MÉTODOS DE REGENERAÇÃO *IN VITRO* DA MAMONEIRA A PARTIR DE DIFERENTES TIPOS DE EXPLANTES[1]

MARIA SOCORRO ROCHA[2], KÁTIA CRISTINA DE OLIVEIRA[3], MAURO DA NÓBREGA DA COSTA[3], ADRIANE OLIVEIRA CUNHA[3], JULITA MARIA FROTA CHAGAS CARVALHO[4] e JOSÉ WELLINGTON DOS SANTOS[4]

RESUMO: Considerando-se o elevado índice de contaminação de sementes no processo de sua multiplicação e a necessidade da manutenção da qualidade fisiológica da semente de Banco de Germoplasma é que objetivou-se estudar métodos de regeneração da mamoneira a partir de diferentes tipos de explantes e sua contaminação *in vitro,* através dos seguintes explantes: sementes inteiras, quebradas e sem tegumento e eixos embrionários obtidos a partir de sementes embebidas e não embebidas em água estéril. As sementes foram desinfectadas em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo, durante 20 minutos. O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial (5 x 5) cinco tipos de explantes, SI (semente inteira), SQ (semente quebrada), SST (semente sem tegumento), EENEA (eixo embrionário obtido de semente não embebida em água estéril) e EEEA (eixo embrionário obtido de semente embebida em água estéril por 24 hora) e cinco período de 5, 10, 15, 20 e 25 dias de avaliação com 15 repetições e três explantes por repetição. Os resultados evidenciaram correlação, r = -0,76 entre o número de explantes regenerados e contaminados enquanto o melhor desempenho no processo regenerativo foi conseguido a partir da utilização de eixo embrionário como explante.

Termos para indexação: *Ricinus communis*, semente, eixo embrionário, regeneração, contaminação e mamona.

IN VITRO REGENERATION METHODS OF CASTOR STARTING FROM DIFFERENT TYPES OF EXPLANTS

ABSTRACT: Considering itself raised the contamination index of seeds in the process of its multiplication and the necessity of the physiological quality maintenance of the seed of Germoplasm Bank, a time that in the regeneration of small samples of seeds if losses of were accesses of contamination verify, it was objectified with this study, to compare methods of regeneration of the castor bean from different types of explants and its contamination *in vitro* being used the following explants: entire seeds, breked ond withat tegument seeds and embryonic axes from soaked and not absorbed seeds in barren water. The seeds had been out in solution of sodium hypochloride 2.5% of active chloride for 20 minutes. The experimental design was an entirely randomized in factorial with 5 x 5 five SI (seed finds out), SQ (broken seed), SST (seed without tegument), EENEA (embryonic axis to leave not of seed soaked in sterile eagle) e EEEA (embryonic axis to leave of seed soaked in sterile eagle by 24 hours) and five periods of 5,10,15, 20 the 25 and days of evoluation with 15 replication and three explants for replication. The results had evidenced correlation, r = -0.76 enters the number of regenerated explants and contaminated and better performance in the regenerative process it was obtained from the use of embryonic axle as explants.

Index terms: *Ricinus communis*, seed, embryonic axes, regeneration, contamination and castor bean.

[1]Aceito para publicação em 02 de Dezembro de 2002.
[2]Biologa.mestranda DEAg/CCT/UFCG, Campina Grande, PB. e-mail: liriumm@bol.com.br
[3]Eng. Agr., M.Sc., Doutorando em Agronomia, DF/CCA/UFPB, Areia, PB.
[4]Agr., Dr. Embrapa Algodão, CP 174, CEP: 58107-720, Campina Grande, PB. e-mail: julita@cnpa.embrapa.br (orientadora)
[5]Eng. Agr. M.Sc. Embrapa Algodão.

INTRODUÇÃO

A mamoneira (*Ricinus communis* L.), também conhecida como carrapateira ou rícino, pertencente à família Euphorbiaceae, é originária da Ásia Meridional de onde se espalhou em quase todo o mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. É largamente difundida por todo o Brasil, não havendo praticamente terreno baldio, mata ou lavoura abandonada onde ela não cresça. Em vários países ela é cultivada para a extração do óleo das suas sementes, cujo principal emprego se dá na lubrificação de motores de alta rotação, como é o caso dos motores de avião. O óleo de rícino é usado, também, como purgativo, na fabricação de tinta, verniz e plástico, enquanto a torta, subproduto da extração do óleo, empregado como adubo orgânico, apresentando também efeito nematicida. Apesar da alta toxicidade das sementes, o óleo de rícino não é tóxico, visto que a ricina, proteína tóxica das sementes, não é solúvel em lipídios, ficando todo o componente tóxico restrito à torta (GAILARD e PEPIN, 1999; SAVY FILHO, 2001; SCAVONE e PANIZZA, 1980).

A cultura se apresenta como alternativa de relevante importância econômica e social pois, dadas as suas características, é capaz de produzir satisfatoriamente bem até sob condições de baixa precipitação pluvial, sobressaindo-se também como alternativa para o semi-árido nordestino, onde a cultura, mesmo tendo sua produtividade afetada, tem-se mostrado resistente ao clima adverso quando se verificam perdas totais em outras culturas, e serve, desta forma, como uma das poucas alternativas de trabalho e de renda para o agricultor da região (VIERA e LIMA, 2003).

Segundo CARVALHO et al. (2002) o Brasil já foi um dos maiores produtores mundiais de mamona e maior exportador do óleo. Ao longo dos anos, porém, a produção vem sofrendo forte queda, com vistas de perda de mercado no exterior. A cultura da mamoneira no Nordeste, onde se concentra a maior produção (80%) se encontra, atualmente, em grande decadência devido sobretudo, falta de semente melhorada, ocasionando em conseqüência, degenerescência generalizada dos materiais cultivados. Num programa de produção de sementes vários fatores merecem atenção, ressaltando-se os contaminantes, pois implicam diretamente na qualidade das sementes. THOMAS (1953) afirma que a mamoneira é suscetível a mais de 150 diferentes microrganismos, alguns transmitidos pela própria semente. Como a manutenção da qualidade fisiológica da semente de um Banco de Germoplasma implica na regeneração de pequenas amostras de sementes, a perda de acessos decorrente de sementes contaminadas se verifica mais intensamente no processo convencional de multiplicação. Assim sendo, este trabalho objetivou avaliar métodos de regeneração da mamoneira a partir de diferentes tipos de explantes e sua contaminação *in vitro* .

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Centro Nacional de Pesquisa do Algodão (Embrapa Algodão), em Campina Grande, PB, em cujo estudo foram utilizados os seguintes tipos de explantes: SI (semente inteira), SQ (semente quebrada), SST (semente sem tegumento), EENEA (eixo embrionário obtido de semente não embebida em água estéril) e EEEA (eixo embrionário obtido de semente embebida em água estéril por 24 hora), provenientes de sementes da cultivar Nordestina, as quais foram desinfectadas em solução de hipoclorito de sódio com 2,5% de cloro ativo, adicionando-se uma gota de Tween 20 para cada 100 mL de solução, durante 20 minutos, seguida de três lavagens em água esterilizada. A inoculação dos explantes se deu em meio básico MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) sem reguladores de crescimento, acrescido de 30g/L de sacarose e 8,25 g/L de ágar. O pH do meio foi ajustado

para 5,7 antes da autoclavagem, a 120 °C por 20 minutos. Em todos os casos, a incubação foi mantida a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 16h luz/ 8h escuro e intensidade luminosa de 30 $mmolm^{-2}s^{-1}$.

Foram utilizados 15 recipientes por tratamento, com três explantes cada um, e as observações realizadas nos períodos de 5, 10, 15, 20 e 25 dias após a inoculação, avaliando-se o número de explantes regenerados e contaminados

Após o período de germinação foi verificado a contaminação por fungos nos frascos utilizados para o cultivo *in vitro*, sendo incubado, durante 10 dias a temperatura de 30ºC e submetido a luz florescente e posteriormente identificados.

A identificação fitológica foi realizada em colônia de fungos por frasco contaminado.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 5 (cinco tipos de explantes e cinco períodos de avaliação) com quinze repetições. Os dados referentes ao número de explantes regenerados e contaminados foram transformados em $\sqrt{x+1}$ e analisados mediante o procedimento "General Linear Model SAS/STAT... 2000, versão 8.2 e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 encontra-se o resumo da análise a variância referente as variáveis número de explantes contaminados e regenerados. Observa-se efeito significativo para tratamentos e períodos de avaliação em relação ao número de explantes regenerados e contaminados, com interação significativa para número de explantes contaminados.

O resultado do desdobramento da interação tipos de explantes x períodos de avaliação

TABELA 1. Resumo da análise de variância para número de explantes contaminados e regenerados.

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios(1)	
		Contaminação	Regeneração
Tipos de explantes (T)	4	15,78 **	13,41 **
Períodos (PA)	4	0,46 **	0,22 **
(T x PA)	16	0,39 **	0,05 ns
Erro	350	0,03	0,04
CV (%)		12,861	13,104

ns não significativo
** Significativo (P < 0,01)
(1) Dados transformados em $y = \sqrt{x+1}$

relativo ao número de explantes contaminados é apresentado na Tabela 2, na qual se verifica que as médias de contaminação dos tipos de explantes SI (semente inteira) e SQ (semente quebrada) não diferiram estatisticamente entre si; entretanto, o tipo de explante SI apresentou, aos 10 dias, 100% de contaminação (Figura 1). Os tipos de explantes SST (semente sem tegumento), EENEA (eixo embrionário obtido de semente não embebida em água estéril) e EEEA (eixo embrionário obtido de semente embebida em água estéril), apresentaram menores valores de contaminação nos períodos de 5, 10, 15 e 20 dias de avaliação (Figura 2); aos 25 dias, os explantes SI, SQ e SST não apresentaram diferenças significativas entre si, tendo o tipo de explante SI mostrando os maiores valores de contaminação. Os tipos de explantes EENEA e EEEA indicaram os menores valores de contaminação. Este alto valor de contaminação em sementes de mamona com tegumento também foi constado por CARVALHO et al. (2002) o que provavelmente, pode ser atribuído à ineficiência do tratamento de desinfestação utilizado.

Na Figura 3, encontra-se os valores médios de regeneração em função do tipo de explante utilizado, na qual se observa, que o maior número de explantes regenerados ocorreu quando se utilizaram os tipos de explantes SST, EENEA e EEEA, com média de 2 explantes. Os tipos de

TABELA 2. Valores médios do número de explantes contaminados nos períodos de avaliação.

Tipos de explantes	Períodos (dias)				
	5	10	15	20	25
SI	2,33 A	3,00 A	3,00 A	3,00 A	3,00 A
SQ	2,40 A	2,40 A	2,40 A	2,40 A	2,40 A
SST	0,20 B	0,20 B	0,20 B	0,40 B	2,60 A
EENEA	0,00 B	0,00 B	0,00 B	0,00 B	0,00 B
EEEA	0,00 B	0,00 B	0,00 B	0,00 B	0,00 B
CV (%)		12,861			

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.
SI (semente inteira).
SQ (semente quebrada).
SST (semente sem tegumento).
EENEA (eixo embrionário a partir de sementes não embebidas em água estéril).
EEEA (eixo embrionário a partir de sementes embebidas em água estéril por 24 horas).

explantes SI e SQ, mostraram valores médios menores de regeneração, observando-se correlação negativa entre o número de explantes regenerados e contaminados, estimado em r = -0,76. Nesta Figura, também se pode observar que as sementes sem tegumento apresentaram valores superiores em relação as sementes inteiras e quebradas devido, provavelmente, à maior facilidade de regeneração pela extração do tegumento e à menor interferência de microrganismos. Segundo AZEVEDO et al. (1997), a dormência das sementes de mamona pode ser superada com a remoção da carúncula e quebra da casca neste lado da semente. Resultados semelhantes foram encontrados por CARVALHO et al. (2002), em trabalhos de quebra de dormência em sementes de mamona. Verifica-se também, utilizando-se eixo embrionário como explante a ocorreu menor incidência de patógenos e, consequentemente, maior número de explantes regenerados.

Com relação aos períodos de avaliação, não foram encontrados modelos matemáticos que explicassem o comportamento da contaminação

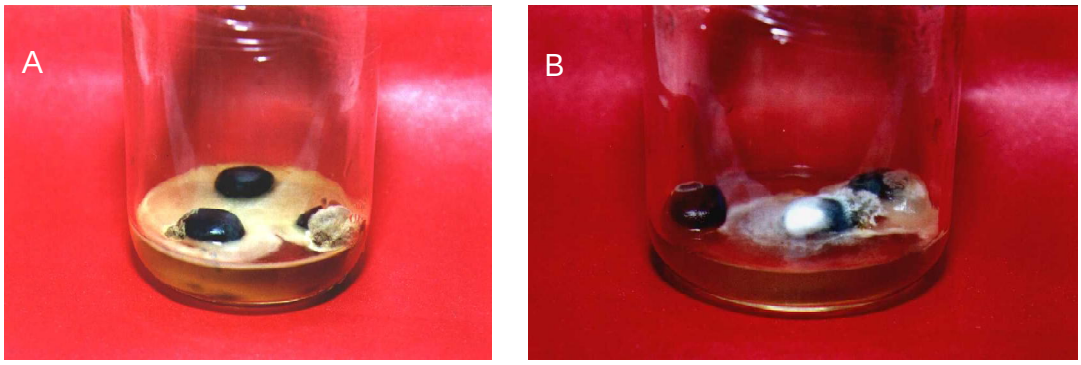

FIG 1. Os explantes contaminadas com fungos gênero (*Aspergillus flavus* sp). (A) sementes inteiras e (B) sementes quebradas ,

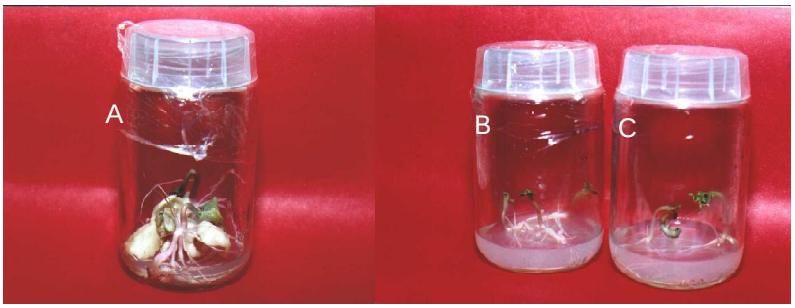

FIG 2. Regeneração das sementes (A) sem tegumento, (B) eixo embrionário obtido de semente não embebida em água estéril e (C) eixo embrionário obtido de semente embebida em água estéril.,

relativo aos métodos de regeneração de semente quebrada e semente sem tegumento. Para os tipos de explantes eixo embrionário obtido de semente não embebida em água estéril e eixo embrionário obtido de semente embebida em água estéril, não se verificou efeito dos períodos de avaliação sobre a contaminação dos mesmos, justificado pelos maiores valores de regeneração nesses tratamentos.

Na Figura 4 encontra-se o número de sementes inteiras contaminadas em função dos períodos de avaliação, na qual se constata crescimento do número de explantes contaminados até 10 dias após a inoculação. Após este período, houve estabilidade no número de sementes contaminadas, cujo valor estimado foi de 2,86 caracterizando uma resposta linear em Plateau. Verifica-se também que 92% da variabilidade se explicam através do modelo considerado.

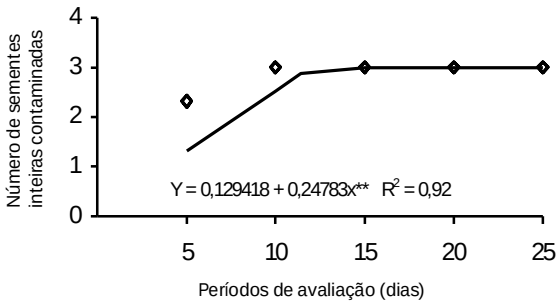

FIG 4. Número de sementes inteiras contaminadas em função dos períodos de avaliação

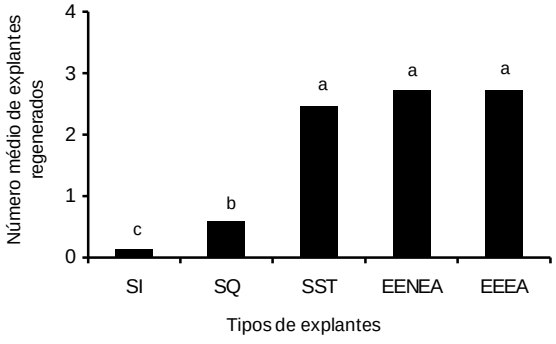

FIG 3.. Valores médios do número de explantes regenerados em função do tipo de explante. SI (semente inteira), SQ (semente quebrada) SST (semente sem tegumento), EENEA (eixo embrionário não embebido em água estéril) e EEEA (eixo embrionário embebido em água estéril).

Os principais tipos de fungo contaminantes encontrados nos explantes, foram: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus sp, Penicillium sp* e *Alternaria,* com maior incidência do gênero *Aspergillus*.

Os fungos encontrados induzem a formação de várias doenças, no entanto, provocam danos as sementes, por exemplo, (Aspergillus e Penicillium) são fungos característicos ao processo de armazenamento e provoca: a)

decréscimo de germinação; b) descoloração bioquímicas; e) produção de toxinas; f) modificações celulares entre outros. (SOAVE,1987) .

CONCLUSÕES

1. Os tipos de explantes EENEA (eixo embrionário obtido de semente não embebida em água estéril) e EEEA (eixo embrionário obtido de semente embebida em água estéril), são os mais indicados para o processo de regeneração *in vitro* da mamoneira.

2. Os tipos de explantes SI (sementes inteira) e SQ (sementes quebra), não são indicados para o processo de regeneração *in vitro* da mamoneira.por apresentar alto nível de contaminação por fungo gênero (*Aspergillus flavus* sp)..

REFERÊNCIA

AZEVEDO, D.M.P. de; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M.; VIEIRA, D.J.; NOBREGA, L.B. da; DANTAS, E.S.B.; ARAÚJO, J.D. de. Recomendação técnica para o cultivo da mamoneira (*Ricinus communis* L.) no Nordeste do Brasil. Campina Grande: Embrapa Algodão, 1977. 51p (Embrapa Algodão. Circular Técnica, 25).

CARVALHO, J.M.F.; PIO, K.B.; SANTOS, W. dos S.; ALMEIDA, F. de A.C. Germinação e contaminação de sementes de mamoneira *in vitro* mediante quebra de dormência e desinfecção. Revista Brasileira Oleaginosas e Fibrosas, v. 6, n. 1, p. 483 a 490, jan-abr. 2002.

GAILLARD, Y.; PEPIN, G. Poisoning by plant material: review of human cases and analytical determination of main toxins by higher-performance liquid chromatography- (tandem) mass spectrometry. Journal of Chromatography, v. 733, p. 181-229, 1999.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, v.15, p. 473 a 497, 1962.

SAS/STAT User's Guide. In: SAS INSTITUTE. SAS online Doc: Version.Cary, 2000. CDROM.

SAVY FILHO, A. Mamoneira: técnicas de cultivo. O Agronômico, Campinas, v. 53, n. 1, p.1., 2001.

SCAVONE, O.; PANIZZA, S. Plantas tóxicas. São Paulo: CODAC-USP, 1980. 230p.

SOAVE, J; WETEL, M.M.V.S Patologia de Sementes. Campinas-SP. Fundação Cargill, 1987,480p

THOMAS, C.A. Plant diseases. The Yearbook of Agriculture, p.867-868, 1953.

VIEIRA, R. de M.; LIMA, E.F. Importância sócioeconômica e melhoramento genético da mamoneira no Brasil. Disponível em: < www.embrapa.br > Acesso em: 15/05/2003.

WAUGH, D. L.;CATE JR.; R.B.;NELSON, C.A.& MANZANO, A. .New concepts in biological and economical interpretations of fertilizer response. In EMBRAPA Interpretação de Resultados de Adubação. Brasília. 15p, 1974.