

Calogênese a partir de segmentos de hipocótilo de mamona cv. BRS 149 Nordestina.

Vargas, Daiane Peixoto¹; Paiva, Renato²; Nogueira, Gabriela Ferreira³; Stein, Vanessa Cristina⁴; Carvalho, Maria Laene Moreira de⁵

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras (UFLA), bolsista CNPq, Campus Universitário, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, fone (35): 38291619, email: dvbio@hotmail.com; ²Professor Associado, Depto. de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal (UFLA), email: renpaiva@ufla.br; ³Graduanda em Ciências Biológicas (UFLA), bolsista de Iniciação Científica - FAPEMIG, e-mail: gabi_bioufla@hotmail.com; ⁴Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal (UFLA), bolsista CNPq, email: nessastein@iq.com.br; ⁵Professora Adjunta (UFLA), Depto. de Agricultura, email [mlaenemc@ufla.br](mailto:milaenemc@ufla.br).

INTRODUÇÃO

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma oleaginosa de destacada importância socioeconômica, pois seu óleo, extraído pela prensagem das sementes, contém cerca de 90% de ácido graxo ricinoléico com uma ampla gama de utilização industrial. É considerada, atualmente, uma das principais alternativas à produção de Biodiesel no Brasil.

A formação de calos em um explante, denominada calogênese, é uma etapa básica para o desenvolvimento de sistemas de propagação massiva de plantas por organogênese ou embriogênese somática. É útil também quando se deseja produzir células para manipulações genéticas, como hibridações somáticas, poliploidizações e transformações (Torres, 1998).

Devido à totipotência, protocolos para a obtenção de plantas com base em tecidos vegetais têm sido obtidos. Os processos pelos quais os tecidos produzem órgãos vegetais adventícios *in vitro* podem ocorrer direta (sem a formação de calos) e indiretamente, por meio da formação de calos. De acordo com Alves (2004), o processo de organogênese é complexo, em que diversos fatores atuam, envolvendo interação entre fonte de explante, meio de cultura e fatores do ambiente. Assim, para que os processos de organogênese indireta *in vitro* (etapa de formação de calos) ocorram às células devem passar pelos processos de desdiferenciação, aquisição da competência, indução, determinação, diferenciação e formação do órgão.

Os centros ativos de divisão celular do calo, em condições adequadas, respondem a determinados estímulos, sofrendo diferenciação celular e formando órgãos (George, 1996). Sendo assim, a competência das células-alvo é o primeiro passo para a diferenciação celular, seguida da determinação em células competentes, quando essas se submetem a um caminho particular de desenvolvimento geneticamente programado (George, 1996 e Torres, 2000).

Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito de diferentes concentrações de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e de Picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) no escuro sobre a calogênese de mamona (*Ricinus communis* L.) cv. BRS 149 Nordestina, como primeiro estágio para obtenção de plantas *in vitro*.

MATERIAL E METODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG. Utilizou-se explantes provenientes de hipocótilo com segmentos de aproximadamente 1cm, obtidos a partir de sementes germinadas *in vitro* de *Ricinus communis* cv. BRS 149 Nordestina.

O meio de cultura básico utilizado foi o MS (Murashige & Skoog, 1962), com sacarose a 3%, agar a 0,6% e diferentes reguladores de crescimento: 2,4-D (0,5;1,0; 2,0; 4,0 mg L⁻¹) ou Picloram (0,5;1,0; 2,0; 4,0 mg L⁻¹) e a ausência de regulador (controle). Adicionou-se, aos tratamentos o carvão ativado na concentração de 1%. O pH foi ajustado para 5,8.

Cada explante foi colocado individualmente em tubos de ensaio (25 x 150mm) em meio de cultura incubados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas/luz e densidade de fluxo de fótons de $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Para avaliação da formação dos calos conforme sua presença/ausência e extensão. Atribui-se notas que variaram de 0 a 3 de acordo com a proporção de calo sobre a área exposta do explante (acima do meio de cultura), p. ex., 0 = sem emissão de calo, 1 = intumescimento do explante, 2 = emissão moderada de calos correspondendo a aproximadamente $\frac{1}{2}$ da região exposta, 3 = a emissão em 100% da área exposta.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído de 10 repetições. Os resultados dos calos forma analisados pela correlação de Spearman, utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis (SAS®), obtendo-se o score médio de formação de calos e o peso fresco foi analisado pela análise de variância, utilizando-se teste de Tukey e teste de regressão no programa estatístico (Sisvar).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação ao 2,4-D utilizado foi observado um aumento da massa fresco dos calos, com o aumento da concentração do regulador (Figura 1A). No entanto, conforme Figura 1B, na presença do Picloram houve um decréscimo na massa fresca dos calos com o aumento da concentração do regulador, chegando a ter a menor formação de massa fresca na ausência de quaisquer reguladores de crescimento.

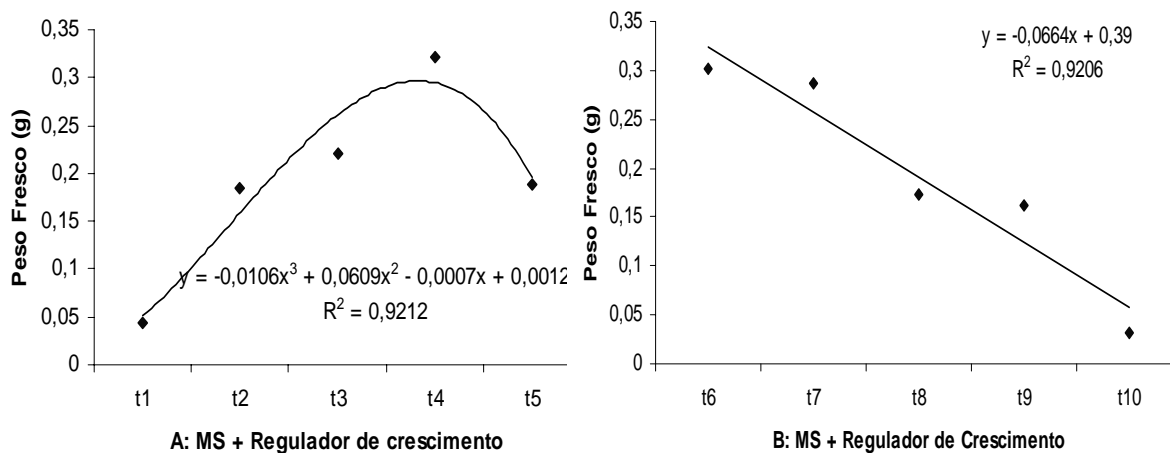


Figura 1. Média de peso fresco (g) de calos submetidos a 30 dias de cultivo em meio MS e diferentes reguladores de crescimento: 2,4-D (T1: 0,0; T2: 0,5; T3: 1,0; T4: 2,0; T5: 4,0 mg. L⁻¹ e Picloram (T6: 0,5; T7: 1,0; T8: 2,0; T9: 4,0 mg. L⁻¹). Adicionou-se aos tratamentos o carvão ativado na concentração de 1% tratamentos.

Quanto à freqüência de explantes responsivos, o tecido demonstrou diferentes capacidades de desenvolver calos ($p=0,01$) tanto na presença de 2,4-D, como no uso do Picloram, influenciada pela dosagem de cada regulador de crescimento. Observou-se a formação de calos em todos os tratamentos, exceto naqueles isentos das auxinas 2,4-D ou picloram. Estes dados concordam com Grattapaglia & Machado (1990) que relatam a indução da calogênese em meio com altas concentrações de auxinas, sendo 2,4-D um dos reguladores de crescimento mais eficazes na indução de calos (Ammirato, 1983).

Considerando a proporção de recobrimento entre os diferentes tecidos testados, não foram significativas entre os tratamentos T3, T4 e T5 com o uso de 2,4-D como regulador de crescimento, diferindo do controle (ausência do regulador) e dos demais tratamentos, aos 30 e 60 dias de cultivo. Quanto a dosagem de Picloram houve diferença

significativa entre o controle (T1) e os tratamentos com a presença deste regulador de crescimento (T6, T7, T8 e T9) (Figuras 2 e 3).

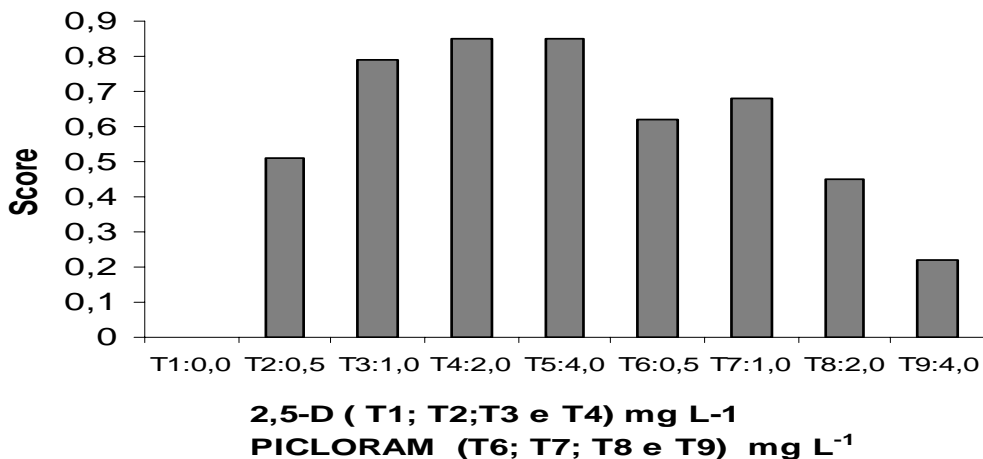


Figura 2 Escore da proporção de formação de calos submetidos a 30 dias de cultivo em MS acrescidos de 2,4-D (T1: 0,0; T2: 0,5; T3: 1,0; T4: 2,0; T5: 4,0 mg L⁻¹ ou Picloram (T6: 0,5; T7:1,0; T8: 2,0; T9: 4,0 mg L⁻¹). As médias diferiram entre si ao nível de 1%.

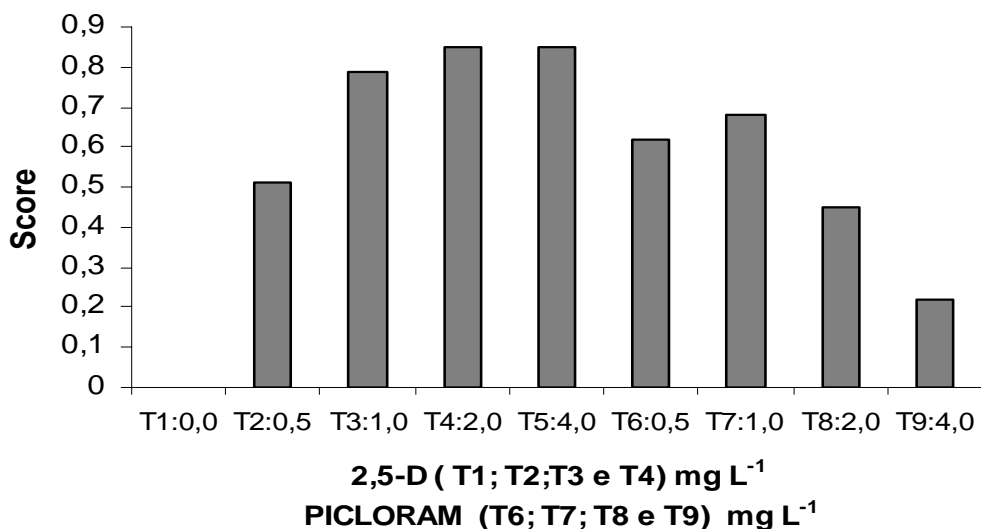


Figura 3. Escore da proporção de formação de calos submetidos a 60 dias de cultivo em MS acrescidos de 2,4-D (T1: 0,0; T2: 0,5; T3: 1,0; T4: 2,0; T5: 4,0 mg L⁻¹ ou Picloram (T6: 0,5; T7:1,0; T8: 2,0; T9: 4,0 mg L⁻¹). As médias diferiram entre si ao nível de 1%.

Na Figura 4 aspectos da formação de calos com destaque nas diferentes colorações apresentadas calos amarelo, amarelo translúcido e marrom, respectivamente recobrendo a superfície do explante.



Figura 4. Aspectos da coloração dos calos formados em diferentes meio de cultivo. A: calo amarelo em meio MS acrescido de 1mg.L^{-1} 2,4-D (T7), com 60 dias de cultivo. B: calo amarelo translúcido em meio MS acrescido de 4mg L^{-1} (T5), com 60 dias de cultivo. C: calo marrom em meio MS acrescido de $4,0\text{ mg L}^{-1}$ (T9), com 60 dias de cultivo.

CONCLUSÕES

Para indução de calogênese a partir de segmentos do hipocótilo em mamona (*Ricinus communis* L. BRS 149), o meio de cultivo MS acrescido de 2,4-D, como regulador de crescimento, é superior ao Picloram.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMMIRATO, P. V. Embryogenesis. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V. & YAMADA, Y. Handbook of plant cell culture-techniques for propagation and breeding. New York: **Macmillan Publishing**, 1983. p. 82-123.

ALVES, E. C. S. DE C.; XAVIER, A ; OTONI, W. C. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.39, n.5, p.421-430,2004.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. **Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq**, 1990. Cap. 2. p.99-169

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSCO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. 1998. v. 2, p. 569-612.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed. 2v. England: Exegetics Limited, 1996.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. de M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed. England: Exegetics Limited, 1996. 2v.

VENTURIERI, G. A. Calogênese do híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum* (Sterculiaceae). **Acta amazônica**. v. 34, n.4, p. 507-511. 2004.

PALAVRAS-CHAVE: *Ricinus communis* L.; calogênese; cultura de tecidos.