

AVALIAÇÃO DO ESTÍMULO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CITOCININAS EM ÁPICES E COTILÉDONES DE MAMONA (*Ricinus communis* L.) cv BRS-ENERGIA.

FORMOSO, Rafaela¹; CASARIN, Tatiane²; MASIERO, Daniele²; BOBROWSKY, Vera Lúcia³; SILVA, Sérgio Delmar⁴; DODE, Luciana Bicca²

1. Aluna da graduação do curso de Biotecnologia-UFPel; 2. Estagiária laboratório de Biologia Celular e Molecular Vegetal, UFPel; 3. Profa. Instituto de Biologia, UFPel; 4. Embrapa/CPACT 5. Prof. CDTec/UFPel

rafaelasformoso@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma das principais oleaginosas do mundo e se vem destacando como ótima alternativa de exploração para o agronegócio no Brasil, em especial para a região nordeste, com a possibilidade do óleo da mamona ser matéria-prima para a produção do biodiesel (BELTRÃO et al., 2003).

A propagação vegetativa *in vitro* tem sido uma técnica bastante utilizada na mamoneira, em virtude de oferecer vantagens de manutenção de estoques de genótipos e fenótipos de híbridos, mutações genéticas selecionadas, intercâmbio de germoplasma e obtenção de clones de genótipos com caracteres agrônômicos desejáveis, além de garantir mudas com excelente estado fitossanitário (CARVALHO, 1999).

Protocolos eficientes para a regeneração *in vitro* são fundamentais na utilização de técnicas de transformação genética, haja vista que a definição dos parâmetros do meio da cultura de tecidos possibilitará a obtenção de organismos geneticamente modificados de culturas de importância econômica, como a mamoneira.

Segundo Alves et al. (2004), o processo de organogênese é complexo, e múltiplos fatores externos e internos estão envolvidos, havendo interação entre fonte de explante, meio de cultura e fatores do ambiente, dependendo também da ação de reguladores de crescimento exógenos, em particular auxinas e citocininas e da habilidade do tecido em responder a essas mudanças hormonais, durante o período de cultivo (SUGIYAMA, 1999).

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do estímulo promovido por diferentes concentrações de citocininas em ápices e cotilédones de mamona.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

O experimento foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e Molecular Vegetal do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas.

Para obtenção de explantes foram utilizadas sementes do cultivar BRS-Energia germinadas *in vitro*. As sementes foram desinfestadas superficialmente em solução de hipoclorito de sódio 1% (v/v) durante 15 minutos sob agitação e lavadas três vezes em água destilada esterilizada. Depois de secas em papel filtro estéril foram transferidas assepticamente para frascos contendo meio Murashige e Skoog (MS) contendo 3% (p/v) de sacarose, 0,6% (p/v) de ágar, o pH foi ajustado em 5,8 .

As sementes foram incubadas no escuro com temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Os explantes foram obtidos após 14 dias da semeadura.

Os cotilédones e os ápices foram excisados assepticamente, com auxílio de pinça e bisturi, e transferidos para meio de cultivo contendo Ácido indol butírico (AIB) $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e Benzil-amino-purina (BAP) nas concentrações de 6 mg.L^{-1} , $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ou 9 mg.L^{-1} .

Os cotilédones foram incubados durante 28 dias, sendo então repicados para meio contendo $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP e $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB. Para cada tratamento foram realizadas 6 repetições, contendo 1 cotilédone, inoculados com a face abaxial em contato com o meio.

Os ápices após 10 dias foram transferidos para meio de cultivo contendo $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP + $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$ AIB + 6 mg.L^{-1} GA3 e 2 g.L^{-1} de carvão ativado. Para cada tratamento foram feitas 3 repetições, contendo 1 ápice.

Os frascos foram mantidos na sala de cultivo com temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 2$ e fotoperíodo de 16h. O número médio de explantes com calos e o número de brotos foram avaliados aos 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento de um sistema eficiente de transformação genética para mamona exige o aprimoramento das técnicas de cultivo de tecidos *in vitro* e *Ricinus communis* L. tem sido considerada recalcitrante por vários autores (SUJATHA et al., 2008). Contudo, a regeneração a partir de tecidos vegetativos obtidos de plântulas tem gerado alguns resultados que estimulam a investigação e ajuste de novos protocolos (ATHMA & REDDY, 1983; SARVESH et al., 1992; GANESH KUMARI et al., 2008).

A calogênese tem sido obtida com sucesso todavia a regeneração através de organogênese indireta a partir de tecidos cotiledonares é tida como ocasional e relatada como percentualmente baixa (SARVESH et al., 1992, SUJATHA et al.; 2008). Fato também observado nos resultados obtidos neste estudo preliminar onde, analisando-se o número médio de explantes com calos, constatou-se que a organogênese indireta almejada somente será obtida a partir do ajuste do efeito das diferentes concentrações de BAP nas etapas iniciais do processo de indução (até 14 dias). Assim, o maior percentual de explantes com calos foi observado no tratamento utilizando concentração de $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP, 100% dos explantes (Figura 1).

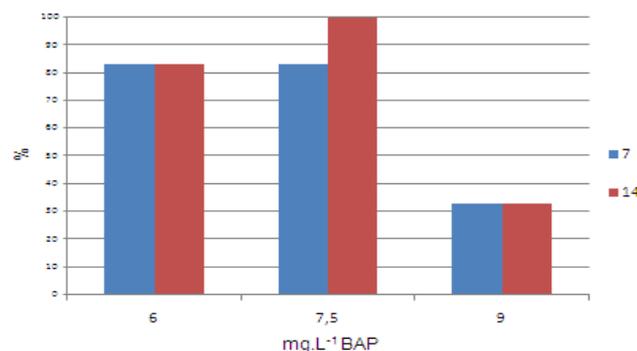


Figura 1 – Percentagem de cotilédones com calos aos 7 e 14 dias de incubação em meio MS, acrescido de 7 g de ágar e 3% de sacarose, contendo diferentes concentrações de BAP e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIB.

Quanto ao percentual de cotilédones com brotos, também houve um resultado superior no tratamento com 7,5 mg.L⁻¹ de BAP, 33%, após 42 dias de incubação (figura 2).



Figura 2 - Regeneração indireta em cotilédones de mamona incubados em meio contendo 7,5 mg.L⁻¹ de BAP e 0,5 mg.L⁻¹ de AIB.

Mesmo que tecidos cotiledonares tenham sido utilizados com sucesso em estudos de transformação genética em espécies da família Euforbiaceae (PAN et al., 2010; SUJATHA et al., 2008) a obtenção da organogênese indireta a partir do cultivo *in vitro* de cotilédones e a multiplicação e diferenciação celular em ápices de *Ricinus communis* L. ainda é um fator limitante indicando que as concentração de citocininas/auxinas deverão ser otimizadas.

Em relação aos ápices, exceto quando o meio de indução utilizado continha 6 mg.L⁻¹ de BAP, os calos foram observados na base dos explantes a partir dos 7 dias de incubação após o estímulo (Figura 3), em todos os tratamentos observou-se a expansão e desenvolvimento de folhas no mesmo período.

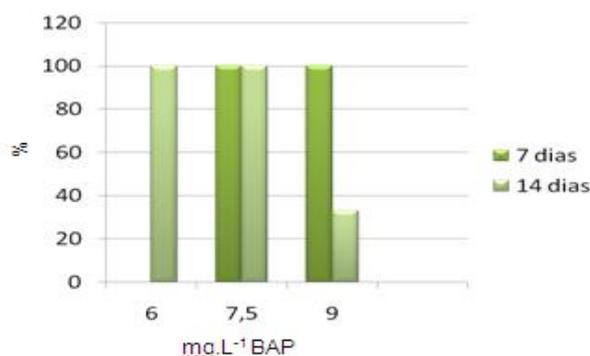


Figura 3 – Percentagem de calos aos 7 e 14 dias de incubação em meio MS, acrescido de 7 g de ágar e 3% de sacarose, contendo diferentes concentrações de BAP e 0,5mg.L⁻¹ AIB.

O BAP tem sido freqüentemente relatado para estimular a proliferação celular enquanto o alongamento de brotos é inibido (BRASSARD et al. 1996), fato esse observado no estudo já que o alongamento foi percebido somente a partir dos 28 dias e aos 35 dias de senescência nos explantes.

4 CONCLUSÃO

A otimização dos protocolos de cultivo *in vitro* de tecidos de mamona é uma etapa essencial para o desenvolvimento e aplicação da engenharia genética para esta espécie.

Ainda que brotos tenham sido induzidos e transferidos para meio de alongamento, os resultados obtidos indicam que será necessário refinar os tratamentos aplicados tendo em vista as dificuldades de alongamento dos ápices e a senescência observada nos explantes.

5 REFERÊNCIAS

ALVES, E. C. S. DE C.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Organogênese de explante foliar de clones de eucalyptus grandis x e. urophylla. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.5, p.421-430, 2004.

ATHMA, P., REDDY, T.P., Efficiency of callus initiation and direct regeneration from different explants of castor (*Ricinus communis* L.). **Curr Sci**, V. 52,p. 256–257,1993.

BELTRÃO, N. E. DE M.; MELO, F. B.; CARDOSO, G. D.; SEVERINO, L. S. **Mamona: Árvore do conhecimento e sistemas de produção para o semiárido brasileiro**. Campina Grande: Embrapa Algodão,2003. 19p. Circular Técnica, 70.

BRASSARD, N., BRISSETTE, L., LORD, D., LALIBERTE, S.: Elongation, rooting and acclimatization of micropropagated shoots from mature material of hybrid larch. **Plant Cell Tissue Organ Cult**. 44: 37-44, 1996.

CARVALHO, J. M. F. C. **Técnicas de micropropagação**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 1999. 39p. Documentos, 64.

KUMARI K.G.;, GANESAN M., JAYABALAN N. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Ricinus communis*. **Biol Plant** , V.52, p17–25, 2008.

PAN, J., FU, Q., XU, Z., Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of biofuel plant *Jathropa curcas* using kanamycin selection. **African Journal of Biotechnology**. V.9, n.39, p.6477-6481, 2010.

SARVESH A., RAM RAO D.M.; REDDY T.P. Callus initiation and plantlet regeneration from epicotyl and cotyledonary explants of castor (*Ricinus communis* L.). **Adv Plant Sci**, v. 5, p.124-128, 1992.

SUGIYAMA, M. Organogenesis in vitro. **Current Opinion in Plant Biology**, v.2, p.61-64, 1999.

sujatha, m., reddy, t.p., mahasi, m.j., Role of biotechnological interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L. **Biotechnology Advances** , V.26 , p 424–435, 2008.