

INDUÇÃO DO SUPERBROTAMENTO DA MAMONA BRS-PARAGUAÇU ATRAVÉS DO CULTIVO *IN VITRO*

Silvany de Sousa Araújo³, Julita Maria Frota Chagas Carvalho¹, Marina Medeiros de Araújo Silva²,
Maria Jaislanny Lacerda e Medeiros², Máira Milani¹

¹Embrapa Algodão, julita@cnpa.embrapa.br; maira@cnpa.embrapa.br, ²Universidade Federal Rural de Pernambuco, marinamedeirosas@yahoo.com.br; jaislanny@yahoo.com.br, ³UEPB, ny_araujo@hotmail.com

RESUMO - A multibrotação *in vitro* ocorre a partir de um único explante cultivado nas condições ideais, podendo gerar várias plantas geneticamente iguais, em um curto espaço de tempo. Objetivou-se induzir o superbrotamento da mamona na cultivar BRS Paraguaçu, determinando o melhor meio nutritivo suplementado com diferentes concentrações de sais do meio MS, fonte de carbono e fitoreguladores. Sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio e lavadas em água bidestilada estéril. Em seguida, cultivadas em meio MS suplementado com vitaminas do meio B₅. Retirou-se da planta matriz a gema apical, a qual foi inoculada em frascos contendo diferentes concentrações do meio MS, glicose e fitoreguladores. Utilizaram-se 10 frascos por tratamento, cada um contendo três explantes, em um delineamento inteiramente casualizado. Observou-se que as maiores médias para induzir o superbrotamento foram obtidas pelo emprego da combinação dos reguladores TDZ + GA₃; pelo uso do meio MS básico e pela utilização da glicose a 45%; verificou-se também, que a combinação de TDZ com o meio MS básico e glicose a 30% apresentou, em todas as interações triplas, elevado índice de brotos por explante. Assim, constatou-se que as diferentes concentrações de meio MS, glicose e fitoreguladores influenciam no superbrotamento neste genótipo.

Palavras-chave: micropropagação, *Ricinus communis* L., cultura de tecidos.

INTRODUÇÃO

A mamoneira (*Ricinus communis* L.), planta de alto valor econômico tem nas sementes, como produto final processado o óleo e a torta. O primeiro é utilizado na fabricação aproximadamente 650 produtos, com a vantagem de serem biodegradáveis e de biomassa renovável. A torta é bastante usada como fertilizante, podendo ser utilizada para ração de bovinos desde que passe por um processo de desintoxicação (GONÇALVES et al., 2005).

Segundo Chierice e Claro Neto (2001), a partir do óleo da mamona pode-se obter também o diesel vegetal, que substitui o óleo diesel derivado do petróleo no uso como combustível. Para o Brasil, o óleo da mamona pode ser considerado uma matéria-prima estratégica, pois além de seu potencial químico e energético, os lubrificantes e fluidos aeronáuticos são todos sintetizados a partir de suas moléculas.

A propagação clonal *in vitro* ocorre a partir de um único explante cultivado nas condições

ideais, podendo gerar várias plantas geneticamente idênticas as do exemplar original e em menor espaço de tempo. Utiliza-se para indução do superbrotamento, a organogênese direta, a qual se refere ao surgimento direto de gemas a partir de tecidos (câmbio vascular, base do pecíolo em dicotiledôneas, base de folhas e escamas em bulbos de monocotiledôneas e segmentos de raízes, dentre outros) que apresentam o potencial morfogênético na planta in vivo, mas, em geral, não se expressam (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Vários fatores determinam a capacidade do explante desenvolver e regenerar, como a espécie, origem dos cultivos, tipos de explante, estado fisiológico dos mesmos, composição do meio nutritivo, concentrações de reguladores de crescimento, luz, temperatura, umidade entre outros (HU; WANG, 1983).

O objetivo deste trabalho foi induzir o superbrotamento da mamona na cultivar BRS Paraguaçu, determinando o melhor meio nutritivo suplementado com diferentes concentrações de sais do meio MS, fonte de carbono e fitoreguladores.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Cultura de Tecidos, do setor de Biotecnologia da Embrapa Algodão, em Campina Grande – PB.

Sementes da cultivar BRS Paraguaçu foram desinfestadas em hipoclorito de sódio a 2% de cloro ativo por vinte minutos e lavadas em água bidestilada estéril, permanecendo imersas durante vinte e quatro horas; posteriormente, foram excisados das sementes os eixos embrionários e cultivados em meio básico MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com vitaminas do meio B₅ (GAMBORG et al., 1968), 30 g.L⁻¹ de sacarose e 5,5 g.L⁻¹ de ágar. As culturas foram incubadas no escuro, por 48 – 72 horas, e mantidas a 25 ± 2 °C com um fotoperíodo 16h de luz e intensidade luminosa de 40 μmol m⁻²s⁻¹.

O explante analisado constou de gema apical. Após o desenvolvimento da planta matriz, estes foram inoculados em frascos contendo 20 ml de meio de cultivo. Utilizou-se três concentrações de meio MS: M1 (MS com metade dos nutrientes do meio), M2 (MS básico) e M3 (MS básico + com metade dos nutrientes do meio MS); três concentrações de glicose: G1 (20%), G2 (30%) e G3 (45%); e três combinações dos reguladores de crescimento Tidiazuron (TDZ) e Ácido giberélico (GA₃): R1 (0,2 TDZ + 0,0 GA₃), R2 (0,0 TDZ + 0,02 GA₃), R3 (0,2 TDZ + 0,02 GA₃) e testemunha: R0 (0,0 TDZ + 0,0 GA₃), distribuídos em 36 tratamentos.

O delineamento experimental empregado foi inteiramente casualizado com esquema fatorial 3 x 3 x 4 (3 concentrações de meio MS x 3 concentrações de glicose x 4 combinações de reguladores de crescimento). Utilizou-se 10 frascos por tratamento contendo 3 explantes cada. Após 60 dias, os

explantes foram avaliados, observando-se o número de brotos por explante. Foi considerado superbrotamento os explantes que apresentaram mais de dois brotos.

Os dados referentes ao número de brotos por explante foram analisados mediante o software Sisvar (FERREIRA, 2000) e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 encontra-se o resumo da análise da variância referente ao número de brotos por explante. Observa-se efeito significativo para o uso de regulador, de meio e para as interações entre regulador x meio, regulador x glucose, além da interação tripla entre regulador x meio x glucose.

Nas Tabelas 2 e 3 tem-se o resultado do desdobramento da interação significativa entre regulador x meio e regulador x glucose, respectivamente. Verifica-se, na Tabela 2, que o uso do meio básico MS com a combinação de 0,2 TDZ + 0,02 GA₃ (M2 x R3) apresentou o maior número de brotos por explante, mostrando que o ácido giberélico, apesar de não ser tão utilizado no superbrotamento, neste trabalho, apresentou efeito satisfatório. A Tabela 3 apresenta o resultado do desdobramento entre regulador x glucose; observa-se que as interações G2 e G3 com R1 e R3 não diferiram estatisticamente, proporcionando maior número de brotos por explante.

De acordo com George, 1996 citado por Fráguas et al. (2004), o principal efeito das giberelinas, é o alongamento das brotações durante a multiplicação *in vitro* e varia conforme a interação existente com outros reguladores de crescimento, dependendo da espécie propagada.

Na maioria dos casos, o TDZ tem apresentado resultados superiores em relação as outras citocininas na indução e multiplicação de brotos de várias espécies (SOUZA et al., 1998 citado por SALGADO et al., 2001). Assim como neste trabalho (Figura 1), Kanyand et al. (1994) ao estudar regeneração de amendoim utilizando TDZ, conseguiram alta freqüência de formação de brotos em baixas concentrações deste fitohormônio.

Também foi constatado que os tratamentos que não foram suplementados como os fitoreguladores (R0) não induziram a formação de multibrotações, devido ao fato de se considerar superbrotamento apenas acima de dois brotos por explante.

Mediante a Tabela 4, constata-se resultado significativo com meio x regulador/ glucose, observando que as interações R1 x M2G2, R1 x M3G1, R1 x M3G3, R2 x M3G1, R3 x M2G1, R3 x M2G2 e R3 x M3G3 não apresentaram diferença estatística, formando um maior número de brotos por explante. Nos dados contidos na Tabela 5, pela interação glucose x meio/ regulador, tem-se melhor número de multibrotações em G1 x M3R2, G3 x M3R1 e G3 x M3R3.

Pelos resultados da maior quantidade de brotos por gema apical, percebe-se que M2 x R1G2, M2 x R2G3, M2 x R3G1, M2 x R3G2 e M3 x R1G3 foram mais eficientes, não diferindo estatisticamente, na interação meio x regulador/ glicose (Tabela 6).

Em todas as concentrações de meio MS, constatou-se formação de calos na base dos explantes nos tratamentos em que o TDZ foi adicionado. Entretanto, quando a concentração do meio MS foi reduzida (MS meia força), ocorreu maior crescimento dos calos; resultados também apresentados por Silva et al. (2003) trabalhando com carqueja e por Josekutty (1998) em *Hydrocotyle asiatica* L.

Averiguou-se também que no meio MS meia força, os explantes subcultivados com TDZ apresentavam-se amarelados, pouco desenvolvidos e com formação excessiva de calos na base. Esses sintomas acentuaram-se no segundo subcultivo, onde os explantes definharam e morreram. Esse efeito do TDZ foi reportado por Graça et al. (2001) na multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus dinnii* MAID. E por Molinar et al. (1996) com brotações de *Cercis canadensis*.

CONCLUSÃO

As maiores médias para induzir o superbrotamento da mamoneira foram obtidas no meio MS básico, suplementado com a combinação dos reguladores TDZ + GA₃, com 45% de glicose;

Nas interações entre regulador x meio e regulador x glicose, a combinação de TDZ + GA₃ no meio MS básico suplementado com 45% de glicose e com TDZ + GA₃, proporcionaram maior número de brotos por explante, respectivamente;

A combinação de TDZ no meio MS básico com 30% de glicose apresentou, em todas as interações triplas, elevado índice de multibrotações por explante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHIERICE, G. O.; CLARO NETO, S. Aplicação industrial do óleo. In: AZEVEDO, D. M. P.; LIMA, E. F. (Ed.) **O Agronegócio da mamona no Brasil**, Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2001.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos, **Anais...** São Carlos: UFScar, p. 255-258.

FRÁGUAS, C. B.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R. Multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L.: Efeito da cinetina e do ácido giberélico. **Cienc. Agrotec.**, v. 28, n. 1, p. 49-55, jan./fev. 2004.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Exp cell Res.** v. 50, p. 151-158. 1968.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa SPI / Embrapa CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.

GONÇALVES, N. P.; FARIAS, M. A. P. V. R.; SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D. Cultura da Mamoneira. **Informe Agropecuário: Produção de oleaginosas para biodisel,** Belo Horizonte, v. 26, p. 28-32, 2005.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. A.; AMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. **Handbook of plant culture: techniques for propagation and breeding.** New York: Mcmillan, v. 4, 1983. p. 117-227.

KANYAND, M.; DESSAI, A. P.; PRAKASH, C. S. Thidiazuron promotes high frequency regeneration of peanut (*Arachis hypogea*) plants in vitro. **Plant Cell Reports,** v. 14, p. 1-5. 1994.

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

SALGADO, S. M.; CUNHA, R. L.; TEIXEIRA, H.; PASQUAL, M. Efeitos da utilização de TDZ e Benomyl na micropropagação do Crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvellev.) **Cienc. Agrotec.,** v. 25, p. 274-280, mar./abr. 2001.

Tabela 1. Resumo da análise da variância referente ao número de brotos por explante.

Fontes da variação	GL	Quadrados Médios
Regulador	3	137,164 **
Meio	2	299,121 **
Glucose	2	1,600 NS
Regulador x Meio	6	36,570 **
Regulador x Glucose	6	3,238 **
Meio x Glucose	4	1,137 NS
Regulador x Meio x Glucose	12	5,195 **
Erro	324	0,584
CV ¹ (%)		27,22

¹Coefficiente de variação; ** Significativo ($P \leq 0,01$); NS Não significativa.

Tabela 2. Teste de médias para o desdobramento de regulador dentro de cada meio avaliado.

Meio	Regulador			
	R0	R1	R2	R3
M1	1,00a	1,00a	1,00a	1,00a
M2	1,00a	4,96c	4,15b	5,51d
M3	1,00a	4,80c	3,96b	4,31b

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente, pelo teste de Skott-Knott, a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Teste de médias para o desdobramento de regulador dentro de cada concentração de glucose.

Glucose	Regulador			
	R0	R1	R2	R3
1	1,00a	3,32b	3,42b	3,21b
G2	1,00a	3,56c	2,87b	3,54c
G3	1,00a	3,87c	2,82b	4,07c

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente, pelo teste de Skott-Knott, a 5% de probabilidade.

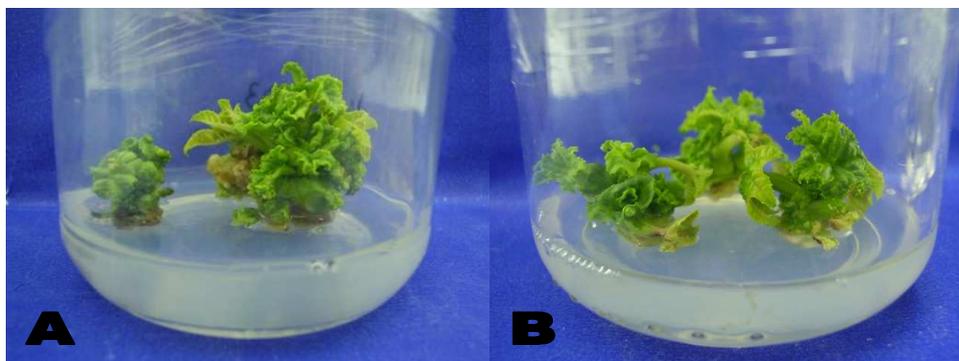


Figura 1. A - B) Superbrotamento da cultivar BRS Paraguaçu da mamoneira.

Tabela 4. Teste de médias para o desdobramento de regulador dentro da combinação meio/ glucose.

Meio/Glucose	Regulador de Crescimento			
	R0	R1	R2	R3
M1G1	1,00a	1,00a	1,00a	1,00a
M1G2	1,00a	1,00a	1,00a	1,00a
M1G3	1,00a	1,00a	1,00a	1,00a
M2G1	1,00a	4,24b	4,37b	5,46c
M2G2	1,00a	5,87c	3,53b	5,45c
M2G3	1,00a	4,78b	4,56b	5,64c
M3G1	1,00a	4,72c	4,91c	3,18b
M3G2	1,00a	3,83b	4,08b	4,18b
M3G3	1,00a	5,85c	2,91b	5,57c

Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente pelo teste de Skott-Knott, a 5% de probabilidade.

Tabela 5. Teste de médias para o desdobramento de glucose dentro da combinação meio/ regulador.

Meio/ Regulador	Glucose		
	G1	G2	G3
M1R0	1,00a	1,00a	1,00a
M1R1	1,00a	1,00a	1,00a
M1R2	1,00a	1,00a	1,00a
M1R3	1,00a	1,00a	1,00a
M2R0	1,00a	1,00a	1,00a
M2R1	4,24a	5,87b	4,78a
M2R2	4,37b	3,53a	4,56b
M2R3	5,46a	5,45a	5,64a
M3R0	1,00a	1,00a	1,00a
M3R1	4,72b	3,83a	5,85c
M3R2	4,91c	4,08b	2,91a
M3R3	3,18a	4,18b	5,57c

Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente pelo teste de Skott-Knott, a 5% de probabilidade.