



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E CIÊNCIAS AMBIENTAIS

Desenvolvimento de protocolo de regeneração e indução *in vitro* e *in vivo* de autotetraplóides em mamoneira (*Ricinus communis* L.)

Pollyana Karla da Silva

AREIA
2010

Pollyana Karla da Silva

Desenvolvimento de protocolo de regeneração e indução *in vitro* e *in vivo* de autotetraplóides em mamoneira (*Ricinus communis* L.)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Mestre em Agronomia. Área de Concentração:

AREIA
2010

Pollyana Karla da Silva

Desenvolvimento de protocolo de regeneração e indução *in vitro* e *in vivo* de autotetraplóides em mamoneira (*Ricinus communis* L.)

Comitê de Orientação:
Dr. Mailson Monteiro do Rêgo
Dr. Walter Esfrain Pereira

AREIA
2010

*Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da
Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, Campus II, Areia – PB.*

S586i *Silva, Pollyana Karla da.*

Desenvolvimento de protocolo de regeneração e indução *in vitro* e *in vivo* de autopoliploide em mamona (*Ricinus communis* L.). / Pollyana Karla da Silva. - Areia: UFPB/CCA, 2010.

56 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2010.

Bibliografia.

Orientadora: Mailson Monteiro do Rêgo.

Co-orientador: Walter Esfraim Pereira.

1. Mamona 2. Mamona – poliploidia 3. Mamona – cultura de tecidos 4. Ricinus communis L. I. Rêgo, Mailson Monteiro (Orientador) II. Pereira, Walter Esfraim (Co-orientador)

Pollyana Karla da Silva

Desenvolvimento de protocolo de regeneração e indução *in vitro* e *in vivo* de autotetraplóides em mamoneira (*Ricinus communis* L.)

Dissertação aprovada pela Banca Examinadora em: ___/___/___

Banca examinadora

Prof. Dr. Mailson Monteiro do Rêgo (CCA-UFPB)
(Orientador)

Prof. PhD. Walter Esfrain Pereira (CCA-UFPB)
(Orientador)

Dra. Fabiane Rabelo da Costa (INSA)

Dedicatória

Dedico esse trabalho a minha mãe, Maria Gorete Ribeiro, pelo amor infinito e dedicação integral.

AGRADECIMENTOS

A DEUS pela vida e por tudo que já me ofereceu em cada momento dessa caminhada.

Aos meus pais pelo amor e por apoio que sem eles não conseguiria conquistar mais uma etapa importante em minha vida e em especial a minha MÃE por estar sempre comigo, principalmente nos momentos mais difíceis. Ela é a minha força, meu porto seguro e por ela cheguei até aqui...Mainha, eu te amo!

Aos meus irmãos e sobrinhos pelo carinho, respeito e compreensão quando mais precisei.

Ao Professor Mailson por tudo!!! Por ter me amparado, pelo aprendizado, pela ajuda, pela paciência e pela confiança em mim depositada.

A professora Elizanilda pelo apoio e contribuição.

A amiga Emmanuelle pela ajuda, amizade, companheirismo e apoio sempre. O destino me presenteou colocando essa pessoa em meu convívio e assim permanecendo na minha vida. Compartilhamos muitos momentos e fatos inesquecíveis e espero viver ainda mais em sua companhia...Obrigada Manu!

Aos amigos da Biomassa, por todos os momentos vividos, principalmente pelas boas e numerosas risadas compartilhadas. Momentos únicos que levarei comigo sempre. Em especial quero agradecer a Camila, Lidiany e Diego por toda ajuda e companheirismo ao longo desse trabalho.

Ao amigo Tancredo por toda a ajuda! “Ow riqueza!!!”

As companheiras de todos os momentos, Pollyanna, Juliana e Nice sejam eles de estudo, de culinária, de felicidade, de tristezas, de vitórias, conquistas, perdas... momentos únicos vividos durante esses dois anos que ficarão guardados comigo e levarei para onde for...sentirei saudade de vocês.

As amigas Jaislanny, Marina e Silvany que mesmo distante estiveram presentes e deram suas contribuições e acima de tudo, por essa amizade de tantos anos.

Ao meu “anjo” Silvokleio, por tudo que me fez nessa etapa final, pelos favores prestados, pela paciência e principalmente pelas palavras que me acalmavam e me davam forças para seguir.

Aos Amigos da Pós-Graduação pelos momentos compartilhados em sala de aulas, laboratórios ou fora deles. De cada um levo uma lembrança no coração.

Aos Amigos da cidade Fabinho, Yan, Alisson, Vinícius, Helinho, Igor entre outros que fizeram parte da minha vida nesses 2 anos na cidade. Foram responsáveis por muitas e muitas risadas, conversas, aventuras, segredos compartilhados... enfim, estiveram comigo sempre fazendo esquecer o quão dura era essa jornada tornando-a assim prazerosa.

Aos professores e funcionários da Pós-Graduação que fizeram parte desse período de aprendizagem e muito trabalho.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	x
Lista de Figuras.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO I – Considerações Gerais	
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Mamoneira (<i>Ricinus communis</i> L.).....	5
2.2. Cultura de Tecidos de Plantas.....	6
2.2.1. Meios de cultivo.....	8
2.3. Poliploidia.....	9
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	12
CAPÍTULO II - Desenvolvimento de protocolo de regeneração de plântulas de mamoneira (<i>Ricinus communis</i> L.) <i>in vitro</i>	
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
2.1. Local do experimento.....	20
2.2. Material Vegetal.....	20
2.3. Desinfestação das sementes e obtenção de explantes.....	20
2.4. Avaliação das diferentes formulações de meios nutritivos de Margara (1978) sobre a regeneração de plântulas de <i>Ricinus communis</i> L. <i>in vitro</i>	20
2.5. Delineamento estatístico.....	21
2.6 Avaliação de diferentes concentrações de sacarose.....	24
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
3.1 Avaliação das diferentes formulações de meios nutritivos de Margara (1978) sobre a regeneração de plântulas de <i>Ricinus communis</i> L. <i>in vitro</i>	25

3.2. Avaliação de diferentes concentrações de sacarose.....	28
4. CONCLUSÃO.....	33
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

CAPÍTULO III – Poliploidização *in vitro* e *ex vitro* em mamoneira (*Ricinus communis* L.) mediada por Trifluralina

RESUMO.....	38
ABSTRACT.....	39
1. INTRODUÇÃO.....	40
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
2.1. Material Vegetal.....	42
2.2. Experimento 1. Avaliação da resposta morfogênica de plântulas de mamoneira (<i>Ricinus communis</i> L.) germinadas <i>in vitro</i> e submetidos a solução de Trifluralina em diferentes concentrações por 16 h.	42
2.3 Experimento 2. Avaliação de plântulas de mamoneira (<i>Ricinus communis</i> L.) germinadas <i>ex vitro</i> submetidas a solução de Trifluralina a 10µM, aplicada sobre o meristema apical do caule.....	42
3. RESULTADOS E DISCUSÃO.....	44
3.1. Experimento 1. Avaliação da resposta morfogênica de plântulas de mamoneira (<i>Ricinus communis</i> L.) germinadas <i>in vitro</i> e submetidos a solução de Trifluralina em diferentes concentrações por 16 h.....	44
3.2. Experimento 2. Avaliação de plântulas de mamoneira (<i>Ricinus communis</i> L.) germinadas <i>ex vitro</i> submetidas a solução de Trifluralina a 10µM, aplicada sobre o meristema apical do caule.....	47
4. CONCLUSÃO.....	53
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

- Tabela 1** Resumo da análise de variância das diferentes formulações de Meios de Margara (1978) sobre a morfogênese *in vitro* de *Ricinus communis* L..... 25
- Tabela 2** Comparações de médias das diferentes formulações de meios de Margara (1978) sobre a morfogênese *in vitro* de *Ricinus communis* L..... 26
- Tabela 3** Resumo da análise de regressão de diferentes concentrações de sacarose na formulação do meio N5Ca de Margara (1978) sobre a morfogênese *in vitro* em *Ricinus communis* L. Areia, PB. 2010..... 29

CAPÍTULO III

- Tabela 1** Resumo da análise de variância da frequência de aplicação da solução de trifluralina na concentração de 10 μ M sobre o meristema apical do caule de plântulas de mamoneira (*Ricinus communis* L.) germinadas *ex vitro*..... 49
- Tabela 2** Teste de médias da frequência de aplicação da solução de trifluralina na concentração de 10 μ M sobre o meristema apical do caule de plântulas de mamoneira (*Ricinus communis* L.) germinadas *ex vitro*..... 49

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1** Mamoneira (*Ricinus communis* L.)..... 5

CAPÍTULO II

- Figura 1** Efeito das concentrações de sacarose no comprimento das plântulas de mamoneira (*Ricinus communis* L.) *in vitro*. 29
- Figura 2** Efeito das diferentes concentrações de sacarose sob a largura da plântula de mamona (*Ricinus communis* L.)..... 30
- Figura 3** Efeito das diferentes concentrações de sacarose sob a largura da plântula de mamona (*Ricinus communis* L.)..... 31
- Figura 4** Plântulas de mamoneira (*Ricinus communis* L.) submetidas a diferentes concentrações de sacarose (T0 = 0; T1 = 10; T2 = 20; T3 = 30; T4 = 40; e T5 = 50 gL⁻¹)..... 31

CAPÍTULO III

- Figura 1** Efeito das concentrações de Trifluralina sob o número de folhas nas plântulas de mamoneira (*Ricinus communis* L.) germinadas *in vitro*.... 45
- Figura 2** Efeito das concentrações de Trifluralina sob o tamanho das plântulas de mamoneira (*Ricinus communis* L.) *in vitro*..... 46
- Figura 3** Plântulas de mamoneira (*Ricinus communis* L.) submetidas as concentrações de Trifluralina por 16 h, 30 dias após os tratamentos..... 46
- Figura 4** Efeito da frequência de aplicação de Trifluralina em mamoneira (*Ricinus communis* L.) sob o número de estômatos por campo microscopico..... 47
- Figura 5** Densidade estomatal da parte abaxial das folhas de mamoneira (*Ricinus communis* L.) poliplóide (a) e diplóide (b). Tamanho de grão de pólen em poliploide (c) e diplóide (d). Sementes de plantas poliplóide (e) e diplóide (f)..... 51

Figura 6	Plantas de mamoneira (<i>Ricinus communis</i> L.). (a) comparação da altura entre plantas, a esquerda diplóides e a primeira a direita, possível poliplóide. (b) Inflorescência de plantas diplóides. (c) Possível poliplóide.....	52
-----------------	---	----

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO I

Quadro1	Concentrações de macro e micronutrientes dos Meios de Margara(1978).....	22
Quadro2	Composição iônica dos macro e micronutrientes dos Meios de Margara (1978) e do meio MS (Murashige e Skoog, 1962).....	23

SILVA, Pollyana Karla da. **Desenvolvimento de protocolo de regeneração de plântulas de mamoneira (*Ricinus communis* L.) *in vitro***. Areia – PB: CCA/UFPB, 2010. 55f.(Dissertação de Mestrado em Agronomia).

RESUMO

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma espécie diplóide com número de cromossomos $2n=2x=20$. Suas plântulas são difíceis de serem regeneradas *in vitro* devido a sua recalcitrância necessita de um bom protocolo de regeneração. O presente trabalho teve o objetivo de desenvolver um protocolo para induzir a poliploidia *in vitro* e *ex vitro* na mamona (*Ricinus communis*). Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Centro de Ciências Agrárias na Universidade Federal da Paraíba Campus II na cidade de Areia – PB. Foram utilizadas sementes de mamoneira da variedade E1P17 A/B. No experimento 1, os explantes foram inoculados em oito diferentes de meios nutritivos de Margara(N5Ca, N30Ca, N30K, N15K, N15Ca, N45K, N5K, N30NH₄), no experimento 2, em meio N5Ca com 6 concentrações de sacarose(0, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0%,), no 3º experimento as plântulas foram colocadas em soluções de Trifluralina nas concentrações de 0, 5, 10, 15, 20, 25 µM por 16h, e no experimento 4 foi aplicado a solução de Trifluralina (10 µM) cujos tratamentos foram T0 (sem aplicação), T1 (única aplicação), T2 (duas aplicações) e T3 (três aplicações)sobre o meristema apical das plântulas. Diante dos resultados apresentados nos experimentos pode concluir que é possível propagar mamoneira *in vitro* utilizando o meio N5Ca de Margara, e sacarose a 3% apresentou melhor resposta morfogênica. Para a indução *in vitro* de poliplóides de mamoneira deve-se testar concentrações inferiores a 10 µM ou diminuir o tempo de exposição de 16 horas; e as variações morfológicas são importantes na identificação de plantas poliplóides em mamoneira.

Palavras-chaves: *Ricinus communis* L., cultura de tecidos, poliplodia.

SILVA, Pollyana Karla da. ***In vitro* and *ex vitro* induction of autotetraploid in castor bean (*Ricinus communis* L.)**. Areia – PB: CCA/UFPB, 2010. 55f.(Master Science Thesis).

ABSTRACT

The castor bean plant (*Ricinus communis* L.) is a diploid specie that have chromosomes in number of $2n=2x=20$. The castor bean plantlets are hard to be *in vitro* regenerated because its recalcitrance requires a good *in vitro* regeneration protocol. The aim of this work was to develop an *in vitro* and *ex vitro* polyploidy induction protocol for castor bean (*Ricinus communis*). Experiments were conducted in Tissue Culture Laboratory of Agricultural Sciences Center from Universidade Federal da Paraíba, Campus II, Areia – PB. Castor bean seeds of variety E1P17 A/B were utilized. In the 1 experiment, the explants had been inoculated along eight different nutritive mediums of Margara (N5Ca, N30Ca, N30K, N15K, N15Ca, N45K, N5K, N30NH₄), in the 2 experiment, in médium N5Ca with 6 sucrose concentrations (0, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0%,), in the 3 experiment, the plantlets had being added in Trifluralin solutions with 0, 5, 10, 15, 20, 25 μ M concentrations for 16 hours, and in the 4 experiment was applied a Trifluralin solution (10 μ M), which treatments were T0 (no application), T1 (only one application), T2 (two applications) e T3 (three applications) over the apical meristem of the plantlets. Therefore, based on these experiments results, the conclusion is that it is possible to propagate *in vitro* castor bean plant utilizing N5Ca medium of Margara and sucrose by 3% had shown the best morphogenetic result. For *in vitro* induction of the castor bean polyploidy, might be tested less than 10 μ M concentrations or reduce exposition time for 16 hours; and morphological variations are important at polyploidy plants identification in castor bean plants.

Keywords: *Ricinus communis* L., tissue culture, polyploidy.

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é um arbusto perene, heliófila, que pertence à família Euphorbiaceae. É originária provavelmente da África ou da Índia, sendo atualmente cultivada em diversos países do mundo, sendo a Índia, a China e o Brasil, nesta ordem os maiores produtores mundiais. É uma planta diplóide com $2n=2x=20$ cromossomos (MOSHKIN, 1986), sendo também chamada, em algumas regiões do Brasil, de carrapateira, baga, rícino e palma-de-cristo.

O óleo da mamona é tido como um dos mais versáteis da natureza, de utilidade só comparável à do petróleo, com a vantagem, porém de ser um produto renovável e barato (FORNAZIERI JÚNIOR, 1986), podendo ser utilizado principalmente na indústria e também como fonte de matéria-prima para a fabricação do biodiesel. Entretanto, um dos desafios para a produção desse combustível alternativo proveniente da mamona tem sido o suprimento de sementes em quantidade e qualidade para atender o crescente mercado dessa cultura (SOUZA et al., 2009), fazendo-se necessário o advento do melhoramento genético dessa espécie utilizando-se da cultura de tecidos em que uma das funções é produzir plantas de alta qualidade e quantidade.

A cultura de tecidos é uma das ferramentas utilizadas no melhoramento genético de plantas. Essas técnicas, que são utilizadas em uma ou outra etapa do melhoramento, não, necessariamente, no desenvolvimento direto de novas cultivares, podem oferecer novas alternativas aos programas de melhoramento em suas diferentes fases e, muitas vezes, soluções únicas. Assim, a contribuição das técnicas de cultura de tecidos nos programas de melhoramento pode se dar em maior ou menor escala, de acordo com os objetivos do melhoramento e com as características biológicas da espécie-alvo (CARVALHO et al., 2007).

No Brasil, o primeiro programa de melhoramento genético da mamoneira foi iniciado em São Paulo, em 1936, com o objetivo de desenvolver cultivares de mamoneira mais produtivas, com maiores níveis de resistência às doenças e pragas e outras características agrônômicas mais desejáveis. Atualmente com o interesse no óleo da mamona como biodiesel, pode-se dizer que seria interessante desenvolver uma cultivar que incluísse nas suas características um elevado teor de óleo nas suas sementes. Essa característica pode ser induzida através da poliploidia.

A poliploidia é uma importante forma de evolução das plantas, é uma variação que surge através da manipulação do número de conjuntos básicos de cromossomos. Se conjuntos

idênticos àqueles provenientes de uma única espécie são multiplicados, obtém-se um poliplóide simples ou autopoliplóide. Os efeitos morfofisiológicos da poliploidia variam em diferentes espécies. Um efeito comum é o aumento do tamanho das partes vegetativas das plantas, o que tornam os poliplóides bem mais vigorosos em relação aos diplóides correspondentes (ALLARD, 1971). Os tetraplóides ($4n$) com quatro genomas podem resultar da duplicação de cromossomos somáticos além de irregularidades na meiose.

Em muitas plantas cultivadas, as variedades tetraplóides são comercialmente mais desejáveis que seus diplóides. Muitas plantas de interesse comercial são poliplóides ou incluem poliplóides: alfafa, maçã, banana, café, algodão, amendoim, trigo são alguns exemplos (BURNS; BOTINNO, 1991).

Considerando-se a necessidade de realização de trabalhos básicos que auxiliem os programas de melhoramento genético da mamoneira, o presente trabalho tem por objetivo desenvolver um protocolo para induzir a poliploidia *in vitro* e *ex vitro* na mamona (*Ricinus communis* L.).

2. REVISÃO DE LITERATURA:

2.1 MAMONEIRA (*Ricinus communis* L.):

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma planta especial, originária de clima tropical, possivelmente da Etiópia, África, com elevada capacidade de resistência à seca, xerófila, heliófila. (MOSKIN, 1986), (FERREIRA et al, 2009). *Ricinus communis* L., pertence à família *Euphorbiaceae* Jussieu. Corresponde à espécie de ampla distribuição geográfica, ocorrendo preferencialmente nas zonas tropicais e subtropicais do mundo. De acordo com Melchior (1964), na classificação de Engler *Ricinus communis* L. tem a seguinte posição sistemática: Divisão: *Angiospermae* Brongniart, Classe: *Dicotyledoneae* DC, Ordem: *Geraniales* Lindley, Família: *Euphorbiaceae* Jussieu, Gênero: *Ricinus* Linnaeus, Espécie: *Ricinus communis* L. (RODRIGUES et al., 2002).

A mamoneira é também conhecida como carrapateira, palma-de-cristo, castor, rícino, bafureira, bojureira (Figura 1). É uma planta de hábito arbustivo, com caule cilíndrico e grosso com diversas colorações podendo variar entre verde avermelhado a castanho acinzentado. As folhas são alternas, palmatiformes de pecíolo longo, com margem denteada e podem medir até 60 cm de comprimento. Suas flores são monóicas e estão dispostas em racemos terminais com 15 a 50 cm de comprimento, sendo que as femininas localizam-se na parte superior e as masculinas na parte inferior das inflorescências. Devido a esse tipo de conformação e distribuição das flores, a polinização é do tipo anemófila. Apresentam frutos do tipo cápsula, com deiscência explosiva, apresentando espinhos. Suas sementes são lisas e brilhantes, com manchas escuras, de diferentes tamanhos, formatos e grande variabilidade de coloração, extraindo-se delas um óleo de excelentes propriedades e de largo uso como insumo industrial. (RODRIGUES et al., 2002), (LORENZI, 1982; RODRIGUES FILHO, 2000), (MILANI et al., 2006). Apesar das sementes da mamona serem tóxicas, 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 á torta (ANDRADE, 2007).



Figura 1: Mamoneira (*Ricinus communis* L.)

Na primeira década do século XX, os pesquisadores determinaram que o número de cromossomos para todas as espécies diplóides de mamoneira (*Ricinus communis* L.) estudadas eram $2n=2x=20$, os quais estão organizados em dez pares de cromossomos, sendo cinco metacêntricos, dois submetacêntricos e três acrocêntricos (MOSHKIN, 1986). Andrade (2007) trabalhando com a caracterização morfológica e citogenética de sementes e plântulas de algumas espécies de plantas tóxicas, determinou que o número de cromossomos da mamoneira com ponta de raiz como sendo $2n=2x=10$, e ao contrário de Moskin (1986), observou que era impossível fazer a classificação cromossômica.

A mamoneira apresenta uma alta capacidade de adaptação necessitando de chuvas regulares durante a fase vegetativa e de períodos secos na maturação dos frutos, sendo muito exigente em calor e sensível ao excesso de umidade no solo (ANDRADE, 2007)

A *Ricinus communis* L. é uma oleaginosa de destacada importância socioeconômica e vem se destacando como ótima alternativa de exploração para o semi-árido brasileiro, em função da capacidade de resistir à seca e produzir com rentabilidade, proporcionando ocupação e renda para pequenos produtores. Com a possibilidade do óleo da mamona ser matéria prima para a produção de biodiesel, há excelente perspectiva da exploração desta

oleaginosa no Brasil, em especial na Região Nordeste (BELTRÃO et al., 2003), (CARVALHO et al., 2005), (BELTRÃO et al., 2004).

O Brasil é o terceiro maior exportador do óleo de mamona, participando com cerca de 12% do mercado mundial, tendo como clientes principais os Estados Unidos, o Japão e a Comunidade Européia. Portanto, o biodiesel feito do óleo de mamona poderá com sua expansão fornecer mais de 60% do biodiesel que substituirá o diesel hoje utilizado no mundo (MOTA et al., 2009)

O óleo da mamoneira o único glicerídico que a natureza fez que é solúvel em álcool e também o mais denso e mais viscoso de todos os óleos de origem vegetal e animal, além de ser o que tem o maior percentual de oxigênio na molécula, cerca de 5,0% a mais do que os demais óleos. Ao ser transformado em biodiesel, comporta-se como combustível e comburente, e é muito menos poluidor da atmosfera, do que o diesel, mineral derivado diretamente do petróleo (BELTRÃO et al., 2006).

Esse singular óleo da natureza possui propriedades químicas e físicas específicas, por ter um ácido graxo peculiar, o ricinoléico, que tem mais oxigênio do que os demais, devido a ter uma hidroxila (OH) no carbono 12, além de ter uma dupla ligação estrategicamente posicionada no carbono 9 de sua cadeia de 18 carbonos. Estas características permitem que o óleo da mamona seja o mais denso e viscoso de todos os óleos. Tem viscosidade dez vezes maior do que o óleo de girassol, por exemplo, sendo usado para a fabricação de mais de 800 produtos, com destaque para vidros a prova de bala, lentes de contacto, batons, sabões metálicos, lubrificantes especiais para motores e reatores de elevada rotação, plásticos de elevada resistência, poliuretanas, entre outros. Ele tem 30% a mais de lubricidade do que os demais óleos, podendo substituir o enxofre, em 100%, no diesel mineral, sendo assim um óleo especial e com mercado garantido no mundo moderno (BELTRÃO et al., 2006)

2.2 CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS

A biotecnologia em seu sentido mais amplo compreende a manipulação de microorganismos, plantas e animais, objetivando a obtenção de processos e produtos de interesse. Desta maneira, toda atividade que envolva a aplicação dos conhecimentos de fisiologia, bioquímica e genética, é considerada como técnica biotecnológica. Em seu senso

mais restrito as biotecnologias estão associadas ao emprego das técnicas modernas de biologia molecular e celular (GUERRA; NODARI, 2006).

A cultura de tecidos é uma parte da biotecnologia que na atualidade tem rápida evolução. A preservação de material genético *in vitro* é uma técnica promissora de manutenção de genes, que poderá estar disponível facilmente. Mantendo-se plantas ou segmentos das mesmas de diferentes procedências e genótipos em condições de crescimento mínimo ou mesmo em criopreservação, pode-se dispor desses materiais para uso no melhoramento genético, podendo-se utilizá-lo para intercâmbios entre instituições dentro do país ou com o exterior sem os riscos de estar levando pragas ou doenças a novas regiões; outra vantagem é a necessidade de pequeno espaço para preservação de grande quantidade de genótipos (CARVALHO, 1999).

Até a alguns anos atrás, no Brasil, plantas e flores só se propagavam, basicamente a partir de estacas, mudas, bulbos e sementes. A cultura de tecidos, ou propagação *in vitro*, pode constituir um método auxiliar na produção eficiente de mudas com alta qualidade fitossanitária e genética. Essa técnica vem sendo utilizada com sucesso para a obtenção de mudas saudáveis em grande número de espécies economicamente importantes, realizando avanços importantes nos campos de genética, fisiologia, ecologia e patologia.

Alguns estudos mais antigos em *Ricinus communis* L. com cultura de tecidos aconteceram em 1989, com o objetivo de induzir a formação de calos e regeneração de plântulas onde Reddy e Bahadur relataram resposta genética na multiplicação de brotos em mamona (SUJATHA, 2008)

Os primeiros estudos em cultura de tecidos em Euforbiáceas, incluindo mamona, foram em maior parte com cultura de endosperma com o objetivo de obter plantas triploides e entender o metabolismo da via do glioxalato. Os triploides serão úteis para a obtenção de linhas trissômicas para mapeamento genético. Isto pode ser feito através de cultura de endosperma ou através da duplicação de cromossomos (*in vitro* e *in vivo*) e posteriormente cruzando os autotetraploides resultantes com diplóides (SUJATHA, 2008). Assim, a poliploidia seria uma estratégia biotecnológica utilizada para aumentar a eficiência da seleção e acelerar a realização de novas linhagens uniformes em programas de melhoramento. (CESARO et al., 2009)

2.2.1 Meios de Cultivo

Os meios de cultivo são formulações de sais minerais (macro e micronutrientes), carboidratos, vitaminas e reguladores de crescimento utilizados para fornecerem as culturas, substâncias essenciais para o desenvolvimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão do desenvolvimento *in vitro* (TORRES et al., 1998). A constituição do meio é baseada nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender em necessidades específicas (GUERRA; NODARI, 2006).

Esses meios devem suprir tecidos e órgãos cultivados *in vitro* com nutrientes necessários ao crescimento do vegetal. Basicamente, o meio de cultura fornece não só macronutriente, mas também uma fonte de carboidrato (geralmente a sacarose) para substituir o carbono que a planta normalmente fixa da atmosfera pela fotossíntese. Para propiciar um crescimento maior, normalmente incluem-se certos componentes orgânicos como vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento (MALOSO, 2007).

Os constituintes orgânicos importantes são os carboidratos, substâncias reguladoras de crescimento, vitaminas, aminoácidos e amidas.

Os carboidratos fornecem energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese de aminoácidos e proteínas, polissacarídeos estruturais e compostos orgânicos necessários para o crescimento das células e também tem a função de atuar como componente osmótico do meio de cultura (ATHAYDE, 1992; STEFANELLO et al., 2009). O cultivo *in vitro* é fortemente dependente da fonte de carbono, uma vez que o material vegetal não encontra condições adequadas de iluminação e concentração de CO₂ e, às vezes, não apresentam teores de clorofila suficientes para realizar fotossíntese que sustente o crescimento. Portanto, é necessária a adição de carboidratos no meio de cultura, pois estes fornecem energia metabólica e esqueletos de carbono para a biossíntese de macromoléculas, as quais são necessárias ao crescimento das células (CALDAS et al., 1998; NEPOMUCENDO et al., 2009)

Os carboidratos mais usados nos meios de cultura são a sacarose, a glicose e a frutose. Porém, a sacarose tem mostrado superioridade entre os outros pelo motivo de responder como melhor fonte para crescimento na maioria das espécies, diferenciação dos tecidos, além de ser absorvida com maior rapidez (MURASSHIGUE, 1974; FERREIRA et al., 2002; SKREBSKY et al., 2004). Assim, entre as fontes de carbono a sacarose é a mais utilizada em plantas cultivadas *in vitro* (SANTANA, 2003; NEPOMUCENO et al., 2009).

Outro fator importante que envolve a sacarose é a sua concentração no meio de cultivo, pois esta é determinante para um bom crescimento e desenvolvimento dos explantes (STEFANELLO et al., 2009). As concentrações de sacarose comumente usados em cultura de tecidos, podem inibir a síntese de clorofila, isto porque na presença de açúcar as plântulas não desenvolvem capacidade fotoautotrófica, podendo causar crescimento reduzido e morte das mudas na fase de aclimação (GEORGE; SHERRINGTON, 1984; KOZAI, 1991; LEITE et al, 2000).

Os reguladores de crescimento são considerados os compostos orgânicos de maior efeito morfogênico em cultura de tecidos de plantas. São representados pelas citocininas e auxinas.

As citocininas são derivadas da adenina e têm um papel fundamental na diferenciação e regeneração de plantas na maioria das espécies, induzindo a divisão celular, proliferação e morfogênese da parte aérea. As citocininas mais usadas em cultura de tecidos são a cinetina (CIN), benziladenina (BA), zeatina (Zea), isopentenil adenina (2ip) e thidiazuron (TDZ). As auxinas provocam o alongamento celular, dominância apical, enraizamento e outros fenômenos. As mais utilizadas são AIA (ácido indol-3-acético), AIB (ácido indol-3-butírico), ANA, 2,4-D, 2,4,5-T, 4-CPA e picloran (GUERRA; NODARI, 2006).

O thidiazuron (N-fenil-N-1,2,3-tidiazol-5-tiuréia) (TDZ) é um fitorregulador que, no Brasil, é largamente utilizado na cultura do algodoeiro para provocar desfolhamento. Esse produto também vem sendo usado na cultura de tecidos para induzir brotação *in vitro*, visto que demonstra ter ação semelhante à das citocininas (BOTELHO et al., 2003; SALGADO et al, 2001).

As vitaminas são compostos orgânicos que, em baixas concentrações, desempenham funções reguladoras catalíticas no metabolismo celular. A vitamina mais utilizada em cultura de tecidos é a tiamina (B1).

2.3 POLIPLOIDIA

A poliploidia, ou seja, a existência de mais de dois genomas no mesmo núcleo, é de ocorrência comum nas plantas, tendo desempenhado um importante papel na origem e evolução de plantas silvestres e cultivadas (SCHIFINO-WITTMANN, 2004). É o fenômeno mais importante na evolução e especiação dos vegetais. Acredita-se que 75% das espécies

estudadas e descritas citogeneticamente tenham sofrido um evento de duplicação de todos os cromossomos (MONDIN; NETO, 2006).

Após o entendimento entre herança e cromossomos, no século 20, muitos pesquisadores dedicaram-se ao estudo da poliploidia em plantas gerando uma grande quantidade de informações sobre tipos, aspectos evolutivos, ecológicos e taxonômicos de poliplóides, e possibilidades de manipulação da poliploidia na agricultura.

Poliplóides em geral são bons colonizadores, podendo ocupar habitats pioneiros nos quais os ancestrais diplóides não são bem sucedidos (DE WET, 1980 apud SCHIFINO-WITTMANN, 2004).

Tradicionalmente os poliplóides são classificados em autopoliplóides, originados pela duplicação de um mesmo genoma, e alopoliplóides, originados pela duplicação de genomas diferentes, normalmente após um evento de hibridação. O evento da autopoliploidia consiste na duplicação do número básico de cromossomos pela própria espécie. Este evento é raro de acontecer ou de ser detectado na natureza. A alopoliploidia consiste no cruzamento de duas espécies distintas, onde posteriormente o número de cromossomos é duplicado. É o mais comum na natureza devido a sua alta fertilidade (MONDIN; NETO, 2006)

A descoberta das substâncias que provocam a inibição da divisão celular, mas permitem a duplicação cromossômica, com o advento da cultura de tecidos, permitiu a indução *in vitro* de poliploidia nas plantas. Foi em meados dos anos 40 que ocorreu a descoberta da colchicina, iniciando-se as experiências para indução de poliploidias (MONDIN; NETO, 2006). A indução *in vitro* de poliplóides com a colchicina e orizalina tem sido relatada em várias espécies de plantas diferentes (CARVALHO, et al., 2005)

A poliploidia induzida pode ser uma poderosa ferramenta para o melhoramento genético. Após a descoberta do efeito poliploidizante da colchicina, a indução de poliploidia teve uma época áurea, em que tentava-se poliploidizar o maior número possível de plantas cultivadas (SCHIFINO-WITTMANN, 2004)

No melhoramento, a indução de poliploidia pode ser utilizada de três maneiras básicas: por poliploidização na espécie, como um modo de tentar-se conseguir plantas maiores e melhores, já que poliplóides em geral são maiores e mais robustos que seus genitores diplóides, apresentando o chamado efeito “gigas”; por poliploidização de um híbrido, neste caso para restaurar a fertilidade do híbrido estéril, sintetizar uma nova espécie ou ressintetizar uma já existente; ou como uma ponte para transferir genes de interesse entre os níveis de ploidia diferentes, intra ou interespecíficos (DEWEY, 1980 apud SCHIFINO-WITTMANN, 2004).

As mudanças em características tais como metabolismo, taxas de desenvolvimento, regulação gênica e tolerâncias fisiológicas, que acompanham a poliploidia, podem alterar interações bióticas, tolerâncias ecológicas e facetas do isolamento reprodutivo. Os novos fenótipos, que freqüentemente surgem com a formação de poliplóides, podem contribuir para o seu sucesso na natureza ou para sua seleção para uso na agricultura (SCHIFINO-WITTMANN, 2004).

Existem alguns compostos herbicidas que atualmente estão sendo empregados para indução de poliploidias pelos seus efeitos de poliploidização e por serem produtos muito menos tóxicos e muito mais baratos do que a colchicina e seus derivados. Dentre essas substâncias citamos a Trifluralina ou α,α,α trifluro-2,6-dinitro-N,N-dipropil-p-toluidina comercializada com o nome de Treflan® e a orizalina comercializada no Brasil com o nome de Surflan 750 BR ® (MONDIN; NETO, 2006), (CARVALHO, 2005).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLARD, R. W. **Princípios do Melhoramento Genético das Plantas**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 1971. 387p.

ANDRADE, D. A. V. **Caracterização morfológica e citogenética de sementes e plântulas de algumas espécies de plantas tóxicas**. Dissertação de Mestrado em Agronomia – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp. Jaboticabal, São Paulo, 2007.

ATHAYDE, M. O. **Diferentes concentrações de sacarose e sais na propagação “in vitro” do ‘cravo’ e ‘trifoliata’**. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura de Larvas. Larvas, MG. 1992.

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

BELTRÃO, N. E. de M.; CARDOSO, G. D.; SEVERINO, L. S. **Informações técnicas sobre a cultura da mamona para a agricultura familiar**. Campina grande: Embrapa Algodão, 2004.

BELTRÃO, N. E de M.; CARDOSO, G. D.; SEVERINO, L. S.; PEREIRA, J. R.; GONDIM, T. M. de S.; CARTAXO, W. V. **O biodiesel do óleo da mamona e a produção de fitomassa: considerações gerais e singularidades**. Campina Grande, 2006.

BOTELHO, R. V.; PIRES, E. J. P.; TERRA, M. M.; CARVALHO, C. R. L. Efeitos do thidiazuron e do ácido giberélico nas características dos cachos e bagas de uvas ‘niagara rosada’ na região de jundiá SP1. **Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal** - SP, v. 25, n. 1, p. 96-99, Abril 2003

BURNS, G. W.; BOTTINO, P. J. **Genética**. 7º ed. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1991.

CARVALHO, J.M.F.C. **Técnicas de micropropagação**. Campina Grande: Embrapa CNPA 1999. (Embrapa CNPA. Documento, 64). 39p.

CARVALHO, J. M. F. C.; RIBEIRO, C. S. N.; SILVA, H. S.; SANTOS, J. W. Propagação *In Vitro* e Aclimatação a partir de Sementes Inviáveis Armazenadas no Banco Ativo de Germoplasma de Mamona. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Embrapa Algodão, Campina Grande, PB. 2005.

CARVALHO, J. M. F. C.; ARAÚJO, S. S.; MILANI, M. **Regeneração *In Vitro* dos dos Acessos do Banco Ativo de Germoplasma da Mamona.** Comunicado técnico, Campina Grande, 2007.

CARVALHO, J. F. R. P.; CARVALHO, C. R.; OTONI, W. C. **In vitro induction of polyploidy in annatto (*Bixa orellana*).** Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2005.

CESARO, Taniela de.; BAGGIO, M. I.; ZANETTI, S. A.; LIZETE, A.; BRAMMER, S. P.; IORCZESKI, E. J.; MILACH, S. C. K. **Haplodiploid androgenetic breeding in oat: genotypic variation in anther size and microspore development stage.** Scientia Agricola. Piracicaba, Braz. 2009, vol.66, n.1, pp. 11

FERREIRA, U. C de Q.; QUEIROZ, W. N.; BELTRÃO, N. E de M. Fitotoxicidade e seletividade do herbicida trifloxysulfuron na mamona cultivar BRS Nordeste. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** v.13, (Suplemento), p.916–921, 2009.

FORNAZIERI JÚNIOR, A. **Mamona uma rica fonte de óleo e de divisas.** São Paulo, 1986. 69p.

MALOSSO, Milena Gaion. **Micropropagação de *Acmella oleracea* (L.) R. K. JANSEN e estabelecimento de meio de cultura para a conservação desta espécie em banco de germoplasma *in vitro*.** Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, 2007. Manaus: UFAM, 2007.

MELCHIOR, H. In Engler A. Sillabus der Pflanzen-familien. Berlin: Gebruder Borntraeger. Nicolasse, v. 2.1964.

MILANI, M.; CARVALHO, J. M. C. F.; MACEDO, F. C. O.; Produção de Mudas de Mamoneira (*Ricinus communis* L.) a Partir da Estimulação de Estacas Aéreas pelo Ácido 3-Indolacético (AIA) e pelo Ácido Indolbutírico (AIB). Comunicado Técnico. Campina Grande, 2006.

MODIN, M.; NETO, A. D. **Citogenética vegetal enfatizando a família Orchidaceae.** 2006.

MOSHKIN, V. A. **Castor.** New Delhi, 1986.

MOTA, J. C.; ALMEIDA, M. M.; ALENCAR, V. C.; CURI, W. F. **Impactos e benefícios ambientais, econômicos e sociais dos biocombustíveis: uma visão global.** Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal , v. 6, n. 3, p. 220-242, set /dez 2009.

GUERRA, M. P.; NODARI, R.; Apostila de Biotecnologia. CCA/UFSC. EDIÇÃO DA STEINMACHER. 2006.

RODRIGUES FILHO, A. 2000. **A cultura da mamona.** Belo Horizonte: EMATER-MG. 20p. (Boletim técnico).

RODRIGUES, R. F. de O.; OLIVEIRA, F.; FONSECA, A. M. **As folhas de Palma Christi – *Ricinus communis* L. Euphorbiaceae Jussieu.** Revisão de conhecimentos. Revista Lecta, Bragança Paulista, v. 20, n. 2, p. 183-194, jul./dez. 2002

SALGADO, S. M. L.; CUNHA, R. L.; NIELLA, G. R.; TEIXEIRA, H.; PASQUAL, M. Efeito da utilização de tdz e benomyl na Micropropagação do crisântemo (*Dendranthema morifolium*). **Ciênc. agrotec., Lavras**, v.25, n.2, p.274-280, mar./abr., 2001

SCHIFINO-WITTMANN, Maria T. Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas. **Revista Brasileira Agrocência**, v.10, n.2, p.151-157. 2004.

SOUZA, L.A.; CARVALHO, M. L. M.; KATAOKA, V. Y.; JOÃO ALMIR DE OLIVEIRA, J. A. Teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de mamona. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 31, nº 1, p.060-067, 2009

STEFANELLO, S.; KARSTEN, J.; MÜLLER, T. S.; TOMCZAC, A. P.; BONETT, L. P.; SCHUELTER, A. R. Conversão *in vitro* de raízes e folhas de *Miltonia flavescens* Lindl. em protocormos e regeneração de plantas. **Ciênc. agrotec., Lavras**, 2009.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. v. 1, 509 p

CAPÍTULO II

DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO DE REGENERAÇÃO DE PLÂNTULAS DE MAMONEIRA (*Ricinus communis* L.) *IN VITRO*.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO DE REGENERAÇÃO DE PLÂNTULAS DE MAMONEIRA (*Ricinus communis* L.) *IN VITRO*.

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) pertence à família Euphorbiaceae e é também chamada carrapateira, baforeira e baga. As plântulas de mamona são difíceis de serem regeneradas *in vitro* em função de sua recalcitrância. Para obter um bom protocolo de regeneração *in vitro*, deve-se oferecer ao explante o meio de cultivo e a concentração de sacarose ideal para as suas necessidades no desenvolvimento e crescimento. Este trabalho objetivou avaliar diferentes formulações de meios nutritivos desenvolvidos por Margara e concentrações de sacarose em relação à regeneração de plântulas de mamoneira *in vitro*. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Centro de Ciências Agrárias na Universidade Federal da Paraíba Campus II na cidade de Areia – PB. Foram utilizadas sementes de mamoneira da variedade E1P17 A/B. As sementes foram desinfestadas e transferidas para placas de Petri, onde foram retirados os eixos embrionários utilizados como explantes. Os eixos embrionários foram inoculados, no experimento 1, em oito diferentes de meios nutritivos de Margara (N5Ca, N30Ca, N30K, N15K, N15Ca, N45K, N5K, N30NH₄) e no experimento 2, em meio N5Ca com concentrações de sacarose de 0, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0%, todos suplementados com vitaminas do meio B5, com 1,0 mg.L⁻¹ de TDZ (tidiazuron), 3% de sacarose e 7 g.L⁻¹ de ágar e o pH foi ajustado para 5,7. No primeiro experimento, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 8 Tratamentos e 10 repetições e os resultados foram interpretados por meio do teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Scott e Knott. No experimento 2, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 6 tratamentos e 10 repetições e os dados foram submetidos à análise de variância e regressão. Os meios N5Ca, N30Ca e N15Ca, apresentaram os melhores resultados em relação as variáveis número e comprimento de raízes. Assim, é possível propagar mamoneira *in vitro* utilizando o meio N5Ca de Margara, e sacarose a 3% apresentou melhor resposta morfogênica

Palavras-chaves: Euphorbiaceae, meios de Margara, sacarose.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF *IN VITRO* REGENERATION PROTOCOLS FOR CASTOR BEAN PLANTLETS (*Ricinus communis* L.).

The castor bean plant (*Ricinus communis* L.) of *Euphorbiaceae* family is also known as “carrapateira”, “baforeira” and “baga”. The castor bean plantlets are hard to be *in vitro* regenerated because its recalcitrance. Aiming to obtain a good *in vitro* regeneration protocol, they had offered the ideal culture medium and concentration of sucrose to the explants, for their development and growth needs. The aim of this work was to evaluate different nutrient medium formulations developed by Margara and sucrose concentrations relating to *in vitro* regeneration for castor bean plantlets. The experiment was conducted in Tissue Culture Laboratory of Agricultural Sciences Center from Universidade Federal da Paraíba, Campus II, Areia – PB. Castor bean seeds of variety E1P17 A/B were utilized. The seeds had been sterilized and transferred to Petri dishes, from which embryonic axis utilized as explants was removed. The embryonic axis had been inoculated, in the 1 experiment, along eight different nutritive mediums of Margara and in the 2 experiment, in N5Ca medium with sucrose concentrations of 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 and 5.0%, both supplemented with B5 medium vitamins, with 1.0 mg.L⁻¹ TDZ (thidiazuron), 3% sucrose, 7 gL⁻¹ agar and pH was adjusted to 5.7. At first experiment, the experimental design was entirely randomized with 8 treatments and 10 replications, being the results interpreted by F test having the means compared with Scott e Knott’s test. At second experiment, the experimental design was completely randomized with 6 treatments and 10 replications, being data submitted to analyses of variance and regression. N5Ca, N30Ca e N15Ca mediums showed the best results related to number and roots length variables. The best result related to plantlet length, plantlet width and hypocotyls length, was obtained in 30 g.L⁻¹ concentration. Therefore, it’s possible to propagate *in vitro* castor bean plant utilizing N5Ca medium of Margara and sucrose by 3% had shown the best morphogenetic result.

Keywords: Euphorbiaceae, mediums of Margara, sucrose.

1. INTRODUÇÃO:

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) pertence à família *Euphorbiaceae*, dicotiledônea, que inclui um grande número de espécies nativas da região tropical. Também chamada carrapateira, baforeira e baga é uma planta de hábito arbustivo, com diversas colorações de caule, folhas e frutos tipo racemos (cachos), podendo possuir cera no caule e pecíolo. Os frutos, geralmente, apresentam espinhos. Podendo suas sementes apresentar diferentes tamanhos, formatos e grande variabilidade de coloração. (AMORIM NETO et al., 2001; AZEVEDO et al., 1997; LORENZI, 2002). Plântulas de mamona são difíceis de serem regeneradas *in vitro* em função de severa recalcitrância natural (AHN et al, 2007).

Para se obter um bom protocolo de regeneração *in vitro*, alguns fatores devem ser observados, dentre eles, a origem do explante e o meio nutritivo onde serão cultivados. Neste sentido, deve-se oferecer ao explante o meio de cultivo ideal para as necessidades da espécie em questão, apresentando este, todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento e crescimento da plântula *in vitro*. Diversas formulações de meio de cultura têm sido empregadas na cultura *in vitro*, as quais diferem entre si basicamente em relação à concentração dos sais, macro e micronutrientes. Dessa forma, para cada tipo de explante, espécie e genótipo, geralmente requer meio de cultura mais adequado e eficiente, os quais devem ser determinados experimentalmente (REZENDE et al, 2008).

Muitos dos problemas surgidos na propagação *in vitro* de algumas espécies são atribuídos em grande parte a um balanço incorreto de reguladores de crescimento no meio de cultura, enquanto as quantidades relativas de macronutrientes são geralmente negligenciadas. No entanto, a influência dos componentes minerais ainda não é totalmente entendida na cultura *in vitro*, de modo que há necessidade de determinações mais precisas para cada espécie ou genótipo em particular. (LORETI et al, 1988).

A maioria das pesquisas realizadas com *Ricinus communis* L. *in vitro* utilizou o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) como meio de cultura, (SUJATHA et al, 1998; AHN et al, 2007; CARVALHO; ARAÚJO, 2008; AIRES et al, 2007; CARVALHO et al, 2005; CARVALHO et al, 2006) sendo este, o meio mais utilizado para a maioria das espécies. As concentrações de íons disponíveis no meio MS, como o N, Ca e K, podem ser elevadas para a necessidade da plântula em desenvolvimento, sendo necessário verificar outras formulações com concentrações de macro e micronutrientes alternativas ao meio MS, como por exemplo, as formulações desenvolvidas por Margara (1978) que possuem concentrações menores de sais, os quais Miller et al. (2000) utilizaram com sucesso para propagação da fruta-pão.

Um protocolo adequado de regeneração de plântulas *in vitro* também requer uma fonte de carbono para prosperar e desenvolver gêmulas e brotos. Sacarose a 3% é a fonte de carboidrato comumente usada. Em geral, na cultura de tecidos, Murashige e Skoog (1962) atestaram que o uso de sacarose a 3% é melhor do que 2% ou 4%. Entretanto, existem vários relatos sobre o uso de outras fontes de carboidratos na iniciação e proliferação de brotos. Em mamoneira a fonte de carbono freqüentemente utilizada é a sacarose na concentração de 3% (SUJATHA et al, 1998; AHN et al, 2007; CARVALHO; ARAÚJO, 2008; AIRES et al, 2007; CARVALHO et al, 2005; CARVALHO et al, 2006, AHN, 2008). Entretanto, sua necessidade vem sendo discutida por alguns autores. Phillips e Hubstenberger (1985) trabalhando com regeneração de plantas de *Capsicum* sp. *in vitro*, observaram que glicose é uma fonte de carbono superior a sacarose. Os níveis de sacarose, normalmente usados em cultura de tecidos, podem inibir a síntese de clorofila (GEORGE; SHERRINGTON, 1984).

Diante do exposto, o presente trabalho objetiva avaliar diferentes formulações dos meios nutritivos desenvolvidos por Margara (1978) e concentrações de sacarose em relação à regeneração de plântulas de mamoneira *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local do experimento

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Centro de Ciências Agrárias (CCA) na Universidade Federal da Paraíba (UFPB) – Campus II na cidade de Areia – PB.

2.2. Material Vegetal

Foram utilizadas sementes de mamoneira da variedade E1P17 A/B cedidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Centro Nacional de Pesquisa do Algodão (CNPA), em Campina Grande – PB.

2.3. Desinfestação das sementes e obtenção de explantes

Inicialmente foi retirado o tegumento das sementes, em seguida as sementes sem tegumentos foram postas em saquinhos de gaze e imersas em 100 mL de solução de água sanitária (2,5% cloro ativo + 1,0 mL de Tween 20) por 20 minutos sob agitação. Passado este período, as sementes foram enxaguadas quatro vezes em água destilada, deionizada e autoclavada (DDA), onde permaneceram imersas na última água de enxágüe por 24 horas antes da inoculação. Todas as operações foram realizadas na câmara de fluxo laminar.

Após o enxágüe as sementes foram transferidas assepticamente para placas de Petri contendo papel de filtro, ambos estéreis, onde foram retirados os eixos embrionários, os quais foram utilizados como explantes.

2.4. Avaliação das diferentes formulações de meios nutritivos de Margara (1978) sobre a regeneração de plântulas de *Ricinus communis* L. *in vitro*

Os eixos embrionários de sementes de mamoneira foram inoculados em oito diferentes formulações de meios nutritivos de Margara (1978) (Tabela 1), com macro e micronutrientes, suplementados com vitaminas do meio B5, com 1,0 mg.L⁻¹ de TDZ (tidiazuron), 3% de sacarose e 7 g.L⁻¹ de Agar. O pH foi ajustado para 5,7 ± 0,1, utilizando hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico(HCl), foram vertidos 10 mL de meio por tubo de ensaio antes da

autoclavagem a 120°C por 15 minutos. Após a inoculação os tubos de ensaios foram levados a sala de cultura onde foram mantidos durante 5 dias em condições de escuro absoluto a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, e posteriormente foram submetidos por 25 dias sob um fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) a $27 \pm 1^\circ\text{C}$.

Após esse período e antes de serem transferidas para um novo meio de cultura, as plântulas foram fotografadas e medidas quanto ao número de raízes, comprimento das raízes, comprimento do hipocótilo e número de folhas.

2.5. Delineamento estatístico

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 8 Tratamentos e 10 repetições. Os resultados foram interpretados estatisticamente por meio do teste F ao nível de 5% de probabilidade e as médias foram comparadas pelo teste de Scott e Knott.

Tabela 1. Concentrações de macro e micronutrientes dos Meios de Margara(1978) utilizados como tratamentos.

Macronutrientes (mg.L⁻¹)								
Meios	KNO₃	NaNO₃	NH₄NO₃	Ca(NO₃)₂.4H₂O	CaCl₂.2H₂O	MgSO₄.7H₂O	KCl	KH₂PO₄
N5 Ca (T1)			80	354	292	246	149	136
N30 Ca (T2)	808		480	1.180		246	74.5	136
N30 K (T3)	1.313		480	590		246	74.5	136
N15 K (T4)	606		240	354		246	149	136
N15 Ca (T5)	101		240	944		246	149	136
N45 K (T6)	1.818	85	720	944		246	372.5	136
N5 K (T7)	75.8		80	265.5		246	372.5	136
N30 NH₄ (T8)	606		800	472		246	372.5	136
Micronutrientes (µg.L⁻¹)								
Meios	MnCl₂	ZnSO₄.H₂O	H₃BO₃	KI	CuSO₄.5H₂O	NaMoO₄.H₂O	FeSO₄.7H₂O	NaEDTA.2H₂O
Todos	157	500	500	10	100	59	35.000	30.000

2.6. Avaliação de diferentes concentrações de sacarose.

Determinada a melhor formulação de macro e micronutrientes (N5Ca), foi realizado este experimento para determinar a melhor concentração de sacarose. Para tanto, eixos embrionários, obtidos conforme o item 2.3, foram inoculados em meio N5Ca suplementado com vitaminas do meio B5, $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ, 7 g.L^{-1} de ágar, e diferentes concentrações de sacarose 0, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0%. O pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$, utilizando hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl), foram vertidos 10 mL de meio por tubo de ensaio antes da autoclavagem a 120°C por 15 minutos. Após a inoculação os tubos de ensaios foram levados a sala de cultura onde foram mantidos durante 5 dias em condições de escuro absoluto a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, e posteriormente foram submetidos por 25 dias sob um fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) a $27 \pm 1^\circ\text{C}$. Passados 30 dias nesses meios de cultura, os explantes foram avaliados quanto ao número de folhas, comprimento da plântula, largura da plântula, comprimento do hipocótilo, espessura do hipocótilo, comprimento e largura da folha e número de plantas mortas.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 6 tratamentos e 10 repetições e os dados foram submetidos à análise de variância e regressão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação das diferentes formulações de meios nutritivos de Margara (1978) sobre a regeneração de plântulas de *Ricinus communis* L. *in vitro*

Os resultados obtidos neste experimento são apresentados nas tabelas 1 e 2. De acordo com a análise de variância (Tabela 1), observa-se que houve diferenças significativas entre as diferentes formulações de meio nutritivos utilizados neste trabalho, ao nível de 5% e 1% de probabilidade, para as variáveis número e comprimento de raízes, respectivamente. Quando os dados foram submetidos ao teste de comparação de médias dos tratamentos (Tabela 2), verificou-se que os tratamentos 1, 2 e 5 (N5Ca, N30Ca e N15Ca, respectivamente), apresentaram as melhores performances em relação as variáveis número e comprimento de raízes, embora não haja diferença estatística entre eles, a maior média para a variável número de raízes foi do meio nutritivo N15Ca (1.646), seguido do N5Ca (1.557), que apresentou as melhores médias em relação as demais variáveis, indicando que o meio é o mais adequado para o desenvolvimento das plântulas de mamoneira *in vitro*. Contudo, é importante salientar que para as variáveis comprimento de hipocótilo e número de brotos, não houve diferenças estatisticamente significativas entre as oito formulações de meios utilizados.

Tabela 2. Resumo da análise de variância das diferentes formulações de Meios de Margara (1978) sobre a morfogênese *in vitro* de *Ricinus communis* L.

F.V	Quadrado Médio			
	Número de raízes (cm)	Comprimento das raízes (cm)	Comprimento do hipocótilo (cm)	Número de brotos (cm)
Tratamentos	0,6211*	0,6928**	0,7856 ^{ns}	0,0671 ^{ns}
Resíduo	0,2481	0,1963	0,6591	0,1016
CV (%)	38,75	53,06	60,93	21,27

Tabela 3. Comparações de médias das diferentes formulações de meios de Margara (1978) sobre a morfogênese *in vitro* de *Ricinus communis* L.

Tratamentos	Número de raízes (cm)	Comprimento das raízes (cm)	Comprimento do hipocótilo (cm)	Número de brotos (cm)
1 (T1)	1.557 a	1.38 a	1.96 a	1.60 a
2 (T2)	1.502 a	0.89 b	1.33 a	1.57 a
3 (T3)	1.267 b	0.88 b	1.45 a	1.54 a
4 (T4)	1.072 b	0.80 b	1.22 a	1.54 a
5 (T5)	1.646 a	0.85 b	1.28 a	1.50 a
6 (T6)	1.016 b	0.62 b	1.17 a	1.4 a
7 (T7)	1.162 b	0.79 b	1.21 a	1.5 a
8 (T8)	1.061 b	0.47 b	1.04 a	1.4 a

Médias seguidas das mesmas letras na vertical pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

A composição do meio de cultura tem uma importante função na organogênese *in vitro* (GEORGE, 1993). O efeito do meio de cultura resulta da unificação das interações dos vários elementos que o constituem. Alguns deles estimulam o processo de desenvolvimento *in vitro*, enquanto outros têm pouca ou nenhuma influência sobre esse processo (RUGINI; CARICATO, 1995; CHIKH 2000; GRIGORIADOU et al., 2002; BRHADDA et al., 2003, MANSERI-LAMRIOURI, 2009). A maioria dos trabalhos com mamoneira, inclusive os mais recentes, têm utilizado o meio MS suplementado com altas concentrações de reguladores de crescimento para induzir a organogênese *in vitro*. (GANESH KUMARI, 2008; AHN et al, 2007). O meio MS apresenta alta concentração iônica (95,75mM) quando comparado as formulações de meios de Margara (1978)(Quadro 2). No Quadro 2, é possível estabelecer uma relação entre as diversas formulações de meios utilizados neste trabalho. Ao compará-los, verifica-se que a proporção de íons nitrato/amônia é igual entre os meios N5Ca e N5K (4,03 meq/L⁻¹), entre N15Ca e N15K esta relação é de 4,01 meq/L⁻¹ e, finalmente, entre N30Ca e N30K essa relação permanece praticamente inalterada 4,0 meq/L⁻¹. Enquanto que N30NH₄ essa proporção cai pela metade (2,0 meq/L⁻¹). Portanto, o que está variando entre os diferentes meios de cultivo são

Tabela 4. Composição iônica dos macro e micronutrientes dos Meios de Margara (1978) e do meio MS (Murashige e Skoog, 1962):

Meios	NO ³⁻ meq/l	PO ₄ ³⁻ meq/l	SO ₄ ³⁻ meq/l	Cl ⁻ meq/l	K ⁺ meq/l	Ca ²⁺ meq/l	Na ⁺ meq/l	Mg ²⁺ meq/l	NH ₄ ⁺ meq/l	H ⁺ meq/l	Total N meq/l	NH ₄ ⁺ /N radio	NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺ radio	∑I ⁺ meq/l	N/∑I radio	PO ₄ ³⁻ /∑I radio	K ⁺ /∑I radio	Total de concentração o iônica
N5Ca	3.99	2.99	1.99	5.97	2.99	6.96		1.99	0.99	1.99	4.98	0.19	4.03	14.92	0.16	0.10001	0.1	22.39
N30Ca	23.98	2.99	1.99	0.99	9.99	9.99		1.99	5.99	1.99	29.97	0.19	4	29.95	0.5	0.0499	0.166	50.92
N30K	23.98	2.99	1.99	0.99	14.98	4.99		1.99	5.99	1.99	29.97	0.19	4	29.94	0.5	0.0499	0.25	53.41
N15K	11.99	2.99	1.99	1.99	8.99	2.99		1.99	2.99	1.99	14.98	0.19	4.01	18.95	0.39	0.0788	0.237	32.43
N15Ca	11.99	2.99	1.99	1.99	3.99	7.99		1.99	2.99	1.99	14.98	0.19	4.01	18.95	0.39	0.0788	0.105	29.93
N45K	35.97	2.99	1.99	4.99	23.97	7.99	0.99	1.99	8.99	1.99	44.96	0.19	4	45.92	0.48	0.0325	0.26	83.88
N5K	3.99	2.99	1.99	4.99	6.74	2.24		1.99	0.99	1.99	4.98	0.19	4.03	13.95	0.17	0.1071	0.241	22.8
N30NH4	19.98	2.99	1.99	4.99	11.99	3.99		1.99	9.99	1.99	29.97	0.33	2	29.95	0.5	0.0499	0.2	53.92
MS	39.4	3.74	3	5.98	20.04	5.98		3	20.61	2.49	60.01	0.34	1.91	52.12	0.57	0.0358	0.192	95.75

Copilado de George (1993).

basicamente as concentrações de N, Ca e K. Como as diferentes concentrações de N (5, 15 e 30 mM, concentração de N total) estão sempre acompanhadas de Ca ou K, os efeitos entre os tratamentos considerando uma mesma concentração de nitrogênio, portanto, devem ser atribuídas as diferentes concentrações desses dois íons no meio de cultivo. Neste trabalho quando analisamos a variável comprimento de raízes, verificamos que as melhores formulações de meios nutritivos foram N30Ca, N5Ca e N15Ca (Tabela 2). Todos os meios continham concentrações superiores do íon Ca^{2+} em relação aos demais meios utilizados. George (1993) relacionou o não crescimento de raízes cultivadas *in vitro* a altas concentrações nitrogênio na forma reduzida (NH_4^+) no meio de cultivo, e a promoção do crescimento ao nitrato (NO_3^-), inclusive sugeriu que meios para cultura de raízes, devem conter muito pouco ou nenhum íon NH_4^+ . Embora o tratamento N30Ca possua seis vezes mais nitrogênio ($29,99 \text{ meq/L}^{-1}$) em relação ao N5Ca ($4,99 \text{ meq/L}^{-1}$), poderia se deduzir que ele deveria inibir o comprimento da raiz quando comparado ao meio N5Ca, porém, ele também apresenta maior concentração de íons de Ca^{2+} ($9,9 \text{ meq/L}^{-1}$) contra $6,96 \text{ meq/L}^{-1}$ do meio N5Ca, ou seja, 1,5 vezes mais cálcio do que o N5Ca, indicando que o cálcio é muito importante para a morfogênese e crescimento da raiz. Wyn Jones e Hunt (1967) demonstraram que a deficiência de cálcio nas plantas resulta em pouco ou nenhum crescimento da raiz e no escurecimento e na ondulação das margens de folhas apicais. A importância do baixo nível de íons NH_4^+ também é enfatizada por maior regeneração e formação de ramos adventícios observados em várias espécies herbáceas (PIERIK, 1976; MARGARA, 1978; TANIMOTO; HARADA, 1981; MARGARA; PIOLLAT, 1982).

O número de raízes foi significativamente maior no meio N5Ca, onde tem-se menor concentração de íons amônia (NH_4^+) e uma concentração relativamente alta de íons de Ca^{2+} ($6,96$). Confirmando a eficiência do cálcio na morfogênese da raiz. Segundo Manseri-Lamriouri (2009) trabalhando com *Prunus avium* L. verificaram que meios com baixa concentração salina, também resultaram em maior porcentagem de brotamento e a concluíram que a contribuição do nitrogênio e do cálcio foi principalmente na forma de KNO_3 e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ao invés de nitrato de amônia (NH_4NO_3) e do CaCl_2 . As outras formulações N30K, N15K, N45K, N5K e N30NH4 apresentaram resultados inferiores para número e comprimento de raízes. Mostrando que altas concentrações dos íons K^+ e NH_4^+ inibem a formação e reduzem o desenvolvimento de

raízes nos explantes. Loreti et al (1988) trabalhando com propagação de pêsego *in vitro* verificaram que a influência do potássio sobre a proliferação de ramos não foi significativa, enquanto para o enraizamento o K^+ reduziu a resposta, e as melhores taxas de proliferação de ramos e enraizamento dos brotos ocorreram em meios com baixos teores de nitrogênio e potássio.

Com relação às variáveis comprimento de hipocótilo e número de brotos, verifica-se que o meio N5Ca apresentou a maior média em comparação aos demais meios de cultivo, embora não haja diferenças estatisticamente significativas. A baixa proliferação de ramos possivelmente seja atribuída a baixa concentração (1 mg.L^{-1}) do regulador de crescimento (TDZ) no meio de cultivo. Trabalhos utilizando TDZ na concentração de 1 mg.L^{-1} com altas concentrações salinas como o MS produziu maior número de brotos (≈ 25) em mamoneira (SUJATHA; SAILAJA, 2005; AHN et al., 2007 e AHN; CHEN, 2008). O meio N5Ca embora apresente a maior média ele apresenta a mais baixa concentração de nitrogênio total dos meios avaliados neste trabalho (5 mM). Koetje et al, (1989) e Grimes e Houge (1990) trabalhando com *Oryza sativa* demonstraram que quando a relação nitrato/amônia é alta (80:20) no meio com regulador de crescimento 2,4-D na concentração de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, ocorria a indução de embriogênese a partir de calo, contudo, quando essa relação mudou para (66:34) ou (50:50), o regulador de crescimento foi menos efetivo. Talvez aumentando a concentração de TDZ em trabalhos futuros possa melhorar a morfogênese de ramos de mamoneira *in vitro* usando a formulação N5Ca de Margara (1978).

3.2 Avaliação de diferentes concentrações de sacarose.

A sacarose é a mais importante fonte de carbono utilizada nos meios de cultura de plantas *in vitro* (GEORGE, 1993). Os resultados obtidos neste experimento são apresentados na Tabela 3. As diferentes concentrações de sacarose utilizadas neste trabalho apresentaram efeitos significativos em relação às variáveis comprimento da plântula, largura da plântula e comprimento do hipocótilo, entretanto, as regressões foram não significativas para a grande maioria das variáveis analisadas e significativa apenas para a variável comprimento do hipocótilo (Grau 2), conforme verifica-se na

análise de regressão na tabela abaixo. Para as demais variáveis não houve diferenças significativas.

Tabela 5. Resumo da análise de variância de diferentes concentrações de sacarose na formulação do meio N5Ca de Margara (1978) sobre a morfogênese *in vitro* em *Ricinus communis* L. Areia, PB. 2010.

Fonte de Variação	Quadrado Médio							
	Comprimento Plântula	Largura Plântula	Comprimento Hipocótilo	Espessura Hipocótilo	Comprimento Folha	Largura Folha	Número de folhas	Número de Plantas Mortas
Tratamentos	0.73*	0.12*	0.13*	0.024 ^{ns}	0.095 ^{ns}	0.03 ^{ns}	0.042 ^{ns}	0.038 ^{ns}
GRAU 1	0.31 ^{ns}	0.32 ^{ns}	0.06 ^{ns}	0.07 ^{ns}	0.25 ^{ns}	0.02 ^{ns}	0.045 ^{ns}	0.086 ^{ns}
GRAU 2	2.32 ^{ns}	0.007 ^{ns}	0.520*	0.03 ^{ns}	0.044 ^{ns}	0.072 ^{ns}	0.049 ^{ns}	0.003 ^{ns}
GRAU 3	0.11 ^{ns}	0.07 ^{ns}	0.025 ^{ns}	0.003 ^{ns}	0.0709 ^{ns}	0.005 ^{ns}	0.068 ^{ns}	0.023 ^{ns}
C.V (%)	19.22	32.02	26.2	43.52	37.407	41.62	19.20	32.37

Das diferentes concentrações de sacarose utilizadas neste trabalho, a melhor resposta em relação as variáveis comprimento de plântula (Figura 2), largura de plântula (Figura 3) e comprimento de hipocótilo (Figura 4), foi conseguida na concentração de 30 g.L⁻¹ mesmo em um meio (N5Ca) com baixa concentração de sais (Margara, 1978).

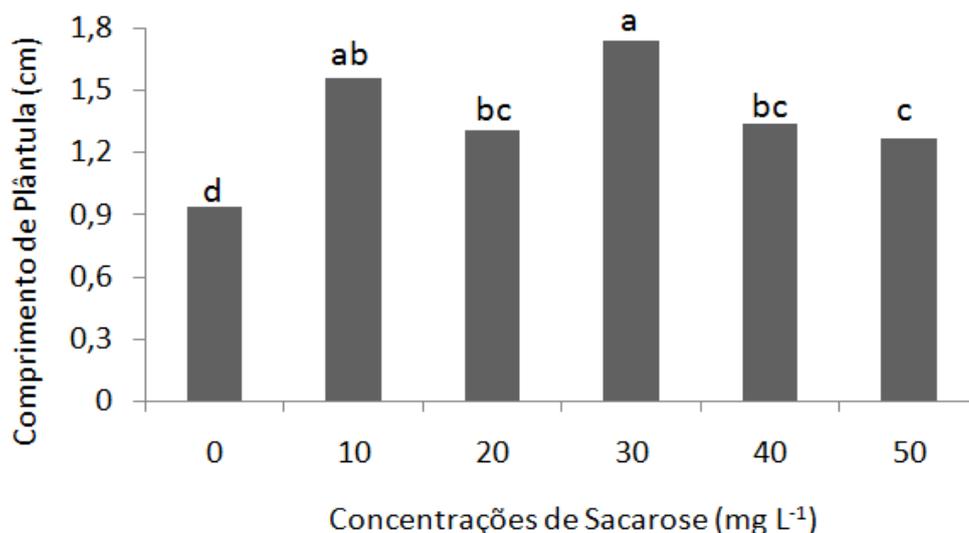


Figura 1: Efeito das concentrações de sacarose no comprimento das plântulas de mamoneira (*Ricinus communis* L.) *in vitro*.

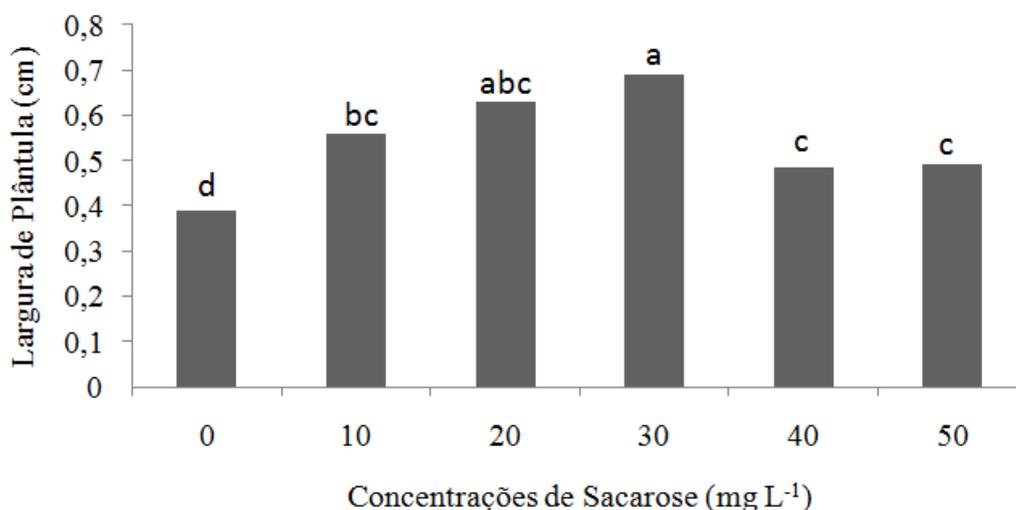


Figura 2: Efeito das diferentes concentrações de sacarose sob a largura da plântula de mamona (*Ricinus communis* L.)

O comprimento de hipocótilo foi a única variável em que a regressão foi significativa. Analisando a Figura 4, verifica-se uma tendência de crescimento de hipocótilo a medida que aumenta a concentração de sacarose até a concentração de 30 g.L⁻¹, depois, aumentando a concentração de sacarose ocorre redução no crescimento do hipocótilo e na morfogênese da planta. Altas concentrações de 40 e 50 g.L⁻¹ causa desenvolvimento irregular do hipocótilo, com coloração e forma diferente de uma plântula em sua normalidade (Fig.5). Por outro lado, também foi observado neste experimento que a ausência de sacarose (T0), a plantula de mamona fica verde até 15 dia (Figura 5), porém não se desenvolve e, posteriormente, morre.

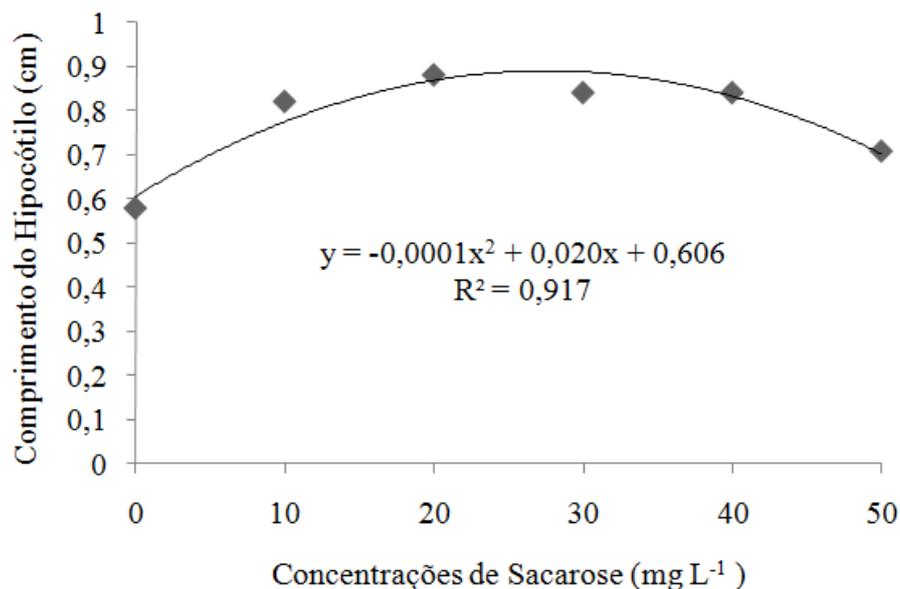


Figura 3: Efeito das diferentes concentrações de sacarose no comprimento do hipocótilo da plântula de mamoneira (*Ricinus communis* L.)

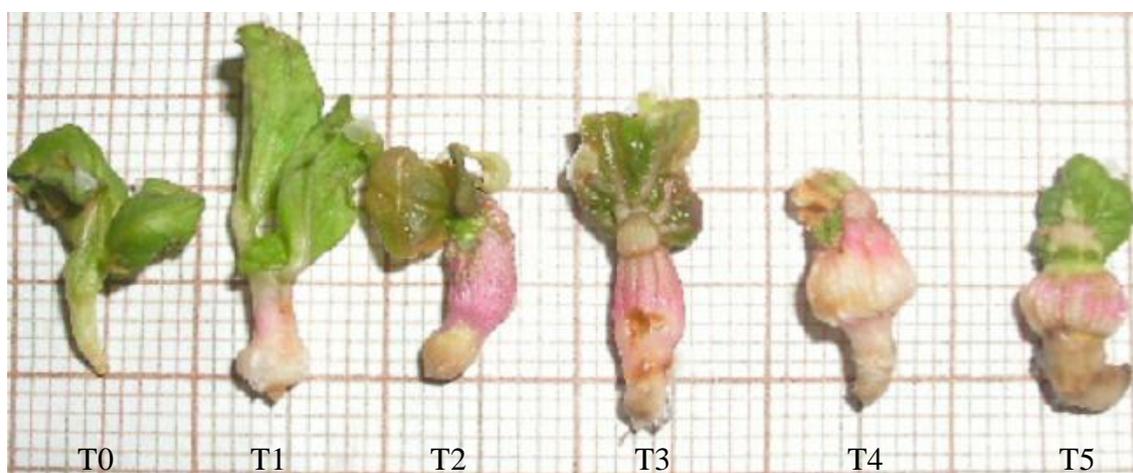


Figura 4. Plântulas de mamoneira (*Ricinus communis* L.) submetidas a diferentes concentrações de sacarose (T0 = 0; T1 = 10; T2 = 20; T3 = 30; T4 = 40; e T5 = 50 gL⁻¹)

Trabalhos recentes de propagação *in vitro* de mamoneira adotam a sacarose na concentração de 30 g.L⁻¹ como consequência da utilização do meio MS (Murashige e Skoog, 1962) (SUJATHA; SAILAJA 2005; AHN et al., 2007 e AHN; CHEN 2008. GANESH KUMARI et al.,2008) utilizando também os sais do meio MS, vitaminas do

meio B5 (GAMBORG, 1968) e diferentes fontes de carboidrato em diferentes concentrações, relataram que o melhor fonte de carbono é a sacarose na concentração de 30 g.L⁻¹. É importante realçar que o meio MS apresenta altas concentrações de sais (95,75 mM). George (1993) relatou que há uma interação entre nitrogênio e o açúcar no meio de cultivo. Margara e Rancille, (1966); Gamborg et al, (1974) tem relatado que a morfogênese é realçada quando altos níveis de nitrogênio e adequada concentração de sacarose estão presentes no meio de cultura. A absorção é dependente da natureza e concentração do açúcar no meio, sendo mais lenta na presença de frutose do que quando a sacarose ou glicose são fornecidas (HEW et al, 1988). A taxa de crescimento de *Rosa* “Paul’s Scarlet” em cultura de suspensão celular foi influenciada pela relação de NO₃⁻ /sacarose no meio. Alta proporção favoreceu o acúmulo de nitrogênio reduzido, mas não a mais rápida taxa de crescimento celular (FLETCHER, 1980). Em mamoneira, Ganesh Kumari et al.,(2008) estudaram os efeitos da sacarose, glucose, fructose e maltose, variando de 10 a 40 g.L⁻¹, sobre a indução organogênica de calo e proliferação de ramos. Durante a proliferação de ramos, a sacarose a 30 g.L⁻¹ apresentou a melhor resposta. Os meios suplementados com outros açúcares e outras concentrações, a porcentagem de indução de ramos foi reduzida. Ao mesmo tempo, a necrose dos calos foi observado no meio com glicose, frutose ou maltose. Similarmente, a multiplicação de ramos mediada por sacarose em *Coryllus ayellana* foi efetivamente conseguida e o máximo de 3 a 4 ramos foram regenerados (YU et al, 1993). Na natureza os açúcares são transportados dentro da planta como sacarose e o tecido pode ter a mesma capacidade para absorver, transportar e utilizar sacarose (SUL E KORBAN, 2004)

4. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que:

1. É possível propagar mamoneira *in vitro* utilizando o meio N5Ca de Margara (1978), especialmente na fase inicial; sendo a concentração de sacarose a 3% a que apresentou a melhor resposta morfogênica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AHN, Y. J.; CHEN, G. Q. In Vitro Regeneration of Castor (*Ricinus Communis* L.) Using Cotyledon Explants. **Hortscience**, 2008.

AHN, Y.; VANG, L.; McKEON, T. A.; CHEN, G. Q. High-frequency plant regeneration through adventitious shoot formation in castor (*Ricinus communis* L.). **In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant** (2007)

AIRES, P. S. R.; CARVALHO, J. M. F. C.; PIMENTEL, N. W. SILVA, H. Efeito da concentração de vitaminas e das fontes de carbono no superbrotamento da mamona utilizando o genótipo BRS Nordestina. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*.v.7, n.2, 2007.

AZEVEDO, D. M. P. de; BELTRÃO, N. E. de M.; BATISTA, F. A. S.; LIMA, E. F. Arranjo de fileiras no consórcio mamona/milho. Campina Grande: **Embrapa Algodão**, 21p. 1997.

AMORIM NETO, M. da S.; ARAÚJO, A. E. DE; BELTRÃO, N. E. de M. CLIMA E SOLO. In: AZEVEDO, D. M. P. DE; LIMA, E. F. O agronegócio da mamona no Brasil. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, p. 63-76. 2001.

BRHADDA, N.; ABOUSALIM, A.; LOUDIYI, D.; BENALI, D. Effect of culture medium on micropropagation of olive (*Olea europae* L.) cv. Moroccan Picholine. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**. 2003.

CARVALHO, J. M. F. C.; RIBEIRO, C. S. N.; SILVA, H. S.; SANTOS, J. W. Propagação *In Vitro* e Aclimação a partir de Sementes Inviáveis Armazenadas no Banco Ativo de Germoplasma de Mamona. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Embrapa Algodão, Campina Grande, PB. 2005.

CARVALHO, J. M. F. C.; ARAÚJO, S. S.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M, J. L.; MILANI, M. Regeneração *In Vitro* do Banco Ativo de Germoplasma da Mamona (*Ricinus communis* L.). Comunicado técnico, Campina Grande, 2006.

CARVALHO, J. M. F. C.; ARAÚJO, S. S. Técnicas de Cultivo *In Vitro* Aplicadas na Mamoneira. Campina Grande, 2008.

CHIKH M. Etude de la multiplication du merisier (*Prunus avium* L.) par semis après levée de dormance et par micropropagation à partir de drageons. Mémoire. Magister. I.N.A El Harrach, 112 p. 2000.

FLETCHER, J. S. Influence of nitrate and sucrose supply on the growth and senescence of Paul's Scarlet rose cells. **Plant Physiol**. 1980.

GAMBORG, O. L.; CONSTABEL, F.; SHYLUK, J. P. Organogenesis in callus from shoot apices of *Pisum sativum*. **Physiol. Plant**, 1974.

GAMBORG, O. L.; LARUE, T. A. G. Ethylene produced by plant cells in suspension cultures of wheat and barley. **Can. J. Biochem.** 1968.

GEORGE, E. F. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Part 1. The Technology. 2^o Ed. 1993.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Exegetics Ltda., Basingstoke, England. 1984.

GRIGORIADOU, K.; VASILAKAKIS, M.; ELEFThERIOU, E. P. *In vitro* propagation of the Greek olive cultivar 'Chondrolia Chalkidikis'. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 2002.

HEW, C. S.; TINK, S. K.; CHIA, T. F. Substrate utilization by *Dendrobium* tissues. **Bot. Gaz.** 1988.

KUMARI, K. G.; GANESAN, M.; JAYABALAN, N. Somatic organogenesis and plant regeneration in *Ricinus communis*. **Biologia Plantarum**, 2008

LORENZI, H; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

LORETI, F.; MORINI, S.; CONCETTI, S. Effect of potassium and nitrogen concentration on growth of peach shoots culture in vitro. **Acta Horticulturae**, 227, Vegetative Propagation Woody Species. 1988.

MANSSERI-LAMRIOUI, A.; LOUERGUIOUI, A.; ABOUSALIM, A. Effect of the Medium Culture on the Micro Cutting of Material Resulting from Adult Cuttings of Wild Cherry Trees (*Prunus Avium* L.) and of in Vitro Germination. **European Journal of Scientific Research**, 2009.

MARGARA, J. Mise au point d'une gamme de milieux minéraux pour les conditions de la culture 'in vitro'. **Compt. Rend. Scances Acad.** France 64, 654-661. 1978

MARGARA, J; RANCILLAC, M. Observation préliminaires sur role Du milieu nutritif dans l'initiation florale dès bourgeons néoformes *in vitro* chez *Cichoriun intybus* L. **Comp. Rend. Acad. Sci.** Paris, 1966.

MILLER, J. R.; DUNCAN, J. E. *In vitro* propagation of *artocarpus altilis* (park.) Fosberg (breadfruit) from mature plant material. **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, 2000.

MOSHKIN, V. A. **Castor**. New Delhi, 1986.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A. Revesed médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p.473-479, 1962.

PHILLIPS, G. C.; HUBSTENBERG, J. F. Organogenesis in pepper tissue tissue cultures. **Plant Cell Tiss. Cult.** 1985.

REZENDE, J.C.; PASQUAL, M.; CARVALHO, S.P.; PEREIRA, A.B.; VILLA, F. Influência do meio de cultura e concentração de ágar no crescimento e desenvolvimento de plântulas de café oriundas da embriogênese somática direta. **Scientia Agraria**, v.9, n.1, p.21-26, 2008.

RUGINI, E.; CARICATO, G. Somatic embryogenesis and plant recovery from mature tissues of olive cultivars (*Olea europaea* L.) "Canino" and "Moraiolo". **Plant Cell Reports** 1995.

SUJATHA, M.; REDDY, T. P. Differential cytokinin effects on the stimulation of in vitro shoot proliferation from meristematic explants of castor (*Ricinus communis* L.). **Plant Cell Reports**, 1998.

SUJATHA, M.; SAILAJA, M. Stable genetic transformation of castor (*Ricinus communis* L.) via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer using embryo axes from mature seeds. **Plant Cell Reports**, 2005.

SUL, W.; KORBAN, S. S. Effects of salt formulations, carbon sources, cytokinins, and auxin on shoot organogenesis from cotyledons of *Pinus pinea* L. **Plant Growth Regulation**, 2004.

TANIMOTO, S; HARADA, H. Effects of IAA, zeatin, ammonium nitrate and sucrose on the initiation and development in the epidermis of *Torenia* stem segments. **Plant Cell Physiol**. 1981.

VARGAS, D. P. **Mamona (*Ricinus communis* L.): cultura de antera, viabilidade e conservação de pólen**. Dissertação de Mestrado em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas. RS. 2006.

WIN JONES, R. G.; HUNT, O. R. The function of calcium in plants. *Bot. Rev.* 1976.

YU, Y. B.; YANG, S. F. Auxin-induced ethylene production and its inhibition by aminoethoxyvinylglycine and cobalt ion. **Plant Physiol**. 1979.

**POLIPLOIDIZAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* EM MAMONEIRA
(*Ricinus communis* L.) MEDIADA POR TRIFLURALINA**

POLIPLOIDIZAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* EM MAMONEIRA (*Ricinus communis* L.) MEDIADA POR TRIFLURALINA

RESUMO

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma das mais de 7000 espécies da família *Euphorbiaceae*, tendo essa espécie diplóide um número de cromossomos $2n=2x=20$. A tetraploidia em carrapateira foi induzida usando a colchicina, que por ser uma substância cancerígena e cara, vem sendo substituída por herbicidas como a Trifluralina. Esse trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito de diferentes concentrações de Trifluralina na indução de poliplóides de plântulas de mamoneiras germinadas *in vitro* e *ex vitro*. Foram utilizadas sementes de mamoneira da variedade E1P17 A/B. No experimento 1, as plântulas foram colocadas em soluções de Trifluralina nas concentrações de 0, 5, 10, 15, 20, 25 μM por 17h. Após esse período, foram inoculadas em tubos de ensaio com meio N5Ca suplementado com 30g/L^{-1} de sacarose, 0,7% de ágar, 1 mg.L^{-1} de TDZ e o pH foi ajustado para $5,7\pm 0,1$. Avaliou-se o número de folhas, de raízes e comprimento das plântulas. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e 10 repetições. Os resultados foram interpretados por meio da análise de variância e de regressão. No experimento 2, as sementes foram colocadas para germinar em tubetes, ao medirem aproximadamente 7 cm de altura, foi aplicado a solução de Trifluralina na concentração de $10\ \mu\text{M}$ sobre o meristema apical das plântulas. Os tratamentos foram T0 (sem aplicação), T1 (única aplicação), T2 (duas aplicações) e T3 (três aplicações). Foram avaliados densidade estomatal nas folhas, comprimento das sementes e comprimento dos grãos de pólen. A redução máxima no número de folhas e comprimento de plântula foi na concentração de $10\ \mu\text{M}$. O tratamento com 2 aplicações apresentou melhor resposta quanto a comprimento de estômato, largura de estômato e diâmetro de pólen. Conclui-se que para a indução *in vitro* de poliplóides de mamoneira deve-se testar concentrações inferiores a $10\ \mu\text{M}$ ou diminuir o tempo de exposição de 16 horas; e as variações morfológicas são importantes na identificação de plantas poliplóides em mamoneira.

Palavras-chaves: Mamona, poliplóides, Trifluralina.

IN VITRO AND EX VITRO POLYPLOIDIZATION IN CASTOR BEAN (*Ricinus communis* L.) MEDIATED BY TRIFLURALIN

ABSTRACT

The castor bean plant (*Ricinus communis* L.) is one of the about 7000 species of *Euphorbiaceae* family, being that this diploid specie have chromosomes in number of $2n=2x=20$. Castor bean plant tetraploidy was induced by utilizing colchicines; such substance is expensive and causes cancer, being substituted by herbicides like Trifluralin. This work aimed to evaluate the effect among different Trifluralin concentrations in *in vitro* and *ex vitro* germinated castor bean plants induction of plantlets polyploidy. Castor bean seeds of the variety E1P17 A/B were utilized. In the 1 experiment, the plantlets had being added in Trifluralin solutions with 0, 5, 10, 15, 20, 25 μM concentrations for 17 hours. After this period, were inoculated in test tubes with N5Ca medium supplemented with 3% sucrose, 0.7% agar, 1 mg L⁻¹ TDZ and pH was adjusted to 5.7 ± 0.1 . The leaves and roots number and plantlets length were evaluated. The experimental design was entirely randomized with six treatments and 10 replications. The results were interpreted by analyses of variance and regression. In the 2 experiment, the seeds were put in tubes to germinate, when reach nearly 7cm height, was applied a Trifluralin solution with 10 μM concentration over the apical meristem of the plantlets. The treatments were T0 (no application), T1 (only one application), T2 (two applications) e T3 (three applications). Stomatal density in leaves, seed length and pollen grains length were evaluated. The maximum reduction in the number of leaves and plantlet length occurred in 10 μM concentration. The treatment with 2 applications showed better results about stomata length, stomata width and pollen diameter. Therefore, *in vitro* induction for castor bean polyploidy might be test less 10 μM concentrations or reduce exposition time for 16 hours; and morphological variations are important at polyploidy plants identification in castor bean plants.

Keywords: Castor bean, polyploid, Trifluralin.

1. INTRODUÇÃO

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) também conhecida por carrapateira, palma - crísti e enxerida é uma das mais de 7000 espécies da família Euforbiáceae, possivelmente originária da antiga Abissínia, hoje Etiópia, no continente africano. É uma espécie perene que pode viver mais de 12 anos e atingir mais de 10 metros de altura (MOSHKIN, 1986).

Na primeira década do século XX, os pesquisadores determinaram que o número de cromossomos para todas as espécies diplóides de mamoneira (*Ricinus communis* L.) estudadas eram $2n=2x=20$, os quais estão organizados em dez pares de cromossomos, sendo cinco metacêntricos, dois submetacêntricos e três acrocêntricos (MOSHKIN, 1986).

A colchicina vem sendo amplamente empregada na poliploidização em plantas, assim ela foi reportada pela primeira vez em 1930 por ter essa propriedade (BLAKESLEE; AVERY, 1937). A colchicina atua na despolimerização dos microtúbulos e fibras do fuso mitótico (BARTELS; HILTON, 1973). As células param na metáfase e podem recuperar-se e entrar no ciclo seguinte, com seu número de cromossomos duplicados. Quando os agentes de duplicação cromossômica são aplicados topicamente, surgem quimeras e setores poliplóides podem ser formados e a caracterização da ploidia de camadas meristemáticas é necessária (SEMINIUK e ARISUMI, 1968; TILNEY-BASSETT, 1986). Em função de a colchicina ser uma substância cancerígena e relativamente cara, herbicidas anti-microtúbulos, pertencente a classe das dinitroanilinas (amiprofosmetil, orizalina e trifluralina) vem sendo empregados em substituição a colchicina (EECKHAUT et al., 2004; HANSEN e ANDERSON, 1998; HANSEN et al., 1998; HASSAWI; LIANG, 1991; RAMULU et al., 1991; WAN et al., 1991). A trifluralina tem maior afinidade por microtúbulos de células de plantas do que células animal (BARTELS; HILTON, 1973). Quando comparado a colchicina, a eficiência desse herbicida na poliploidização de plantas tem sido variável, porém promissora.

A tetraploidia em carrapateira foi induzida pela primeira vez por Sidorov e Sokolov (1939) apud (MOSHKIN, 1986) usando a colchicina. As plantas tetraplóides apresentavam folhas grossas, pouco palmadas, coloração verde-escuro, e células muito maiores no tecido foliar. Os estômatos das folhas e os grãos de pólen eram maiores do que os da planta matriz e as sementes eram 1,5 vezes maiores do que os das plantas

diplóides correspondentes (MOSHKIN, 1986). Posteriormente, outros pesquisadores também descreveram novas formas tetraplóides de mamoneira (ISLAM; KHAN, 1960; Nairan e Sing (1968), também usando a colchicina (0,3%), e verificaram que essas plantas apresentavam florescimento tardio, sementes grandes, baixa produtividade e só produziam sementes quando polinizadas com pólen de plantas também tetraplóides. A maioria das sementes de mamoneira de plantas diplóides contém aproximadamente 50% de óleo, o qual é composta de 80 a 90% de ácido ricinoleico (ATSMON, 1989).

Como o nível de ploidia determina, em alguma extensão, o tamanho de folhas, o tamanho de células, o número de cloroplastos por célula e a quantidade de enzimas e pigmentos fotossintéticos nas células de plantas poliplóides (WARNER; EDWARDS, 1989), espera-se que duplicando o número de cromossomos da mamoneira, também ocorra um aumento do teor de óleo produzido pelas sementes.

Assim esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações do herbicida Trifluralina na indução de poliplóides de plântulas mamoneiras germinadas *in vitro* e *in vivo*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e em Casa de Vegetação do Centro de Ciências Agrárias (CCA) na Universidade Federal da Paraíba (UFPB) – Campus II na cidade de Areia – PB.

2.1. Material Vegetal

Foram utilizadas sementes de mamoneira da variedade E1P17 A/B cedidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Centro Nacional de Pesquisa do Algodão (CNPQ), em Campina Grande – PB.

2.2. Experimento 1. Avaliação da resposta morfogênica de plântulas de mamoneira (*Ricinus communis* L.) germinadas *in vitro* e submetidos a solução de Trifluralina em diferentes concentrações por 16 horas.

As plântulas germinadas em meio N5Ca, foram colocadas em soluções de Trifluralina filtro esterilizadas (0,2 μm tamanho do poro da Millipore) nas concentrações de 0, 5, 10, 15, 20, 25 μM por 16h. Após esse período, em que as radículas ficaram em contato com a soluções de Trifluralina em temperatura ambiente, as plântulas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 ml do meio N5Ca suplementado com 3% de sacarose, 0,7% de ágar, 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de TDZ e o pH foi ajustado para $5,7\pm 0,1$, utilizando hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl) antes da autoclavagem à 120°C por 15 minutos. Em seguida os tubos de ensaio foram fechados com tampa de polipropileno e levados para sala de cultura a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) por um período de 40 dias. Avaliou-se o número de folhas, número de raízes e comprimento das plântulas.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e 10 repetições. Os resultados foram interpretados estatisticamente por meio da análise de variância e de regressão.

2.3 Experimento 2. Avaliação de plântulas de mamoneira (*Ricinus communis* L.) germinadas *in vivo* e submetidos a solução de Trifluralina a 10 μ M, aplicada sobre o meristema apical do caule.

As sementes de mamona foram colocadas para germinar em tubetes contendo 170 mm³ de substrato PlantMax, sob irrigação por nebulização em casa de vegetação. 15 dias após a semeadura, quando as plântulas mediam aproximadamente 7 cm de altura, foi aplicado a solução de Trifluralina. Foram adicionados 5 g.L⁻¹ de Agar a solução de Trifluralina na concentração de 10 μ M, a qual foi aquecida em microondas, por 3 minutos, para dissolver o ágar e, após descanso, a mesma apresentava consistência pastosa a 40°C. Em seguida foi pipetado 15 μ l dessa solução sobre o meristema apical do caule de cada uma das plântulas. Após a aplicação, as plantas foram cobertas com sacos plásticos e presos com ligas ao tubete para manter a alta umidade. Os tratamentos consistiram de controle (T0, sem trifluralina), T1 (única aplicação), T2 (duas aplicações) e T3 (três aplicações). Nos tratamentos com mais de uma aplicação, T2 e T3, essas foram realizadas com um intervalo de 24 horas. Sete dias após a aplicação dos tratamentos, foram retirados os sacos plásticos e as plantas foram mantidas na casa de vegetação.

Para determinar a densidade de estômatos nas folhas das plantas, foram coletadas folhas definitivas e sobre a superfície abaxial das mesmas, aplicou-se solução de acetato de celulose/acetona (1:1). Após 5 minutos, a solução secou, formando um filme de acetato de celulose, o qual foi cuidadosamente retirado com auxílio de pinça e montado em lâmina com 100 μ l de água destilada, espalhando-o e cobrindo-o com lamínula. A lâmina montada foi observada ao microscópio óptico numa magnitude de 400x, onde foi tomada a densidade estomatal por campo observado.

Para comparar sementes de plantas sabidamente diplóide e daquelas possíveis tetraplóides, foram colhidos 5 frutos de cada cacho por planta e tomadas as medidas de comprimento e diâmetro com auxílio de paquímetro.

A comparação entre os grãos de pólen foi realizada a partir de botões florais masculinos com anteras recém-abertas (deiscentes), foram coletados e acondicionados em placa de Petri estéril e após etiquetagem, foram levadas ao laboratório para coleta do pólen. Com o auxílio de pinça estéril, coletou-se o pólen sobre lâmina de microscópio livre de impurezas, as quais eram analisadas ao microscópio, sob uma magnitude de

400x. Nesta magnitude, com auxílio de ocular com escala de 100 μm , foram tomadas as medidas de comprimento e diâmetro dos grãos de pólen das plantas diplóides e dos possíveis poliplóides.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Experimento 1: Avaliação da resposta morfogênica de plântulas de mamoneira (*Ricinus communis* L.) germinadas *in vitro* e submetidos a solução de Trifluralina em diferentes concentrações por 16 horas.

Para induzir a poliploidização em plantas de mamoneira, plântulas germinadas *in vitro* foram tratadas com diferentes concentrações do herbicida trifluralina (0, 5, 10, 15, 20 e 25 μM) por 16 horas, conforme descrito no material e métodos. Os resultados deste experimento (Figura 1) indicam quando os explantes são tratados com o herbicida trifluralina na concentração a partir de 5 μM , ocorre uma redução no número de folhas das plântulas tratadas. Foi observado, ao nível de raiz, que após o período de 16 horas na solução de trifluralina, em qualquer concentração, a formação de um bulbo na ponta da raiz, que aumenta em volume a medida que aumenta a concentração da trifluralina no meio. A redução no número de folhas (Figura 1) e comprimento de plântula (Figura 2) foi máxima na concentração de 10 μM , indicando que a partir dessa concentração, pelo período de 16 horas de exposição ao herbicida, começam a ocorrer danos mais severos aos explantes. Dhooche et al, (2009), trabalhando com espécies do gênero *Helleborus* na indução da poliploidização *in vitro*, relataram os efeitos causados pelos agentes antimitóticos: colchicina, orizalina e trifluralina, sobre a viabilidade de ramos e observaram que com orizalina não houve nenhum efeito, exceto para *H. orientales*. Nesta espécie a taxa de sobrevivência diminuiu significativamente quando 10 μM de orizalina foi adicionado ao meio. Similarmente, trifluralina também causou uma diminuição significativa na multiplicação de ramos *H. niger* e *H. orientales*. Embora tenham conseguido, de modo geral, os melhores resultados com os tratamentos de trifluralina.

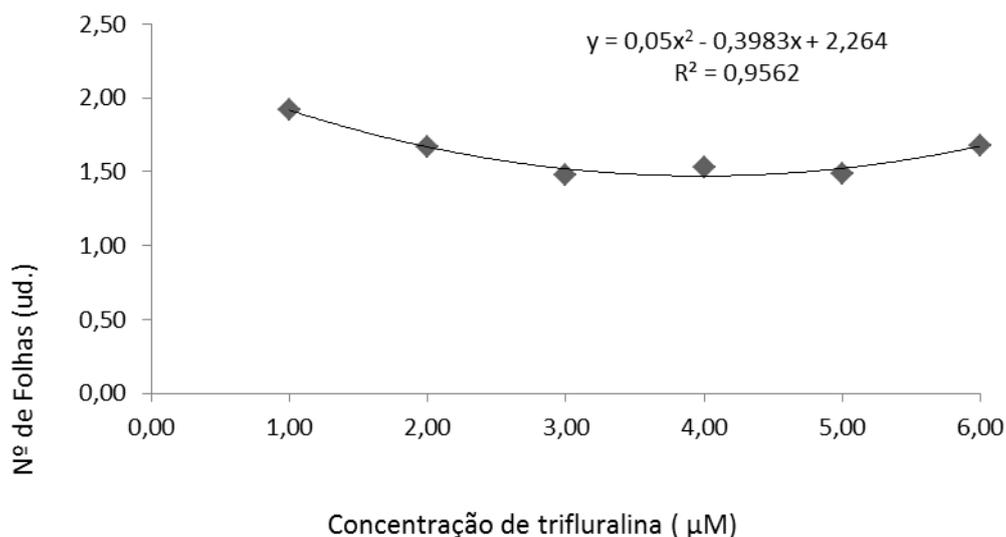


Figura 1. Efeito das concentrações de Trifluralina sob o número de folhas nas plântulas de mamoneira (*Ricinus communis* L.) germinadas *in vitro*.

Khosravi et al., (2008) também induziram a duplicação cromossômica *in vitro* em espécies do gênero *Rosa*, e relataram que as maiores taxas de duplicação (62,5% e 66,7%), foram conseguidas quando os explantes foram tratados com 24 µM de trifluralina e amiprofosmetil (AMP) por 48 horas, respectivamente, as quais estão associadas com as menores taxas de sobrevivência dos explantes (40% e 30% para trifluralina e AMP, respectivamente). Resultados similares também foram obtidos recentemente por Dhooghe et al., (2009), que induziram a formação de tetraploides *in vitro* em *Ranunculus* ornamental, e verificaram que a trifluralina na concentração de 2 µM resultou em altíssima porcentagem de poliploidização (27,5%). Por outro lado, também relataram que o herbicida trifluralina na concentração de 10 µM afetou a drasticamente viabilidade dos explantes *in vitro*. Baixa taxa de sobrevivência pode ser devida a distúrbios fisiológicos causados por inibidores do fuso, resultando em uma taxa de divisão celular reduzida (SWANSON 1957). Em adição, a teoria nucleotípica proposta por Bennett (1972), sugere que o conteúdo de DNA celular e as taxas de desenvolvimento são inversamente relacionados.

Neste experimento observou-se também a dose de 5 µM de trifluralina aparentemente tem um efeito estimulador do crescimento (Figuras 2 e 3). Como acontece com herbicidas como 2,4-D (2,4 ácido diclorofenoxiacético) (MONQUERO,

2005), uma auxina fortíssima, que também é usado como regulador de crescimento na cultura *in vitro* (CIDADE et al., 2006).

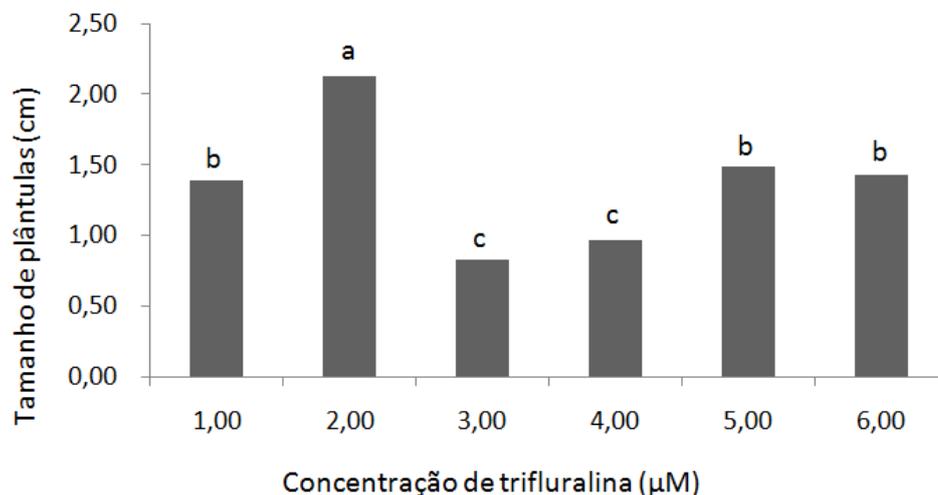


Figura 2. Efeito das concentrações de Trifluralina sob o tamanho das plântulas de mamoneira (*Ricinus communis* L.) *in vitro*

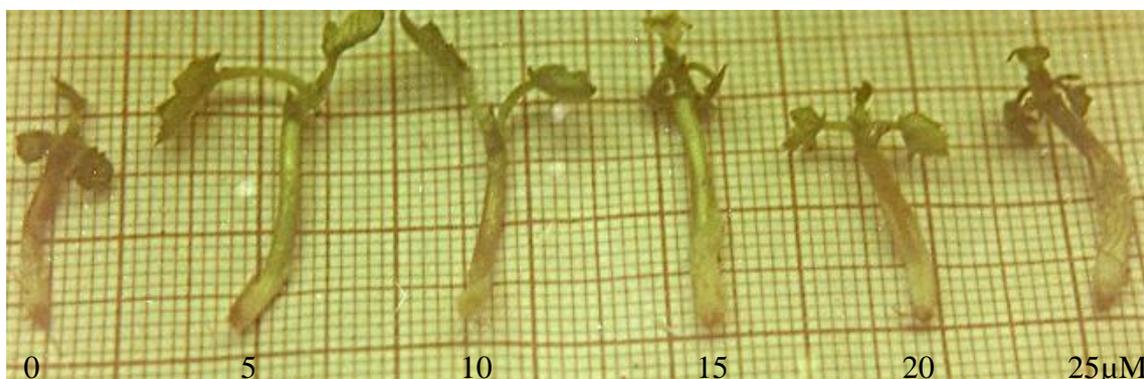


Figura 3. Plântulas de mamoneira (*Ricinus communis* L.) submetidas as concentrações de Trifluralina por 16 h, 30 dias após os tratamentos.

Embora tenha-se conseguido regenerar plantas nos tratamento com 5 e 10 μM de trifluralina, elas não resistiram ao processo de aclimação, possivelmente, pelos efeitos deletérios causados pelo herbicida, como relatado por Dhooghe et al., (2009) trabalhando com tetraploidização de *Ranunculus*. Esses autores observaram que para as espécies desse gênero trifluralina na concentração de 2 μM resultou em altíssima

porcentagem de poliploidização (27,5%), enquanto que a 10 μ M causa a morte dos explantes. Portanto, sugerimos que em trabalhos futuros de indução de poliploidização *in vitro*, sejam avaliados outras concentrações menores de trifluralina, visto que as concentrações e tempo de exposição são genótipos dependente como preconizado por Khosravi et al., (2008).

3.2 Experimento 2: Avaliação de plântulas de mamoneira (*Ricinus communis* L.) germinadas *ex vitro* e submetidos a solução de Trifluralina a 10 μ M, aplicada sobre o meristema apical do caule.

Neste estudo, os poliplóides foram induzidos por aplicar solução semi-sólida de ágar e trifluralina a 10 μ M sobre o meristema apical do caule de plantas de mamoneira (*Ricinus communis* L.) com 20 dias de idade e 7 cm de altura, da cultivar E1P17 A/B da Embrapa/CNPq. A gota da solução de ágar e trifluralina (15 μ L) semi-sólida foi colocada sobre o meristema em crescimento, facilitando o contato entre o meristema e a trifluralina. Na figura 4, é possível observar que uma única aplicação da solução sobre os meristemas das plantas causou uma redução drástica no número de estômatos da superfície abaxial das folhas das plantas tratadas, quando comparada a plantas do controle.

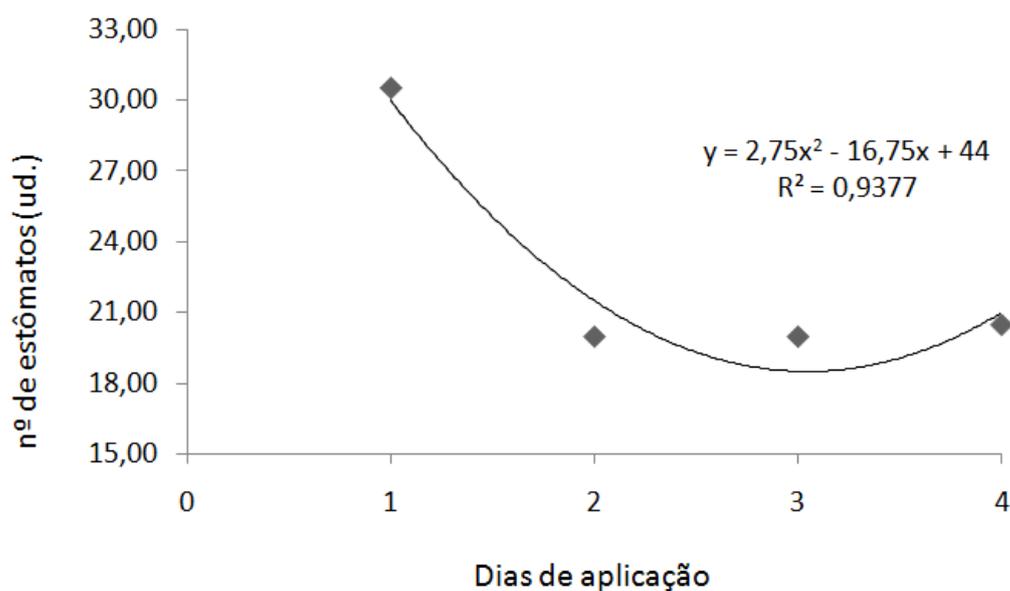


Figura 4. Efeito da frequência de aplicação de Trifluralina em mamoneira (*Ricinus communis* L.) sob o número de estômatos por campo microscópico.

Esse efeito permaneceu inalterado a medida que aumentou a frequência de aplicação (uma ou duas vezes). Segundo Jones et al.,(2008), trabalhando com indução de poliplóide em plântulas de *Rhododendron* germinadas *ex vitro* e usando a mesma metodologia empregada neste trabalho, observaram que houve uma variação na classe de poliplóides induzidos em função do número de aplicações, e que o maior número de plantas tetraplóides (41%) foram obtidas com duas aplicações. Plantas com nível superior de ploidia, incluindo octaplóides e mixoplóides, foram também obtidos quando o número de aplicações continuou aumentando. O meristema apical do caule é composto de zonas. A zona central inclui um grupo de células na posição terminal do meristema. Essas células funcionam como células iniciais que originam outras células, outras regiões meristemáticas e finalmente, os ramos (FRANCIS, 1997; KERSTTER; HAKE, 1997; TAX; DURBANK, 2006). Dentro da zona central existem camadas histogênicas múltiplas: LI, LII e LIII, que são distintas e dão origem a linhagens celulares e tecidos diferentes (HUDSON; GOODRICH, 1997). O desenvolvimento de poliplóides homogêneos requer o sucesso da duplicação cromossômica das células iniciais, em todas as camadas histogênicas, dentro da zona central do meristema apical. Do contrario, mixoplóides aparecerão como um conglomerado de células variando no nível de ploidia, entre ou dentro das camadas histogênicas, resultante da duplicação incompleta das células iniciais dentro do meristema (EISELEIN, 1994). Seguindo esse princípio, Zlesak et al., (2005). Afirmaram que é possível produzir quimeras poliplóides a partir da aplicação de agentes poliploidizantes e a caracterizá-los. Inclusive afirmando que este método é mais sensível do que o macerado de ponta de ramos e citometria de fluxo. Zlesak et al., (2005) também sugeriu que o nível de ploidia na camada LI, pode ser determinado usando o comprimento das células-guardas, o da camada meristemática LII, pelo diâmetro do pólen e, por fim, o da camada LIII, pela contagem do número de cromossomos de células da ponta de raiz.

As 15 plantas obtidas neste trabalho também mostraram diferenças significativas para comprimento de estômatos, largura de estômatos e diâmetro de pólen (Tabela 1). Quando realizou-se o teste de Tukey para comparar o número de aplicações da solução de trifluralina (Tabela 2), verificou-se que o tratamento com duas aplicações apresentou melhor resposta em relação a comprimento de estômato, largura de estômato e diâmetro de pólen. Plantas tetraplóides de mamoneira foram obtidas pela primeira vez por Sidorov e Sokolov (1939) apud (MOSHKIN, 1986) usando a colchicina. Essas plantas

tetraplóides, apresentavam folhas espessas, pouco palmadas, coloração verde-escuro, e células muito maiores no tecido foliar. Os estômatos das folhas e os grãos de pólen eram maiores do que os da planta matriz e as sementes eram 1,5 vezes maiores do que os das plantas diplóides correspondentes (MOSHKIN, 1986). Neste experimento, as plantas submetidas aos tratamentos com solução de trifluralina são maiores que aquelas sabidamente diplóides (Figura 6). Os poliplóides também apresentam maior comprimento e largura de folhas, tamanho das células-guarda, significativamente maiores, quando comparados com o controle diplóide, mas com densidade estomatal significativamente reduzida (Figura 5a,b). Os grãos de pólen (Figura 5c, d), tamanho da cápsula e das sementes das plantas poliplóides, também são maiores quando comparados as plantas diplóides correspondentes (Figura 5e, f). As sementes da plantas diplóides possuem em média 12 mm de comprimento, enquanto que as possíveis poliplóides possuem um comprimento médio de 17.22 mm. Em geral, poliplóides são superiores aos diplóides em termos de adaptabilidade genética e mais resistente ou tolerante a estresse ambiental (SHAO et al., 2003). A poliploidia tem sido também relacionada com a tolerância ao frio em plantas ornamentais e a alta produção de biomassa ou teores de princípios ativos em plantas medicinais (GAO et al., 1996).

Tabela 1. Resumo da análise de variância da frequência de aplicação da solução de trifluralina na concentração de 10 μM sobre o meristema apical do caule de plântulas de mamoneira (*Ricinus communis* L.) germinadas *ex vitro*.

Fonte de Variação	Quadrado Médio		
	Comprimento dos Estômatos	Largura dos estômatos	Diâmetro do Pólen
Tratamentos	3,4156*	2.55*	35,964**
Resíduo	1,0416	0.59	0,601
CV (%)	11.054	11.464	11.402

Tabela 2. Teste de médias da frequência de aplicação da solução de trifluralina na concentração de 10 μM sobre o meristema apical do caule de plântulas de mamoneira (*Ricinus communis* L.) germinadas *ex vitro*.

Frequência de Aplicação	Comprimento de estômatos	Largura de Estômatos	Diâmetro do Pólen
0	7,8 b	6.0 b	7,5 bc
1	9.1 ab	6.3 b	8.66 ab
2	10.3 a	7.8 a	9,0 a

3

9.3 a

7.0 ab

6.5 c

Médias seguidas das mesmas letras na vertical pertencem a um mesmo grupo pelo critério de Tukey

Existem varias metodologias para a identificação de poliplóides em plantas (LI; ZHANG, 1991; PEI, 1985; TANDON e BALI, 1957; YANG et al., 2006). Estudos anteriores sobre plantas tetraplóides espontâneas e induzidas tem freqüentemente observado que o tamanho e número de estômatos, e o número de cloroplastos nas células-guardas dos cloroplastos, mudam significativamente, com a duplicação do número de cromossomos, quando comparados com o estado diplóide (BECK et al., 2003; COHEN e YAO, 1996; NIGEL et al., 2007; SPECKMANN et al., 1965; TAN e DUNN, 1973; TANDON e BALI, 1957). Neste estudo, esses marcadores morfológicos foram usados como uma pré-varredura para possíveis poliplóides de uma população de 15 plantas tratadas. Subseqüentemente, a citometria de fluxo deve ser usada para confirmar o nível de ploidia dessas plantas.

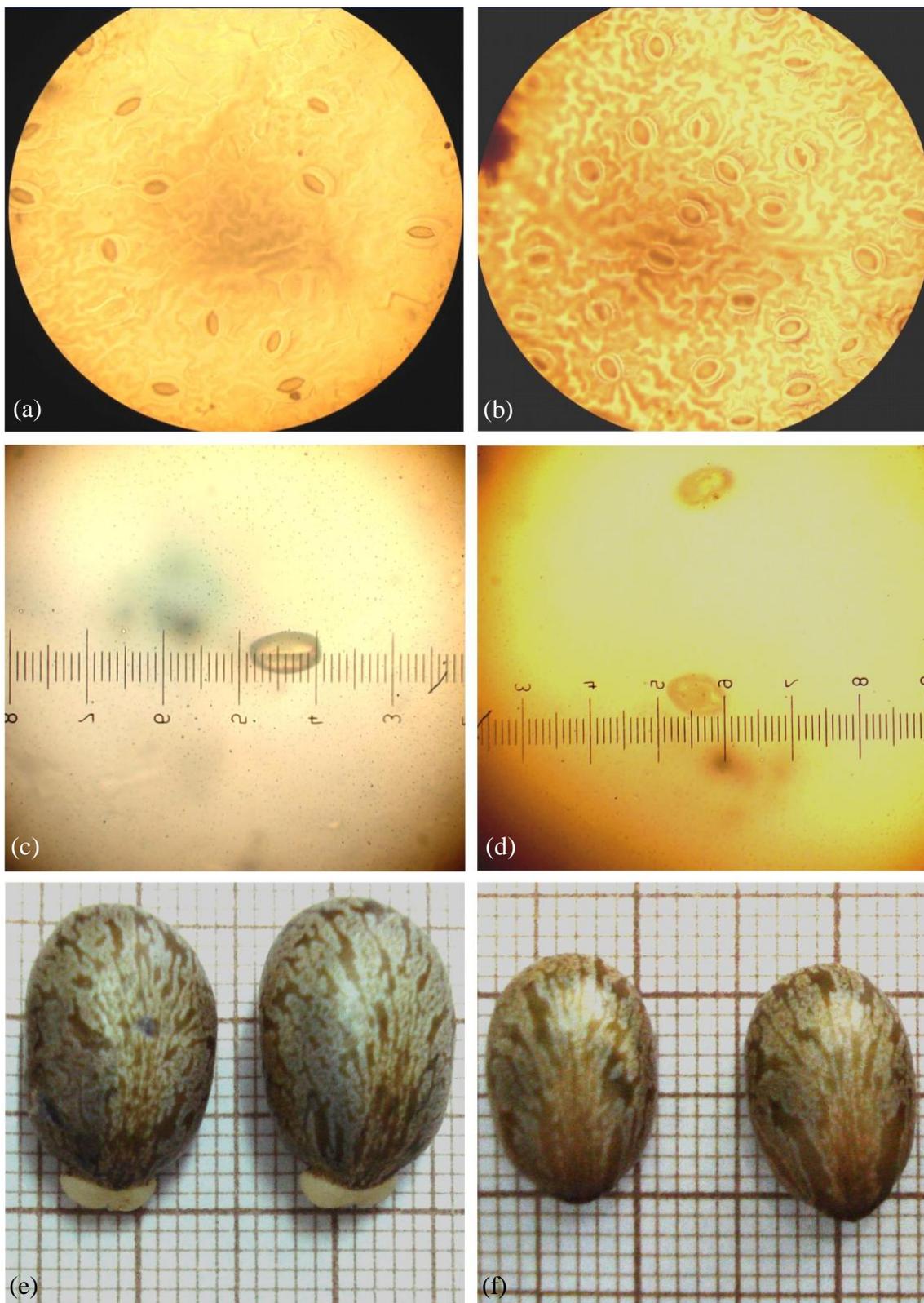


Figura 5. Densidade estomatal da parte abaxial das folhas de mamoneira (*Ricinus communis* L.) poliplóide (a) e diplóide (b). Tamanho de grão de pólen em poliplóide (c) e diplóide (d). Sementes de plantas poliplóide (e) e diplóide (f).



Figura 6. Plantas de mamoneira (*Ricinus communis* L.). (a) comparação da altura entre plantas, a esquerda diplóides e a primeira a direita, possível poliplóide. (b) Inflorescência de plantas diplóides. (c) Possível poliplóide.

6. CONCLUSÃO:

Após o desenvolvimento deste estudo é possível concluir que:

1. Para a indução *in vitro* de poliplóides de mamoneira deve-se testar concentrações inferiores a 10 μM ou diminuir o tempo de exposição de 16 horas;
2. A melhor concentração para indução de poliplóides de mamoneira em plantas germinadas *ex vitro* foi de 2 aplicações de 10 μM , aplicada sobre o meristema apical;
3. As medidas de tamanho e de densidade de estômatos como uma varredura em estágio preliminar, e medir o comprimento do fruto ou tamanho da semente, representa um método relativamente simples e disponível para a identificação de plantas poliplóides de mamoneira, portanto variações morfológicas tais como: folhas maiores e mais espessas, coloração verde mais escura, estômatos maiores, densidade estomatal menor na epiderme foliar inferior, e maior diâmetro do pólen, são importantes na identificação de plantas poliplóides em mamoneira. Estes resultados devem ser confirmados com o auxílio da citometria de fluxo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

BARTELS, P. G.; HILTON, J.L. Comparison of triXuralin, oryzalin, pronamide, propham and colchicine treatments on microtubules. **Pest Biochem Physiol** .1973

BENNETT, M. D. Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. **Proc R Soc London Ser B**. 1972

BLAKESLEE, A.F.; A.G. AVERY.; Methods of inducing doubling of chromosomes in plants by treatment with colchicine. *J Hered* 28: 393–411. 1937.

CIDADE, D. A. P.; GARCIA, R. O.; DUARTE, A. C.; SACHETTO-MARTINS, G.; MANSUR, E. Morfogênese in vitro de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.41, n.3, p.385-391, mar. 2006

COHEN, D.; YAO, J. L. In vitro chromosome doubling of nine *Zantedeschia* cultivars. **Plant Cell Tissue Organ Cult** 47:43–49. 1996

DHOOGHE, E., GRUNEWALD, W., LEUS, L., VAN LABEKE, M. C. In vitro polyploidisation of *Helleborus* species. **Euphytica** **165**: 89–95. 2009.

DHOOGHE, E.; DENNIS, S.; EECKHAUT, T.; REHEUL, D.; LABEKE, M. C. V. In vitro induction of tetraploids in ornamental *Ranunculus*. *Euphytica*, 2009

EECKHAUT, T. G. R.; WERBROUCK, S. P. O.; LEUS, L. W. H.; BOCKSTAELE, E. J. V.; DEBERGH, P. C. Chemically induced polyploidization in *Spathiphyllum wallisii* Regel through somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 2004.

GAO, S.L., ZHU, D.N., CAI, Z.H., XU, D.R. Autotetraploid plants from colchicinetreated bud culture of *Salvia miltiorrhiza* Bge. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** **47**: 73–77. 1996.

HANSEN, N.J.P.; S.B. ANDERSON. Efficient production of doubled haploid wheat plants by *in vitro* treatment of microspores with trifluralin or APM. **Plant Breed** 117: 401–405. , 1998

HANSEN, A.L.; A. GERTZ, M.; JOERSBO ; S. B. ANDERSON,. Antimicrotubule herbicides for *in vitro* chromosome doubling in *Beta vulgaris* L. ovule culture. **Euphytica** 101: 231–237. 1998

HASSAWI, D. S.; LIANG, G. H. Antimitotic Agents: Effects on Double Haploid Production in Wheat. **Crop Science Society of America**, 1991

KHOSRAVI, P.; KERMANI, M. J.; NEMATZADEH, G. A.; BIHAMTA, M.; YOKOYA, K. Role of mitotic inhibitors and genotype on chromosome doubling of *Rosa*. **Euphytica** **160**: 267–275. 2008.

- LI, M.X.; ZHANG, X.F. *Plant Chromosome Technology*. Northeast Forestry University Publisher, Harbin, pp. 48-118. (in Chinese). 1991
- MONQUERO, P. A. Plantas transgênicas resistentes aos herbicidas: Situação e perspectivas. *Bragantia*, Campinas, v.64, n.4, p.517-531, 2005
- MOSHKIN, V. A. **Castor**. New Delhi, 1986.
- NIGEL, A.R.U.; JENNIE, H; THERESE, M. Generation and characterization of colchicine-induced autotetraploid *Lavandula angustifolia*. **Euphytica** 156,257–266. 2007
- OMRAN, A.; BAGHERIEH-NAJJAR MOHAMMAD B. Polyploidization effect in two diploid cotton (*Gossypium herbaceum* L. and *G. arboreum* L.) species by colchicine treatments. **African Journal of Biotechnology** 7 (2):102-108, 2008
- PEI, X. S. *Polyploidy Induction and Breeding* Shanghai Science and Technology Press (pp. 95-98). 1985
- RAMULU, K. S.; VERHOEVEN, H. A.; DIJKHUIS P. Mitotic blocking, micronucleation, and chromosome doubling by oryzalin, amiprofos-methyl, and colchicine in potato. **Protoplasma** 160:65–71,1991.
- SEMENIUK, P.; T. ARISUMI. Colchicine-induced tetraploid and cytochimeral Roses. **Bot Gaz** 129: 190–193. , 1968
- SHAO, J.; CHEN, C.; DENG, X. *In vitro* induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, 75: 241-246. 2003
- SPECKMANN, G.J.; POST, J.J.; DIJKSTRA, H. The length of stomata as an indicator for polyploidy in rye grasses. **Euphytica** 14, 225–230. 1965.
- SWANSON, C.P. **Cytology and ctogenetics**. Prentice Hall, New Jersey. 1957
- TAN, G.Y.; DUNN, G.M.. Relationship of stomatal length and frequency and pollen grain diameter to ploidy level in *Bromus inermis* Leyss. **Crop Science** 13, 332–334. , 1973
- TANDON, S.L; BALI, P.N. Morphological and cytological studies of the diploid and the colchicine-induced tetraploid in *Linaria vulgaris*. **Genetica** 29, 101–109. 1957
- TILNEY-BASSETT, R. A.E. **Plant cimeras**. Edward Arnold, London, UK. 1986
- WAN, Y.; DUNCAN, D. R.; RAYBURN, A. L.; PETOLINO J.F.; WIDHOLM, J.M. The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus. **Theor Appl Genet** , 1991.

WARNER, D. A.; EDWARDS, G. Effects of Polyploidy on Photosynthetic Rates, Photosynthetic Enzymes, Contents of DNA, Chlorophyll, and Sizes and Numbers of Photosynthetic Cells in the C₄ Dicot *Atriplex confertifolia*. **Plant Physiol.** 1989

YANG, X.M; CAO, Z.Y; AN, L.Z; WANG, Y.M; FANG, X.W. In vitro tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Euphytica** 152, 217–224. 2006.

ZLESAK D.C.; THILL C.A.; ANDERSON N.O. Trifluralin-mediated polyploidization of *Rosa chinensis minima* (Sims) Voss seedling. **Euphytica** 141:281–290, 2005.