



FORMAÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS FRIÁVEIS EM PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.).

Wesley Machado¹; Gracielle Teodora da Costa Pinto Coelho²

¹ – Pós-Graduando em Biotecnologia (UFLA), FEAD -Campus Pilar, Rua Otilio de Macedo, 12, Pilar, CEP , Belo Horizonte, Minas Gerais, fone (31) 3288-1218 email: w.machado@yahoo.com.br.² – Dra. em Fisiologia Vegetal. Professora Coordenadora LabBiotec-FEAD: FEAD -Campus Pilar, Rua Otilio de Macedo, 12, Pilar, CEP ; gracielle.costa@gmail.com

RESUMO- A propagação por sementes do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) apresenta variações genéticas e ambientais que podem influenciar na produtividade da espécie. A presença de indivíduos que apresentem produtividade acentuada já é observada em propriedades produtoras em todo o Brasil. A aplicação de técnicas de clonagem, via cultura de tecidos, podem contribuir para a fixação destes indivíduos como parentais altamente produtivos. Desta forma, testou-se a influencia de diferentes concentrações 2,4 ácido diclorofenoxiacético e, presença ou ausência de vitaminas (tiamina, ácido nicotínico e piridoxina), no processo de calogênese do pinhão manso. Para tanto, embriões de pinhão manso foram germinados “*in vitro*” e seus meristemas excisados após 30 dias de cultivo e meio MS. Os meristemas foram inoculados em meio nutritivo (MS) suplementado com vitaminas (0, 0,25 mg L⁻¹) e 2,4-D (1,5 e 3 mg L⁻¹) nas seguintes combinações de vitaminas e 2,4-D: M1 (0,25 e 1,5 mg L⁻¹), M2 (0,25 e 3,0 mg L⁻¹), M3 (0,0 e 1,5 mg L⁻¹) e M4 (0,0 e 3,0 mg L⁻¹). Transcorridos 45 dias os meristemas foram avaliados. Observou-se que a utilização de vitaminas não influencia na formação de calos. O meio MS suplementado com 1,5 mgL⁻¹ de 2,4 D mostrou os melhores resultados na indução de calos friáveis em pinhão manso.

Palavras-chave- *Jatropha curcas*, meristema apical, vitaminas e 2,4-D.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, com os problemas ambientais crescentes, falam-se muito na utilização de combustíveis menos poluentes. Dentre estes, destaca-se o biodiesel, um combustível derivado de biomassa renovável e que pode substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil. A produção de biodiesel vem crescendo rapidamente no Brasil (Globo Rural, 2006). Dentre as fontes de óleo para biodiesel destaca-se o pinhão manso (*Jatropha curcas* L.).

O pinhão manso é uma arvoreta, da família das Euphorbiaceae. Foi muito utilizada para a fabricação de sabão e mais recente como cerca viva em áreas rurais (Dias *et al.*, 2007). A maior atribuição desta planta nos dias atuais é o grande teor em óleo na semente, podendo superar 30% de sua massa seca e persistir por mais de 40 anos durante seu ciclo produtivo. A produção de biodiesel pode chegar de 1100 a 1700 litros por hectare, de acordo com estudos realizados, a produção de





hectare/ano consegue abastecer 20 picapes. (Globo rural, 2006). Um dos problemas encontrado no pinhão manso é a produção desuniforme de frutos.

A propagação do pinhão manso é viável por sementes e estacas, mas apresentam irregularidades produtivas (Nunes, 2007). Para superar esse problema sugere-se a propagação *in vitro*. Segundo Souza *et al.* (2006) um pequeno número de explantes pode regenerar milhares de plantas. Os clones regenerados são idênticos ou superiores fenotipicamente a planta matriz, quando se refere ao tempo para produção. A propagação *in vitro*, requer reduzido espaço físico para produção e constitui uma ferramenta eficiente na eliminação de patógenos. No entanto, ainda pouco se sabe sobre o emprego desta técnica para o pinhão manso.

Buscando desenvolver formas de cultivo *in vitro* de pinhão manso, torna-se necessário a obtenção de protocolo de clonagem, para tanto, concentrações de 2,4 ácido diclorofenxiacético foram testadas visando a formação de calos embriogênicos friáveis, a partir de meristemas.

METODOLOGIA

O trabalho foi realizado no LabBiotec-FEAD. As sementes utilizadas no presente experimento foram cedidas pelo produtor Nagashi Tominaga do Município de Janaúba, MG. As sementes foram descascadas e submetidas à assepsia por imersão em detergente comercial a 0,5% por um período de um minuto, seguido pela imersão em álcool 70% v/v por um minuto e hipoclorito de sódio a 2,5% por 15 minutos sob agitação constante.

As sementes foram lavadas três vezes com água destilada estéril e os embriões retirados das sementes sem as folhas cotiledonares, em uma câmara de fluxo laminar. Os embriões foram colocados em placas de petri, com meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com vitaminas (0 e 0,25 mg l⁻¹) e 2,4-D (1,5 e 3,0 mg l⁻¹), contendo carvão ativado na concentração de 1,5 g l⁻¹ para ajudar no desenvolvimento dos embriões (Nunes, 2007) ágar 7,0 g l⁻¹ e sacarose 30,0 g l⁻¹ e colocados no escuro.

Após, aproximadamente 5 dias os embriões foram retirados do escuro e colocados sob luz. Cada combinação do tratamento de vitaminas e 2,4-D: M1 (0,25 e 1,5 mg l⁻¹), M2 (0,25 e 3,0 mg l⁻¹), M3 (0,0 e 1,5 mg l⁻¹) e M4 (0,0 e 3,0 mg l⁻¹). Aos 45 dias os calos foram avaliados de acordo com a formação de calos se ocorreu ou não o desenvolvimento dos meristemas. O pH de cada meio citado acima foi aferido em 5,8 +/-0,2. Cada frasco contendo meio para calogênese, foi inoculado com 10 explantes em cada tratamento, com 2 repetições.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura de 26 ±2°C, umidade relativa do ar em torno de 70%, com irradiação de 30 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.





RESULTADOS E DISCUSSÃO

Transcorridos 45 dias os calos foram avaliados quanto ao desenvolvimento e formação de calos em meios suplementados com a auxina sintética e vitaminas. Observou a presença de calos todos os experimentos suplementados com 2,4-D. Demonstrando a eficiência do regulador de crescimento para formação de calos em pinhão manso.

O'Connor-Sánchez et al. (2002) descrevem o início da formação de calos, a partir de sementes germinadas, de suas partes meristemáticas, formando calos, tanto embriogênicos quanto organogênicos em meios de cultura contendo auxina e citocinina. Coelho et al. (2005) trabalhando com estas plântulas germinadas, obtiveram 20% de formação de calos embriogênicos do tipo II (Armstrong & Green, 1995). Carneiro et al. (2004) acrescentam ainda a importância da regeneração eficiente dos explantes, uma vez que este passo é primordial para se obter sucesso na produção de plantas clonadas

Torres et al., (1998) descreveram a ação do 2,4-D na formação de calos embriogênicos, como os observados no pinhão manso, no entanto, autores como Londe (2005) afirmam que para algumas espécies, o melhor desenvolvimento de calos acontece na ausência de 2,4-D, discordando dos dados apresentados acima. Este mesmo autor, também demonstra em seus trabalhos a influência da fase inicial, em ausência de luz, favorecendo o desenvolvimento dos calos (Londe, 2005). Apesar disso, é notório a influência da auxina no desenvolvimento de calos embriogênicos, via embriogênese somática, desde os estudos básicos descritos por Murashige & Skoog (1962), como os mais contemporâneos descritos por Armstrong & Green (1995), Torres et al., (1998), O'Connor-Sánchez et al. (2002), Carneiro et al. (2004), Coelho et al. (2005)

Para o pinhão manso a utilização de auxinas na formação de calos a partir de embriões mostrou-se eficiente. A melhor concentração foi 1,5 mg l⁻¹ de 2,4-D, a adição de vitaminas no meio não alterou o desenvolvimento dos calos demonstrando que não há influência direta na associação de vitaminas e 2,4-D, tornando-as dispensáveis.

O uso de apenas meio MS, sem suplementação induziu o desenvolvimento de raízes e parte aérea em praticamente todos os embriões que estavam inoculados neste meio e que não houve nenhuma diferenciação em calos dos embriões.

A figura 1 mostra o desenvolvimento dos calos em diferentes concentrações de 2,4-D, em alguns casos, além da calogênese observou-se a formação de partes radiculares.

Em MS suplementado com 1,5 mg l⁻¹ de 2,4-D, observou-se a formação de raízes, mas 80% da massa do explantes correspondia a calos formados. Em MS suplementado com de 3,0 mg l⁻¹ de 2,4-D houve a exudação de compostos fenólicos pelos explantes, estes compostos oxidaram parte dos calos formados levando ao escurecimento do mesmo.





CONCLUSÃO

Para a indução de calos friáveis de pinhão manso, o meio MS suplementado com 1,5 mg l⁻¹ de 2,4-D, apresentou melhores resultados.

A utilização de vitaminas não interfere na formação de calos e nem no desenvolvimento dos mesmos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMSTRONG, C. L.; GREEN, C. E. Establishment and Maintenance of Friable, Embryogenic Maize Callus and the Involvement of L-proline. *Planta*, New York, v. 164, n. 2, p. 207-214, 1985.

CARNEIRO, A. A.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. Transformação genética de milho utilizando o bombardeamento de partículas. *Embrapa Milho e Sorgo*, 2004. 32, 44 p.

COELHO, G. T. C. P.; RESENDE, R. K. S.; TORGA, P. P.; PETRILLO, C. P.; CARNEIRO, A. A.; CARNEIRO, N. P.; PINHO, R. G. V.; PAIVA, R.; PAIVA, L. V. Embriogênese Somática de Linhagens Tropicais de Milho (*Zea Mays*) em Diferentes Concentrações de 2,4D. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 23, p. 600, 2005.

DIAS, L. A. S.; LEME, L. P.; LAVIOLA, B. G.; PALLINI, A.; PEREIRA, O. L.; DIAS, D. C. F. S.; CARVALHO, M.; MANFIO, C. E.; SANTOS, A. S. dos; SOUSA, L. C. A. de; OLIVEIRA, T. S.; PRETTI, L. A. *Planta*. In: DIAS, L. A. S. Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) para a produção de óleo combustível. 1.ed. Viçosa, MG, 2007, cap.1, p.10-11.

GLOBO RURAL. Biodiesel o petróleo verde, novembro 2006. 40-48p.

LONDE, L. N. Indução morfogênica de *Anacardium humile* St. Hill e análise da divergência genética entre populações. 2005. 141 p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, n. 6, p. 473-479, june 1962.

O'CONNOR-SÁNCHEZ, A.; CABRERA-PONCE, J. L.; VALDEZ-MELARA, M.; TÉLLEZ-RODRÍGUEZ, P.; PONS-HERNÁNDEZ, J. L.; HERRERA-ESTRELLA, L. Transgenic maize plants of tropical and subtropical genotypes obtained from calluses containing organogenic and embryogenic-like structures derived from shoot tips. *Plant Cell Reporters*, New York, v. 21, n. 4, p. 302-312, Nov. 2002.

SOUZA, A. S.; COSTA, M. A. P. C.; SEREJO, J. A. S.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, F. V. D. Introdução a cultura de tecidos de plantas. In: SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. (Ed.) Introdução a micropropagação de plantas. 1.ed. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura tropical, 2006, cap.1, p.11-37.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1998. v. 1, 509 p.



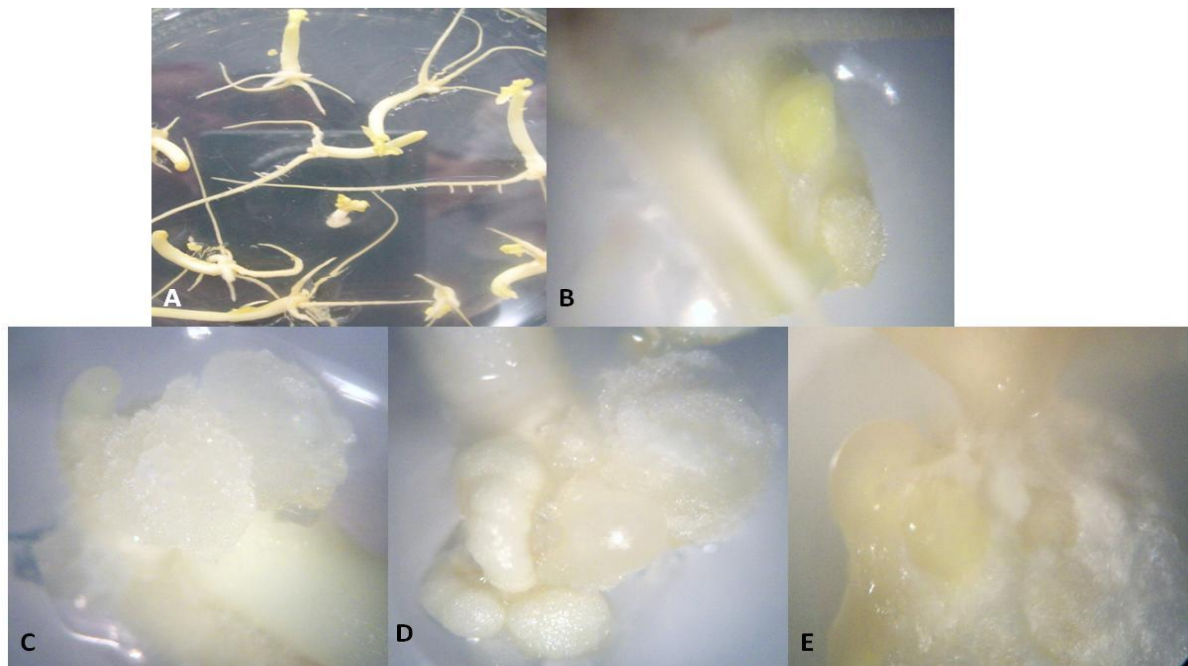


Figura 1: Formação de calos em diferentes concentrações de 2,4-D. A: MS-0; B e D: MS + 1,5 mg L⁻¹ 2,4-D, C e E: MS + 3,0 mg L⁻¹ 2,4-D.

