.B.; JACOVINE, L.A.G.; ALVARENGA, A. de P. Quantificação do carbono estocado na parte aérea e raízes de *Hevea* sp., aos 12 anos de idade, na Zona da Mata Mineira. **Rev. Árvore**, Viçosa, vol.31, n.4, p. 657-665, 2007.
- FERRADINE, N.; FAMIANIE, F.; PROIETTI, P.; STANICA, F. Influence of growth regulators and light on *in vitro* shoot regeneration in M. 26 apple rootstock. **Journal of Horticultural Science**. Ashford, v. 71, n.6, p. 859-865, 1996.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v.38, n.2, p. 109-112, 2014.
- FORTES, G.R.L. **Calogênese e Organogênese *in vitro* de Macieira (*Malus spp*), Afetadas por Fatores Físicos, Químicos e Biológicos**. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa. 163p., 1992.
- 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.
- FLÔRES, A. V.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; CUNHA, A. C. M. C. da; GOLLE, D. P.; BASSAN, J. S. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 1, p. 175-182, 2011.
- GATTI, K. C. **Propagação vegetativa de pau mulato (*Calycophyllum spruceanum* (benth) k. schum.), jequitibá (*Cariniana estrellensis* (raddi) kuntze) e teca (*Tectona grandis* linn. f.) por miniestaquia..** Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) –72 p., Viçosa, 2002.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation and micropropagation: Plant propagation by tissue culture**. Exegetics, Edington. [S.I.] v.2, p. 37-66. 1996.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Exegetics, Edington. [S.I.] v.1, 555p. 1993.

- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Basingstoke: Exegetics, 574 p., 1996.
- GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G.J. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd. edition. v.1. Dordrecht, Netherlands. Springer. 501p. 2008.
- GHANTI, S. K. et al. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature explants of chickpea. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 54, n. 1, p.121-125, Jan. 2010.
- 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.
- 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
- GOMES, G. A. C.; PAIVA, R.; HERRERA, R. C.; PAIVA, P. D. O. Micropropagation of *Maclura tinctoria* L.: an endangered woody species. *Revista Árvore*, Viçosa, v.34, n.1, p.25-30, 2010.
- 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.I.] v.89, p.244-249, 2016.
- GOUVÊA, L. R. L.; RUBIANO, L. B.; CHIORATTO, A. F.; ZUCCHI M. I.; GONÇALVES P. DE S. Genetic divergence of rubber tree estimated by multivariate techniques and microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 33 n. 2 p. 308-318, 2010.
- GONÇALVES, P.S.; PAIVA, J.R.; SOUZA, R.A. **Retrospectiva e atualidade do melhoramento genético da seringueira (*Hevea spp.*) no Brasil e em países asiáticos**. Embrapa – CNPDS. Manaus. Documentos, 2. 69 p., 1983.
- GONÇALVES, P. de S., BATAGLIA, O. C.; ORTOLANI, A. A. & FONSECA, F. da S. **Manual de Heveicultura para o Estado de São Paulo, Série Tecnologia APTA. Instituto Agrônomo (IAC), Campinas, 2001.**
- GONÇALVES, S.; ROMANO, A. *In vitro* culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**. Portugal, v.31, n.2, p.166-174, 2013.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (eds). **Culturas de tecidos e transformação Genética de plantas**. EMBRAPA-CBAB, Brasília, v. 1, p. 533-568, 1998.
- GUERRA, M. P.; NODARI, R. O.; FRAGA, H.P. F; VIEIRA, L. N.; FRITSSCHE, Y. Apostila Biotecnologia Cultura de Tecidos. v 2016.1 - Ifdgv – Ufsc. Santa Catarina, 44 p., 2016
- GUEYE, B.; SAÏD-AHMED, H.; MORCILLO, F.; BORGEL, A.; SANÉ, D., HILBERT, J.L.; VERDEIL, J.L. &BLERVACQ, A.S. Callogenesis and rhizogenesis in date palm

leaf segments: are there similarities between the two auxin-induced pathways? **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 98: [S.I.] p. 47-58. 2009.

HUA, Y.W.; HUANG, T.D.; HUANG, H.S. Micropropagation of self-rooting juvenile clones by secondary somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. **Plant Breeding**. [S.I.] n. 129, p. 202-207, 2010.

IAC. RRIM 600: Importância da cultura. [Online]. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/seringueira/clones.php>> Acesso em: 05 de jul. de 2017

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.

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**, [S.I.] v. 3, n. 9, p. 185-189, 2011.

IRSG - INTERNATIONAL RUBBER STUDY GROUP. **Production and consumption of natural rubber**. [Online] Disponível em:<http://www.rubberstudy.com/documents/WebSiteData_June2017.pdf>. Acesso em 19 jul. 2017.

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: ALVARENGA, A.P.; CARMO, C.A.F.S. (Eds) **Sequestro de Carbono, quantificação em seringais de cultivo e na vegetação natural**. p.1-42. Viçosa, 2006.

JAYASREE, P.K., ASOKAN, M.P., SOBHA, S., AMMAL, L.S., REKHA, K., KALA, R.G., JAYASREE, R. AND THULASEEDHARAN, A. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature anthers of *Hevea brasiliensis* Mull. Arg. **Current Science**, [S.I.] , v.76, p.1242-1245. 1999.

JHA, S; DAS, S. **Tissue culture of cashew nut**. In: Plant biotechnology and molecular markers. Srivastava, P; Narula, A; Srivastava, S. Anamaya, Publishers, New Delhi, India. p. 244-260, 2004.

JIMÉNEZ, V.M.; CASTILLO, J.; TAVARES, E.; GUEVARA, E.; MONTIEL, M. *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, [S.I.] v.86, p.389-395, 2006.

KOUASSI, K.M., KOFFI, K.E., GNAGNE, Y.M., N'NAN, O., COULIBALY, Y. AND SANGARE, A. (2008). Production of *Hevea brasiliensis* embryos from *in vitro* culture of unpolinated ovules. **Biotechnology** [S.I.], v. 7, p .793-797, 2008.

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.

- LAN, Q.Y.; LUO, Y.L.; MA, S.M.; LU, X.; YANG, M.Z.; TAN, Y.H.; JIANG, X.N.; TAN, Y.P.; WANG, X.F. and LI, Z.Y. Development and storage of recalcitrant seeds of *Hopea hainanensis*. **Seed Science & Technology**. [S.l.], v. 40, p. 200-208, 2012.
- LÉDO, A.S.; BLANK, A.F.; BARBOZA, S.B.S.C.; RANGEL, M.S.A.; LÉDO, C.A.S. Germinação *in vitro* de embriões zigóticos e sementes de nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.10, n.3, p.1-5, 2008.
- LEDO, A.S.; LAMEIRA, O.A.; BENBADIS, A.K. Explantes de cupuaçuzeiro submetidos a diferentes condições de cultura *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 604 - 607, dez. 2002.
- LEMONS, O. F. P. **Mutagênese e tecnologia *in vitro* no melhoramento genético de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.)**. Tese (Doutorado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo). Piracicaba, 159f. 2003.
- LONDE, L.N. **Indução morfogenética de *Anacardium humile* St. Hill e análise da divergência genética entre populações**. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 141 p. 2005.
- LUZ, J. M. Q. L.; SANTOS, V.A.; RODRIGUES, T.M.; ARRIGONI BLANK, M.F.; ASMAR, S.A. Estabelecimento *in vitro* e aclimatização de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 16, n. 2, supl. L., p. 444-449, 2014.
- MACEDO, R. L.G.; OLIVEIRA, T. K.; VENTURIN, N.; GOMES, J. E. Introdução de clones de seringueira no Nordeste do Estado de Minas Gerais. **Cerne**, Lavras v.8, n.1, p.124-133, 2002.
- MARATTUKULAM, J. G. & MERCYKUTTY, V. C. Propagation techniques. In: GEORGE, P. J. & JACOB, C. K. **Natural rubber: agromanagement and crop processing**. Kottayam, India: Rubber Research Institute of India. Kottayam, India p. 75-96, 2000.
- MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; MCKEE, R.A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: SBG, Cap. 5, p. 101-158, 1994.
- MARTINS, C.R.; CARVALHO, A.C.P.P.; Avanços da cultura de tecidos na micropropagação de plantas. **III Ciclo de palestras sobre cultivo *in vitro* de plantas**. Aracaju, p.28-32, 2012.
- MARTINS, A. L. M.; RAMOS, N. P.; GONÇALVES, P. de S. & VAL, K. S. Influência de porta-enxertos no crescimento de clones de seringueira no Estado de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, São Paulo, v. 35, n .9, p. 1743-1750, 2000.
- MARTINS, C. R.; SCZEPARSKI, P. H. G.; BACHETTINI, P. S.; FRANCA, R. B.; FORTES, G. L. Leaf tissue callogenesis off apple (*Mallus* sp.) rootstock cv. M7 induced by Bap and CPPU. **Revista Brasileira Floricultura**. V. 23, p. 714-717, 2001.
- MENDANHA, A. B. L.; TORRES, R. A. A. & FREIRE, A. B. Micropropagation of rubber trees (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo v. 21, n. 3, p. 395-398, 1998.

- MINAMIGUCHI, J.Y. **Uso de diferentes geleificantes 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.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. O Bioma Cerrado. Brasília. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/biodiversidade> >. Acesso em: 08 set. 2017.
- MODESTE, K.K.; EDMOND, K.K.; GILLE, K.N.; MICHEL, G.; MOGOMAKÉ, K.; HILAIRE, K.T. Callogenesis and Somatic embryogenesis induction in *Hevea brasiliensis*: effects of fruit shelf-life and carbon source. **Research in Biotechnology**, Zurich, n. 3, v. 6, p. 42-50, 2012.
- MROGINSKI, L. A.; ROUVIER, S.M.; FABISIK, J.C.; LEVIT, M.; MARASSI, M.A.; SANSBERRO, P.A.; REY, H.Y. Effect of medium composition and light supply on in vitro shoot proliferation in *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). **Journal of plant nutrition**. v. 22, n.2, p. 359-368, 1999.
- MUNASINGHE, E. S.; RODRIGO, V. H. L.; KARUNATHILAKE, P. K. W. Carbon sequestration in mature rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) plantations with genotypic comparison. **Journal of the Rubber Research Institute of Sri Lanka**. Sri Lanka, v. 91 p. 36-48. 2011.
- 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.
- NAYANAKANTHA, N.M.C.; SENEVIRANTNE, P. Review Tissue culture of rubber: past, present and future prospects. **Ceylon Journal of Science (Biological Sciences)**, Sri Lanka, v.36, n.2, p.116-125, 2007.
- NEWMAN, P. O.; KRISHNARAJ, S.; SAXENA, P. K. Regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum*), somatic embryogenesis and shoot organogenesis from hypocotyl segments induced with Benzylaminopurine. **International Journal of Plant Sciences**. Chicago, v. 157, p.554-560, 1996.
- 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.
- ORJUELA-CHAVEZ, J. A., ANDRADE, H. J. Y VARGAS, Y. Potential of carbon storage of rubber (*Hevea brasiliensis* Müell. Arg.) plantations in monoculture and agroforestry systems in the Colombian Amazon. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, Mexico, v.17, p. 231-240, 2014.
- OBROUCHEVA, N.V.; LITYAGINA, S.V.; NOVIKOVA, G.V.; SIN'KEVICH, I.A. Vacuolar status and water relations in embryonic axes of recalcitrant *Aesculus hippocastanum* seeds during stratification and early germination. **Annals of Botany Plants**, [S.l.], v. 12, p. 1-14, 2012.
- OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I. K. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticuma estivum* L.: evidence for somatic embryogenesis. *Protoplasma*, New York, v. 110, p. 95-105, 1983.

PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. (ed.). **Cultura de Tecidos – Textos Acadêmicos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 97 p., 2001.

PALU, E. G.; CORRÊA, L. S.; SUZUKI, A. N.; BOLIANI, A. C. Uso de antibióticos para o controle de bactérias endógenas visando à micropropagação da figueira. **Revista Brasileira de Fruticultura**. São Paulo. v. 33, n. 2, p. 587-592, 2011.

PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; RAMOS, J. D. **Aplicações na propagação de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, v. 81, 2001.

PASQUAL M; HOFFMANN A; RAMOS J.D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações – introdução: fundamentos básicos**. Lavras: UFLA/FAEPE. 159 p., 1997.

PASQUAL, M.; MACIEL, A. L. R; CAMPOS, K. P.; SANTOS, E. C.; CAMPOS, R.J.C. Indução de calos em anteras de café (*Coffea arabica* L.) cultivadas *in vitro*. Ciênc. agrotec., Lavras, v.26, n.1, p.71-76, 2002.

PHILLIPS, G.C., HUBSTENBERGER, J.F. & HANSEN, E.E. Plant regeneration from callus and cell suspension cultures by somatic embryogenesis. In: O.L. Gamborg & G.C. Philips (eds). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Fundamental Methods*. Springer-Verlag, Berlin.1995.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. Madrid, Spain: Mundi – Prensa, 326 p., 1990.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 15 ed., Piracicaba: FEALQ, 451p. 2009.

PLANT CELL TECHNOLOGY, Disponível em< <http://www.plantcelltechnology.com/ppm-product-information>>. Acesso em: 23 de março de 2015

PRAMMANEE, S., S. THUMJAMRAS, P. CHIEMSOMBATAND N. PIPATTANAWONG. Efficient shoot regeneration from direct apical meristem tissue to produce virus-free purple passion fruit plants. **Crop Protection**. [S.l.] v. 30, p. 1425–1429. 2011.

PREMAKUMARI, D.; SARASWATHYAMMA, C. K. The Para rubber tree. In:GEORGE, P. J.; JACOB, C. K. **Natural rubber: agromanagement and cropprocessing**. Rubber Research Institute of India, Kottayam, p. 29-35, 2000.

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.

PRIYADARSHAN, P. M.; SASIKUMAR, S. ; GONÇALVES, P. de S. Phenological changes in *Hevea brasiliensis* under differential geo-climates. **The planter**, [S.l.], v.77, n.905, p. 447-459, 2001.

PRIYADARSHAN, P. M.; CLEMÉNT-DEMANGE, A. Breeding *Hevea* rubber: formal and molecular genetics. *Advances in Genetics*, [S.l.], v.52, p.51-90, 2004.

QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. S. **Manual de procedimentos do laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, 48 p. 2008.

- RAPOSO, A.; TEIXEIRA, R. B.; MANFIO, C. E.; SILVA, D. A.; MOREIRA, N. R. S.; MACIEL, S. A. **Protocolo de micropropagação para as espécies *Piper hispidinervum* e *P. aduncum***. Rio Branco: Embrapa Acre, (Circular técnica, 63) 6 p. 2012.
- 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.
- RIPPEL, M. M.; BRAGANÇA, F. C. Borracha natural e nanocompósitos com argila. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 818-826, 2009.
- ROCHA, H.S. **Luz e sacarose na micropropagação da bananeira "Prata Anã": alterações morfoanatômicas**. 205. 98 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)- Escola Superior de Agricultura de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- 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.
- SANTOS, C.G.; PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O.; PAIVA, E. Induction and biochemical analysis of callus obtained from leaf segments of *Coffea arábica* L., Cultivar Rubi. *Ciência e Agrotecnologia*. Lavras, v. 27, n. 3. p. 571 - 577. 2003.
- SATO, A. Y.; DIAS, H. C. T.; ANDRADE, L. A.; et al. Micropropagação de *Celtis* sp.: controle da contaminação e oxidação. *Cerne*, Lavras: v. 7, n. 2, p. 117-123, 2001.
- SCHUCH, M.W. Multiplicação *in vitro* do porta enxerto de macieira cv. Murabakaido: Efeito da orientação do explante ao meio de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.2, p.293-295, 2002.
- SECCO, R. de S. A botânica da seringueira. In: ALVARENGA, A. de P.; CARMO, C.A. F. S. do.; (Coord.). **Seringueira**. Viçosa, MG: EPAMIG, cap.1, p. 3-23. 2008.
- SENDIN, A. P. P. M. **Micropropagação de bananeira dos cultivares Maçã e Grande Naine visando a produção de mudas de baixo custo**. 2001. 72 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.
- SENEVIRATNE, P; WIJESEKARA, G. The problem of phenolic exudates in *in vitro* culture of mature *Hevea brasiliensis*. **Journal of Plantation Crop**, v.24 pag.54-62, 1996.
- SILVA, R.C. **Cultura *in vitro* de calos e quantificação de compostos fenólicos em gabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg.)**. 2016. 50p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2016.
- SILVA, S.M.G. **Reguladores vegetais no desenvolvimento *in vitro* de bromélia (*Aechmea blanchetiana*)**. 2010. 58 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia. Área de concentração: Horticultura. Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Botucatu- SP, 2010.

SILVA, J. Q. **Sazonalidade da produção e características de borracha natural de clones de seringueira (*Hevea brasiliensis*) em diferentes estádios fenológicos.** 2012. 121 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2012.

SILVA, T. et al. Germinação de sementes de melancia sob diferentes métodos de tratamento com reguladores vegetais. **Scientia Plena**, Aracaju, v.10, n.3, p.1-15, 2014.

SIRISOM, Y.; TE-CHATO, S. The effects of Peptone and silver nitrate (AgN O₃) *in vitro* shoot formation in *Hevea brasiliensis* Muell Arg. **Journal of Agricultural Technology**. [S.I.], v. 8, n. 4, p. 1509-1516. 2012.

SRICHUAY, W., KALAWONG, S. AND TE-CHATO, S. Effects of seasonal collection on callus induction, proliferation and somatic embryogenesis from anther cultures of *Hevea brasiliensis* Muell Arg. **African Journal of Biotechnology**, v. 13(35), p. 3560-3566, 2014.

SOBHA, S., SUSHAMKUMARI, S., THANSEEM, I., JAYASREE, P.K., REKHA, K., JAYASHREE, R., KALA,R.G., ASOKAN, M.P., SETHURAJ, M.R., DANDEKAR, A.M. AND THULASEEDHARAN, A. Genetic transformation of *Hevea brasiliensis* with the gene coding for superoxide dismutase with FMV 34S promoter. **Current Science**, [S.I.], v. 85, p.1767-1773, 2003.

SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas.** Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, 152 p., 2006.

STORK, L.; GARCIA, D. C.; LOPES, S. J., ESTEFANEL, V. **Experimentação vegetal.** Santa Maria: Ed. UFSM, p. 198, 2000.

SUJATHA, K.; HAZRA, S. Micropropagation of mature *Pongamia pinnata* Pierre. In *Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, Columbia, v. 43, n. 6, p. 607-613, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 5. Ed. Porto Alegre: Artmed. 918 p., 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** Porto Alegre: Artmed, 719 p. 2004.

TARRAHI, R.;REZANEJAD, F. Callogenesis and production of anthocyanin and chlorophyll in callus cultures of vegetative and floral explants in *Rosa gallica* and *Rosa hybrid* (Rosaceae). **Turkish journal of botany**, Iran, v.37, n.6, p. 1145-1154, 2013.

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

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** v. 2. Brasília: Embrapa, 509 p. 1998.

TORRES A.C.; CALDAS L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.** Brasília: ABCTP/ EMBRAPA-CNPQ, 433p. 1990.

TORRES, A.C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J.A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal.** Brasília: Embrapa hortaliças, 128 p. 2000.

VENKATACHALAM, P.; GEETHA, N.; SANGEETHA, P.; THULASEEDHARAN, A. Natural rubber producing plants: An overview. **African Journal of Biotechnology**, India, v. 12, n. 12, p. 1297-1310, 2013.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; ASSIS, F. A.; PIO, L. A. S. Sacarose e um aditivo orgânico complexo na micropropagação de amoreira-preta (*Rubus* sp.). **Plant Cell Culture and Micropropagation**. Lavras, v. 5, n. 1, p. 1- 8, 2009.

VIDAL, F. R.; DINIZ, J. D.N; SILVA, F. P. Multiplicação *in vitro* de plantas juvenis de mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. Goiania, v.43, n.1, 2013.

VIETEZ, A.M.; SAN-JOSÉ, M.C. Adventitious shoot regeneration from *Fagussylvatica* leaf explants *in vitro*. **In Vitro Cellular & Development Biology**. Columbia, v.32,n.3, p.140-147, 1996.

WANG, H.M. et al. Establishment of *Camptotheca acuminata* regeneration from leaf explants. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 50, n. 4, p. 725 - 728, 2006.

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.

WERNER, E.T.; PESSOTTI, K.V.; LOPES, F.P. CUZZUOL, G.R.F. Indução de *Caesalpinia echinata* Lam. (Pau-Brasil) *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 1053-1055, 2007.

WILLADINO, L.; CÂMARA, T. Cultura de tecidos vegetais. Disponível em: <<http://www.efrpe.br/quimica/culttec.htm>> Acesso em: 10 out. 2010.

WICHERLEY, P. R. The genus *Hevea*: botanical aspects. In: SETHURAJ, M. R. e MATHEW, N. M. **Natural rubber: biology, cultivation and technology**. London, Elsevier, p. 50-66, 1992.

WILLIAMS, E.S.; MAHESWARAN, B. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as embryogenesis. **Annals of Botany**, Oxford, v.57, p.443-462, 1986.

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.

WORLD AGROFORESTRY DATABASE. A tree species reference and selection guide. Disponível em: <<http://www.worldagroforestrycentre.org/sea/Products/AFDbases/AF/asp/SpeciesInfo.asp?SpID=17>>. Acesso: 15 de Jul. de 2016.

YADAV, U; LAL, M; JAISWAL, V. 1990. *In vitro* micropropagation of the tropical fruit tree *Syzygium cuminii* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.21, p. 87-92. 1990.

YU, D.; MEREDITH, C.P. The influence of explant origin on tissue browning and shoot production in shoot tip cultures of grapevine. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 111, n. 6, p. 972-975. 1986.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 279 p., 2009.

ZICHNER-ZORZ, A.; LEZCANO, M. I. D.; SEGNANA, L. R. G.; ORTIZ, M. V. Efecto Del carbón activado em El control de la oxidación de segmentos nodales de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden cultivados in vitro. *Investigación Agraria*, [S.l.], v. 14, n. 2, p. 107-111, 2012.

ZIV, M; HALEVY, A. Control of oxidative browning and *in vitro* propagation of *Strelitzia reginae*. *Hort Science*, v. 18, p. 434-436, 1983.

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.

ZHOU, Q.N., SUN, A.H., LI, Z., HUA, Y.W., JIANG, Z.H., HUANG, T.D., DAI, X.M. AND HUANG, H.S. Cryopreservation and plant regeneration of anther callus in *Hevea* by vitrification. ***African Journal of Biotechnology*** [S.l.], v. 11, p.7212-7217, 2012.

ANEXO