COMPOSIÇÃO E CONCENTRAÇÕES DO MEIO DE CULTIVO SOBRE O SUPERBROTAMENTO IN VITRO DA MAMONEIRA NA CULTIVAR BRS PARAGUAÇU

JULITA MARIA FROTA CHAGAS CARVALHO[1], MARINA MEDEIROS DE ARAÚJO SILVA[2], MARIA JAISLANNY LACERDA E MEDEIROS[2], SILVANY DE SOUSA ARAÚJO[2] e MÁIRA MILANI[1]

sRESUMO: O superbrotamento ocorre a partir de um único explante cultivado nas condições ideais, podendo gerar várias plantas geneticamente idênticas, em menor espaço de tempo. Objetivou-se neste trabalho verificar qual o melhor meio nutritivo para indução de superbrotamento na cultivar de mamona BRS Paraguaçu. Os meios testados foram compostos por 3 concentrações de nutrientes do meio MS básico (MS com 50% da concentração dos nutrientes, dos nutrientes, MS e MS com 150% da concentração de nutrientes), 3 concentrações de glicose (20%, 30% e 45%) e 4 combinações de reguladores de crescimento (0,2mg.L^{-1}TDZ + 0 GA3, 0 TDZ + 0,02mg.L^{-1} GA3, 0,2mg.L^{-1} TDZ + 0,02mgL^{-1} GA3 e 0 TDZ + 0 GA3), com 30 repetições em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial. As plantas matrizes foram obtidas pelo cultivo de eixos embrionários cultivados em meio MS suplementado com vitaminas do meio B5. Retirou-se da planta matriz a gema apical, a qual foi inoculada em frascos com combinações das concentrações do meio MS, glicose e fitorreguladores. Para induzir o superbrotamento da cultivar de mamoneira BRS Paraguaçu, o meio MS básico, suplementado com o regulador TDZ e com 30% de glicose é considerado o mais eficiente, com média de 5,87 brotos por explante.

Termos para indexação: micropropagação, reguladores de crescimento, *Ricinus communis* L.

COMPOSITION AND CONCENTRATIONS OF THE CULTURE MEDIUM IN THE MULTIPLE SHOOTS IN VITRO OF CASTOR BEAN CULTIVATING BRS PARAGUAÇU

ABSTRACT: The multiple shoots occurs from an only explant cultivated in the ideal conditions, being able to generate some genetically identical plants, within a limited space and time period. The aim of this work was test the best medium to induce multiple shoots in castor bean BRS Paraguaçu. It was test 3 concentrations of MS (50% MS, MS e 150%MS), 3 concentrations of glucose (20%, 30% e 45%) and 4 regulator concentrations (0,2mg.L^{-1} TDZ + 0 GA3, 0 TDZ + 0,02mg.L^{-1} GA3, 0,2mg.L^{-1} TDZ + 0,02mgL^{-1}GA3 e 0 TDZ + 0 GA3), with 30 replications, at a randomized entirely design. The first plants were obtained by embryo axis cultivated in MS medium supplemented with vitamins of the B5 medium. The apical egg yolk left of the first plant, which was inoculated in flasks contending different concentrations of the MS medium, glucose and growth regulators. It was observed that to induce multiple shoots in castor bean cultivar BRS Paraguaçu, the basic MS medium supplemented with the regulator TDZ, with 30% glucose is considered the most efficient, with an average of 5.87 shoots per explant.

Index terms: micropropagation, growth regulators, *Ricinus communis* L.

[1]Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário, CEP 58428-095, Campina Grande, PB. julita@cnpa.embrapa.br; maira@cnpa.embrapa.br

[2]Universidade Federal Rural de Pernanbuco - UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE. marinamedeirosas@yahoo.com.br; jaislanny@yahoo.com.br; ny@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A mamona (*Ricinus communis* L.), oleaginosa de importância econômica e social, é largamente difundida e cultivada em diversos países para a extração do óleo das suas sementes, utilizado como lubrificante, purgativo e na fabricação de tinta, verniz e plástico; além disso, a torta, subproduto da extração do óleo, é empregada como adubo orgânico, apresentando também efeito nematicida.

A mamoneira é capaz de produzir satisfatoriamente sob condições de baixa precipitação pluvial, embora sua produtividade seja afetada; por ser tolerante ao clima adverso, serve desta forma, como uma das poucas alternativas de trabalho e de renda para o agricultor da região semiárida do Nordeste brasileiro (VIEIRA e LIMA, 2005). Em virtude do amplo aproveitamento e do emprego dos produtos obtidos, tanto do fruto como dos resíduos vegetais, a ricinocultura representa, para a economia do semiárido do Nordeste, um centro gerador de mão-de-obra, de emprego e matéria-prima, visto que a mamoneira é uma cultura bastante adaptada ao clima da região (BELTRÃO et al., 2006).

A propagação clonal *in vitro* é uma técnica biotecnológica eficiente na multiplicação de genótipos, aumentando a frequência de transformação por meio da indução de superbrotamento. Este ocorre a partir de um único explante cultivado nas condições ideais, podendo gerar várias plantas geneticamente idênticas às do exemplar original e em menor espaço de tempo (VIDAL et al., 2005). 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 morfogenético na planta *in vivo*, mas, em geral, não se expressam (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Vários fatores - 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 - determinam a capacidade do explante desenvolver-se e regenerar-se (HU e WANG, 1983).

O objetivo deste trabalho foi verificar qual o o melhor meio nutritivo para indução de superbrotamento na cultivar de mamona BRS Paraguaçu.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Cultura de Tecidos, do setor de Biotecnologia da Embrapa Algodão, em Campina Grande - PB, em 2008.

Foram desinfestadas sementes da cultivar BRS Paraguaçu, 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, os eixos embrionários foram retirados das sementes e cultivados em meio básico MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com vitaminas do meio B_5 (GAMBORG et al., 1968), 30g.L^{-1} de sacarose e 5,5g.L^{-1} de ágar. As culturas foram incubadas no escuro, por 48 a 72 horas, e mantidas a 25 ± 2°C com um fotoperíodo de 16h de luz e intensidade luminosa de 40 μmol $m^{-2}s^{-1}$.

Em câmara de fluxo laminar e com o auxílio de instrumentos cirúrgicos e esterilizados, gemas apicais de mamoneira, originadas a partir de plântulas germinadas *in vitro*, com 25 dias, foram excisadas e inoculadas em frascos, contendo 20 mL de meio de cultivo. Utilizaram-se três concentrações de nutrientes do meio MS: M1

(MS com metade dos nutrientes do meio), M2 (MS básico) e M3 (MS básico + MS com metade dos nutrientes do meio); três concentrações de glicose: G1 (20%), G2 (30%) e G3 (45%); e três combinações dos reguladores de crescimento Tidiazuron (TDZ) e Ácido giberélico (GA_3): R1 (0,2 mg.L^{-1} TDZ + 0,0 GA_3), R2 (0,0 TDZ + 0,02 mg.L^{-1} GA_3), R3 (0,2 mg.L^{-1} TDZ + 0,02 mg.L-1 GA3) e testemunha: R0 (0,0 TDZ + 0,0 GA_3). Empregou-se um delineamento experimental 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), totalizando 36 tratamentos, com 30 repetições, sendo que usaram-se 10 frascos, contendo 3 explantes cada. Após 60 dias, os explantes foram avaliados, observando-se o número de brotos por explante. Os dados referentes ao número de brotos por explante foram analisados mediante o software Sisvar (FERREIRA, 2000) com dados transformados para $\sqrt{x}$ e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resumo da análise de variância encontra-se na Tabela 1 e o teste de médias na Tabela 2. Observa-se que houve variações significativas ($P<0,01$) para as concentrações de sais no meio e concentração de reguladores, pelo teste F. Não se verificou efeito das concentrações de glicose ($P<0,05$, teste F). Ocorreram interações significativas para os efeitos de regulador x meio, regulador x glicose e a interação tripla regulador x meio x glicose ($P<0,01$, teste F). Não ocorreu interação entre os fatores meio x glicose. Infere-se por estes resultados que a concentração de glicose não afeta a produção de brotos, nas condições deste trabalho.

A adição de fitorreguladores é essencial para indução de brotações, visto que em todas as concentrações de meio e glicose utilizadas, em que estes não foram adicionados, não ocorreu a formação de brotos (Tabela 2, Figura 1). O meio MS com metade dos nutrientes também é ineficiente para a indução de brotações (Tabela 2).

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

Fonte de variância	GL	Quadrados Médios
Regulador	3	137,164 **
Meio	2	299,121 **
Glicose	2	1,600 NS
Regulador x Meio	6	36,570 **
Regulador x Glicose	6	3,238 **
Meio x Glicose	4	1,137 NS
Regulador x Meio x Glicose	12	5,195 **
Erro	324	0,584
CV[1] (%)		27,22

[1] Coeficiente de variação

** Significativo ($P \leq 0,01$), pelo teste F

NS Não significativo pelo teste F ($P<0,05$)

TABELA 2. Teste de médias para número de brotos por explante para o desdobramento de regulador dentro da combinação meio*glicose

Regulador* Glicose	Meio		
	M1	M2	M3
R0G1	1,00a	1,00a	1,00a
R0G2	1,00a	1,00a	1,00a
R0G3	1,00a	1,00a	1,00a
R1G1	1,00a	4,24b	4,72b
R1G2	1,00a	5,87c	3,83b
R1G3	1,00a	4,78b	5,85c
R2G1	1,00a	4,37b	4,91b
R2G2	1,00a	3,53b	4,08b
R2G3	1,00a	4,56c	2,91b
R3G1	1,00a	5,46c	3,18b
R3G2	1,00a	5,45c	4,18b
R3G3	1,00a	5,64b	5,57b

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem significativamente pelo
teste de Tukey a 5% de probabilidade.

M1 (MS com metade dos nutrientes do meio), M2 (MS básico) e M3 (MS básico + MS com metade dos nutrientes do meio); 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 mg.L-1 TDZ + 0,0 GA3), R2 (0,0 TDZ + 0,02 mg.L^{-1} GA3), R3 (0,2 mg.L^{-1} TDZ + 0,02 mg.L^{-1} GA3) e testemunha: R0 (0,0 TDZ + 0,0 GA3)

FIG. 1. Explante de gema apical sem a adição de fitorreguladores (testemunha - R0).

Em todas as concentrações de meio MS, constatou-se formação de calos na base dos explantes nos tratamentos em que o TDZ foi adicionado (Figura 2). Entretanto, quando a concentração do meio MS foi reduzida, ocorreu maior crescimento dos calos; resultados semelhantes foram apresentados por Silva et al. (2003), trabalhando com *Baccharis trimera* (Less.), e por Josekutty (1998), em *Hydrocotyle asiatica* L., onde o meio de cultura com 50% da concentração dos sais MS, vitaminas e inositol mostrou-se mais eficiente na indução e no crescimento de calose.

FIG. 2. Formação de calos na base de explantes em meio suplementado com TDZ

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. Os 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*.

Estudando-se o efeito do meio dentro da combinação regulador*glicose, constatou-se resultado significativo. Observou-se que M2 não apresentou diferença estatística significativa dentro das combinações R1G1, R2G1, R2G2 e R3G3. Verificou-se também que a maior quantidade de brotos por gema apical foi obtida utilizando-se o M2 nas combinações R1G2, R2G3, R3G1, R3G2 (Tabela 2). No entanto, apesar de eficiente na indução do superbrotação, o efeito do M2, em combinação com R1G2, foi considerado o mais viável, por dispensar o uso de GA_3 (Figura 3) e produzir em número absoluto, maior quantidade de brotações.

As giberelinas aumentam a elongação e a divisão celular, evidenciadas pelo aumento do comprimento da célula e do número de células em resposta à aplicação deste fitorregulador. De acordo com Fráguas et al. (2004), seu principal efeito é o alongamento das brotações durante a multiplicação *in vitro* e varia conforme a interação existente com outros reguladores de crescimento e da espécie propagada.

Diferentemente deste trabalho, Han et al. (1997) verificaram que o TDZ numa concentração acima de 0,01mg.L^{-1} não promoveu a multiplicação de brotos em *Ficus benjamina*. Esses resultados estão de acordo com Salgado et al. (2001), na propagação de *Hibiscus syriacus* L. Graça et al. (2001) obtiveram menores números de brotações de *Rhododendron simsii* Hellmut Vogel, em relação

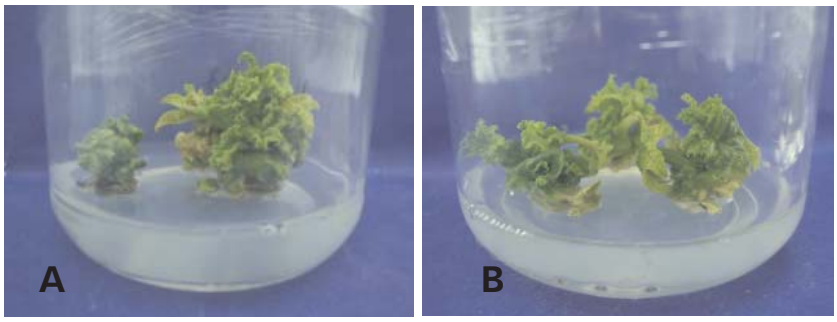

FIG. 3. (A) e (B) Superbrotamento da cultivar de mamoneira BRS Paraguaçu

a outras citocininas, e necessitaram de um período de alongamento quando o TDZ foi utilizado.

Na maioria dos casos, o TDZ tem apresentado resultados superiores em relação às outras citocininas na indução e multiplicação de brotos de várias espécies (SALGADO et al., 2001). Assim como neste trabalho, Silva et al. (2003) induziram maiores valores de brotos em meios suplementados com TDZ. Resultados semelhantes foram constatados por Centellas (1996), que obteve melhores valores de multiplicação in vitro de macieira em concentrações pequenas de TDZ, como também por Kanyand et al. (1994), que, ao estudarem regeneração de amendoim utilizando TDZ, conseguiram alta frequência de formação de brotos em baixas concentrações deste fitorregulador.

CONCLUSÃO

O meio MS básico, suplementado com o regulador tidiazuron e 30% de glicose é considerado o mais eficiente para induzir o superbrotamento da cultivar de mamoneira BRS Paraguaçu.

REFERÊNCIAS

BELTRÃO, N.E. de M.; CARTAXO, W.V.; PEREIRA, S.R. de P.; SOARES, J.J.; SILVA, O.R.R.F. **O cultivo sustentável da mamona no Semiárido brasileiro**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 64p.

CENTELLAS, A.Q. **Micropropagação da macieira** (*Malus domestica* Borkh). 1996. 82f. Dissertação Mestrado (Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

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.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: 45ª **Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria**. UFSCar. São Paulo, 2000. p.255-258.

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

GRAÇA, M.E.C.; KALIL FILHO, A.N.; MEDEIROS, A.C.S.; TAVARES, F.R. Efeitos das citocininas benzilamino purina e thiadiazuron, na multiplicação *in vitro* de brotações de Eucalyptus Dunnii Maid. **Boletim de Pesquisa Florestal**. Colombo, n.43, p.107-112, jul/dez. 2001.

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.

HAN, B.H.; JOUNG, H.Y.; KO, J.Y. In vitro propagation of Ficus benjamina by shoot tip culture. **Journal of the Korean Society for Horticultural Science**, v.38, n.3, 1997. p.315-319.

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: Maccmillan, v.4, 1983. p.117-227.

JOSEKUTTY, P.C. Callus culture and micropropagation of Hidrocotyle asiatica [*Centelha asiatica* (L.) Urban] a medicinal plant. **Phyton**. Buenos Aires, n.63, v.1/2, 1998. p.275-278.

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

MOLINAR JR, F.; MACKAY, W.A.; WALL, M.M.; CARDENAS, M. Micropropagation of Agarita (*Berberis trifoliata* Moric.). **Horticultural Science**, v.32, n.6, 1996. p.1030-1032.

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

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, mar/abr, 2001. p.274-280.

SILVA, F.G.; PINTO, J.E.B.P.; SALES, J.F.; DIVINO, S.P.; BERTOLUCCI,S. K.V. Efeito da concentração de sais e fitorreguladores na indução de calos em carqueja. **Cienc. Agrotec.**, v.27, n.3, maio/jun, 2003. p.541-547.

VIDAL, M.S.; CARVALHO, J.M.F.C.; LIMA, L.H.G.M.; SOUSA, E.B.M.; SANTOS, J.W. dos. **Indução de múltiplos brotos *in vitro* a partir de ápices caulinares da cultivar de algodão CNPA-ITA 90II**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005. 17p. (Embrapa Algodão. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 63).

VIEIRA, R.M.; LIMA, E.F. **Importância Socioeconômica e melhoramento genético da mamoneira no Brasil**. Disponível em: <http://www.embrapa.br>. Acesso em 15/12/2005.