

CULTIVO *IN VITRO* DE PINHÃO-MANSO

Luciana Bicca Dode (CDTec/UFPel, lucianabicca@gmail.com); Lorena Donini (Bolsista DTI1-Projeto *Jatropha*, EMBRAPA-CPACT, lorenadonini@yahoo.com.br); Luciano Silva Pinto (CDTec/UFPel, dmpLuc@gmail.com); Vera Lúcia Bobrowski (IB/UFPel, vera.bobrowski@gmail.com), Vinícius da Rosa da Silva Tavares (Biotecnologia, UFPel, viniciusdasilvatavares@gmail.com); Frederico Schmitt Kremer (Biotecnologia, UFPel, fred.s.kremer@hotmail.com); Sérgio Delmar dos Anjos e Silva (EMBRAPA-CPACT, sergio.anjos@cpact.embrapa.br);

Palavras Chave: *Jatropha curcas* L., cultura de tecidos, regeneração.

1 – INTRODUÇÃO

O Brasil conta com uma considerável matriz de energia renovável embasada na produção agrícola. Isso contribui para preservação do meio ambiente, geração de empregos no campo, desenvolvimento econômico e social. Nos próximos anos, manter e/ou ampliar essa participação sem dúvida será um dos maiores desafios para a produção agrícola nacional. Neste cenário, novos desafios exigem pesquisa e desenvolvimento tecnológico capazes de proporcionar novas opções econômica e ambientalmente corretas como fonte de óleo, apontando o pinhão-manso como alternativa. *Jatropha curcas* L. além de produzir sementes com elevados teores de óleo é considerada adaptável à diversas condições de cultivo (Divakara et al., 2010; Yadav & Singh, 2010; Koonin, 2006)

Assim, a capacidade de propagação vegetativa ou clonal do pinhão-manso com a produção de mudas com elevados padrões genéticos e sanitários será uma etapa essencial à expansão da cultura.

A produção e comercialização em larga escala exige o estabelecimento de sistemas de propagação capazes de garantir a sanidade e uniformidade dos propágulos, permitindo assim a implantação de cultivos padronizados e com grande potencial produtivo. Ferramentas biotecnológicas contemporâneas tornam-se essenciais, para a aceleração e progresso de programas de melhoramento genético da espécie também garantindo a qualidade e identidade clonal. Vários autores utilizaram folhas, ápices, hipocótilos, nós, entre-nós e cotilédones para o estabelecimento de cultivos *in vitro* de pinhão-manso explorando a organogênese direta e indireta (Soomro & Memon, 2007; Datta et al., 2007; Misra et al., 2010; Pan et al., 2010).

Este estudo foi realizado buscando obter sistemas de cultura de tecidos de pinhão-manso, selecionando explantes com elevado potencial morfogênico, adequando meios e sistemas de cultivo aos genótipos de interesse local e ajustando metodologias que possibilitem através da cultura de células e tecidos obter elevado número de plantas através de organogênese direta ou indireta viabilizando a propagação clonal e/ou engenharia genética.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi implantado a partir de explantes obtidos de sementes de uma população de pinhão-manso do banco de sementes da EMBRAPA-CPACT. Sementes foram descascadas manualmente, selecionadas visualmente e então desinfestadas com etanol 70% (v/v) durante 2 minutos, lavadas com água destilada estéril três vezes, solução de hipoclorito de sódio 1% (P/V) durante três minutos sob agitação, secas sobre papel filtro estéril, distribuídas em placas contendo meio elaborado com a metade dos sais do meio MS, 1% (P/V) de sacarose e 6g de

agar L-1 (Murashige & Skoog, 1962) e incubadas nas condições da sala de cultivo : 25°C e 16h de fotoperíodo.

Após 14 dias, cotilédones foram removidos em condições assépticas, com auxílio de pinça e bisturi, seccionados em quatro, transferidos para placas contendo meio MS, contendo 3% de sacarose, 7g Agar.L⁻¹, 22,2µM 6-benzilaminopurina (BAP) e 1,07µM ácido naftaleno acético (ANA), com a face adaxial em contato com o meio e incubados durante 45 dias nas mesmas condições, sendo repicados a cada 15 dias.

A fim de observar o efeito do balanço auxina/citocinina na organogênese, calos obtidos no período de indução foram repicados para meio MS, 3% sacarose, 1,07µM ANA, 7g.L⁻¹ ágar complementados com 22,2 13,32 ou 4,44 µM de BAP e incubados nas mesmas condições, durante 30 dias. Cada tratamento foi composto por 12 placas contendo cinco explantes. A morfologia dos calos, o percentual de explantes com calos organogênicos e o número de brotos foi avaliado com auxílio de estereomicroscópio, utilizando-se aumento de 4 vezes.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Calos compactos e de coloração verde intensa obtidos nos cotilédones tiveram crescimento rápido nos primeiros 30 dias exigindo sub-cultivos a cada 15 dias.



Figura 1- Calos obtidos em cotilédones de pinhão-manso cultivados 30 dias em meio MS, 3% sacarose, contendo 22,2 µM BAP e 1,07µM de ANA.

Soomro e Menon (2007) consideraram hipocótilos explantes ideais para o estabelecimento de cultivo de calos de pinhão manso, utilizando para indução apenas 2,4D. Cotilédones de pinhão-manso produziram rapidamente massa de calos com grande capacidade de proliferação nas condições deste estudo em meios contendo auxina/citocinina.

Após repicagem para meios contendo diferentes combinações auxina/citocinina observou-se que, aos 30 dias de incubação, os explantes no meio contendo 22,2 µM de BAP mantiveram elevada proliferação e coloração, semelhantes ao observado no estágio de indução sendo que, 26% dos explantes apresentaram estruturas

organogênicas globulares, na superfície nodular dos calos. Explantes incubados nos meios contendo 13,32 ou 4,4 μM de BAP apresentaram coloração mais clara e textura macia, superfície nodular, tendo o número de estruturas globulares, potencialmente organogênicas diminuído nos tratamentos com menores concentrações de citocininas (Figuras 2 e 3). Pan et al. (2010) optaram por transformar geneticamente de forma indireta cotilédones de pinhão, induzindo calogênese e morfogênese em meio contendo 13,32 μM BAP e 0,05 μM ácido indolbutírico (AIB), enquanto Datta et al. (2007) obtiveram sucesso ao utilizar elevadas concentrações de citocininas combinando BAP(2,2-35,6 μM) e sulfato de adenina(55,6 μM) na micropropagação de pinhão-manso.

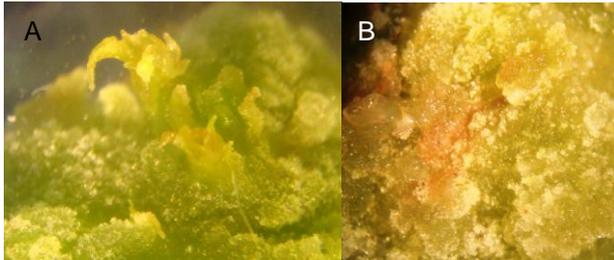


Figura 2. Calos de pinhão-manso cultivados em meio MS, 3% de sacarose, 7g.l⁻¹ de Agar, contendo A-22,2 μM BAP e 1,07 μM ANA, B 13,32 μM BAP e 1,07 μM ANA.

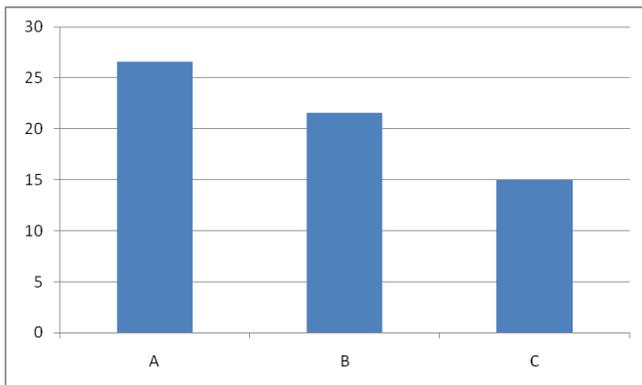


Figura 3. Percentagem de calos de pinhão-manso com estruturas globulares organogênicas após 30 dias de incubação em meios contendo diferentes combinações BAP/ANA

No período analisado, apenas explantes incubados no meio A, apresentaram brotos (0,2 brotos/explante em média) (Figura 4)



Figura 4. Brotos na superfície de calos de pinhão-manso incubados em meio contendo 22,2 μM BAP e 1,07 μM ANA

O sistema de cultivo de tecidos *in vitro* estabelecido a partir de cotilédones de pinhão-manso nos balanços auxina/citocinina avaliados poderá ser utilizado em estudos básicos, para regeneração de plantas através de organogênese indireta e também para a aplicação de técnicas de engenharia genética assim que estejam ajustadas condições para alongamento e enraizamento dos brotos.

5 - AGRADECIMENTOS

FINEP pelo apoio financeiro e EMBRAPA-CPACT pela colaboração.

6 - REFERÊNCIAS

- DIVAKARA, B.N., UPADHYAYA, H.D.; WANI, S.P.GOWDA, C.L.L., Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L: a review. **Applied Energy**, v.87, n.3, p 732-742, 2010.
- YADAV, A.; SINGH, O., Energy estimations for life-cycle analysis of jatropha, neem, and karanja biodiesels-a parametric study. *Proc. I.MechE.* V.224, p.1049-1057, 2010.
- KOONIN, S.E., Getting serious about biofuels. **Science**. V. 311, p.435, 2006.
- SOOMRO, R. & MEMOM, R.A., Establishment of callus and suspension culture in *Jatropha curcas*. **Pak. J. Bot.**, V.39, n.7, p.2341-2441, 2007.
- DATTA, M.M.; MUKHERJEE, B.; GHOSH, B.; JHA, T.B., *In vitro* clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.). **Current Science**, V.93, n.10, 1438-1442, 2007.
- MISRA, P.; GUPTA, N.; TOPPO, D.; PANDEY, V.; MISHRA, M.K.; TULI, R., Establishment of long-term proliferation shoot cultures of elite *Jatropha curcas* L. by controlling endophytic bacterial contamination. **Plant Cell. Tiss. Organ Cult.** V.100, p.189-197, 2010.
- PAN, J; FU, Q., & XU, Z., *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of biofuel plant *Jatropha curcas* using kanamicina selection. **African Journal of Biotechnology**, V.9, n.39, p.6477-6481, 2010.
- MURSHIGE, T. & SKOOG, F., A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant**, n.15, p.473-497, 1962.

4 - CONCLUSÕES