

CULTIVO *in vitro* DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS DE JATROPHA¹

Adriana Madeira Santos Jesus²
Moacir Pasqual²
Leonardo Ferreira Dutra²
Edvan Alves Chagas²

RESUMO

Objetivou-se estudar o crescimento e desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de *Jatropha* em diferentes concentrações do meio MS e ácido giberélico (GA₃). Frutos foram coletados, e seus embriões de 2 a 5 mm de comprimento foram desinfestados em uma solução de hipoclorito de sódio 1% por 15 minutos e a seguir lavados três vezes em água destilada autoclavada e inoculados em tubos de ensaio contendo a combinação entre diferentes concentrações dos sais do meio MS (50, 75 e 100 %) e GA₃ (0; 0,14; 0,43; 1,30; 3,90 μM). O experimento foi mantido em sala de crescimento com temperatura de 26 ± 1 °C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 32 μmoles m⁻² s⁻¹, durante 48 dias. Diferentes concentrações dos sais nutrientes de MS e GA₃ não influenciaram a germinação de embriões de *Jatropha podagrica*. Os sais nutrientes de MS com 50% de suas concentrações originais e na ausência de GA₃ proporcionaram melhor crescimento e desenvolvimento de embriões.

Palavras-chave: *Jatropha podagrica*, cultura de tecidos, giberelina.

¹ Aceito para publicação em 25.11.2002.

² Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras (UFLA). Cx. Postal 37, 37.200-000, Lavras, MG. E-mail: mpasqual@ufla.br

ABSTRACT

In vitro CULTURE OF JATROPHA ZYGOTIC EMBRYOS

In vitro growth and development of jatropha zygotic embryos were studied. Embryos 0.2 to 0.5 cm long were disinfected in 1% sodium hypochlorite solution during 15 minutes and inoculated in test tubes containing MS culture medium salts (50, 75 and 100 %) and GA₃ (0, 0.14, 0.43, 1.30 and 3.90 μM). The experiment was carried out in a growth chamber at 26 ± 1°C, 16 hours photoperiod and 32 μmoles m⁻² s⁻¹ irradiance, for 48 days. The germination of *Jatropha podagrica* embryos was not influenced by MS medium and GA₃ concentrations. Better growth and development embryos were obtained with 50 % nutrient salts concentration of MS medium formulation without GA₃.

Key words: *Jatropha podagrica*, tissue culture, gibberellin.

INTRODUÇÃO

Dentro da família Euphorbiaceae, o gênero *Jatropha* apresenta aproximadamente 160 espécies de plantas herbáceas e arbustivas, das quais várias apresentam valor medicinal (10), ornamental (15), e outras são produtoras de óleo (8). A *Jatropha podagrica*, além de ser medicinal, apresenta valor ornamental pela sua rusticidade e beleza exótica.

Na propagação de *J. integerrima* e *J. podagrica* realizada por estaquia de ramos lenhosos (15), o gasto de material propagativo é muito grande, visto que as estacas devem ter aproximadamente 30 cm de comprimento, sendo necessário descartar as porções apicais dos ramos de diâmetro reduzido (3).

Estudos visando testar diferentes tipos de substratos e diâmetros de estacas do gênero *Jatropha* mostraram que o último fator foi o limitante para a propagação de plantas deste gênero por estaquia (3).

Sua propagação por sementes é dificultada pelo fato de que as cápsulas coletadas no estágio de pré-deiscência são atacadas por fungos saprófitas, o que resulta em perda da viabilidade das sementes, sendo necessária sua coleta antes desse estágio, colocando-as para germinar *in vitro* (15). Desse modo, a cultura de embriões, visando a propagação de jatropha, é uma alternativa com possibilidades de utilização.

A cultura de embriões possibilita a recuperação de híbridos de cruzamentos incompatíveis, micropropagação, superação de dormência e esterilidade de sementes. Em virtude de sua natureza juvenil com alto potencial regenerativo, embriões são excelentes explantes para propagação clonal *in vitro*. Um importante aspecto da cultura de embriões imaturos é definir um meio de cultura que possa sustentar o seu crescimento e desenvolvimento (6).

Tem-se buscado novas alternativas de meios nutritivos que se aproximem da composição do endosperma ou do saco embrionário e possibilitem o desenvolvimento dos embriões, independentemente do estágio em que se encontram (1). O meio normalmente utilizado para a cultura de embriões é o MS com algumas variações de reguladores de crescimento, dependendo do genótipo e estágio de desenvolvimento, sendo a taxa de germinação inversamente proporcional à idade do embrião (2). Embora o MS seja o mais comumente utilizado para a propagação de várias espécies, sua concentração de nutrientes tem sido identificada como elevada (12) e muitas modificações têm sido sugeridas, objetivando maior adaptação das culturas e redução dos custos (4). A alta concentração de sais do meio MS, em comparação a outros meios, pode ser inadequada ao processo morfogenético (13).

As giberelinas, especialmente o ácido giberélico (GA_3), são usadas por estimularem o crescimento vegetal, agindo sobre o alongamento celular (5, 9).

O GA_3 , juntamente com o carvão ativado, influenciou o IVG (índice de velocidade de germinação) de embriões e o número de raízes de embriões imaturos de *Jatropha podagrica* Hook *in vitro* (14). Segundo a autora, o IVG de embriões foi maior quando se utilizaram 1 ou 2 g L⁻¹ de carvão ativado associado com 2,9 ou 0,029 μ M de GA_3 , respectivamente. O maior número de raízes foi obtido na ausência ou com 2,9 μ M de GA_3 .

Objetivou-se, no presente trabalho, estudar o cultivo *in vitro* de embriões de *jatropha* quando submetidos a diferentes concentrações do meio MS e ácido giberélico.

MATERIAL E MÉTODOS

Frutos de *jatropha* (*Jatropha podagrica* Hook.) foram coletados da planta-mãe quando os embriões já apresentavam dois cotilédones, com aproximadamente 2 a 5 mm de comprimento. Posteriormente, foram lavados com detergente comercial Ypê[®], retirando-se as demais estruturas do fruto, permanecendo somente os cotilédones e o embrião, que foram imersos em álcool 50% v/v durante um minuto e, depois, em solução de hipoclorito de sódio 1% v/v do produto comercial Qboa[®] por 15 minutos. Após três lavagens sucessivas em água destilada e autoclavada, os embriões foram excisados e inoculados em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, contendo 15 mL de meio de cultura.

Os tratamentos consistiram da interação de concentrações de GA_3 (0; 0,14; 0,43; 1,30 e 3,90 μ M) combinadas com concentrações (50, 75 e 100%) dos nutrientes da formulação de Murashige e Skoog (7). O meio foi suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar (ISOFAR), após ajustar o pH para 5,8. Em seguida, o meio foi autoclavado a 121°C e 1 atm por 20 minutos.

Após a inoculação, o experimento foi mantido em sala de crescimento com temperatura de 26 ± 1 °C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de $32 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por tubos fluorescentes de 20W, marca OSRAM[®], luz do dia especial. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5×3 , com três repetições e quatro tubos por parcela.

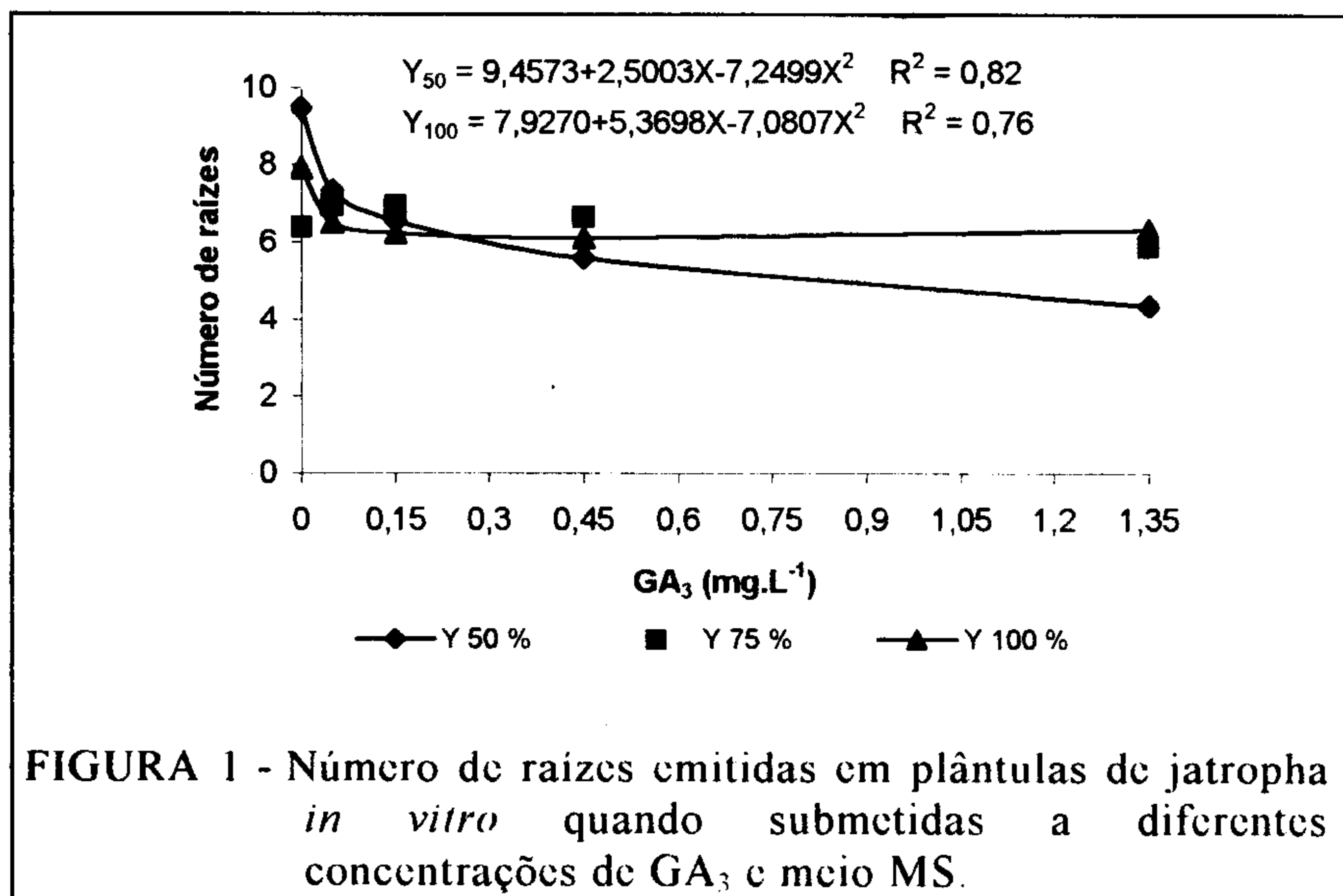
Após 48 dias, foram avaliados a percentagem de germinação, o número de raízes e a altura de plântulas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve influência dos tratamentos no percentual de germinação dos embriões, observando-se um percentual médio de germinação de 66% (dados não-mostrados).

Esse resultado é semelhante ao obtido por Spera (14), que, estudando a propagação *in vitro* de *Jatropha podagrica*, obteve 69% de embriões germinados em meio MS sem a adição de giberelina.

Maior número de raízes (9,5) foi obtido no meio contendo 50% dos sais de MS e na ausência de GA₃ (Figura 1). Na presença deste fitorregulador, conforme aumenta sua concentração, o número de raízes emitidas por plântula se reduz.



Resultado semelhante foi obtido no meio apresentando a concentração original (100%) dos sais nutrientes de MS, em que o maior número de raízes (7,9) também foi obtido na ausência de GA₃. Novamente, houve diminuição no número de raízes com o acréscimo nas concentrações dessa giberelina. Quando se utilizou MS 75%, a presença de GA₃ não afetou o número de raízes emitidas.

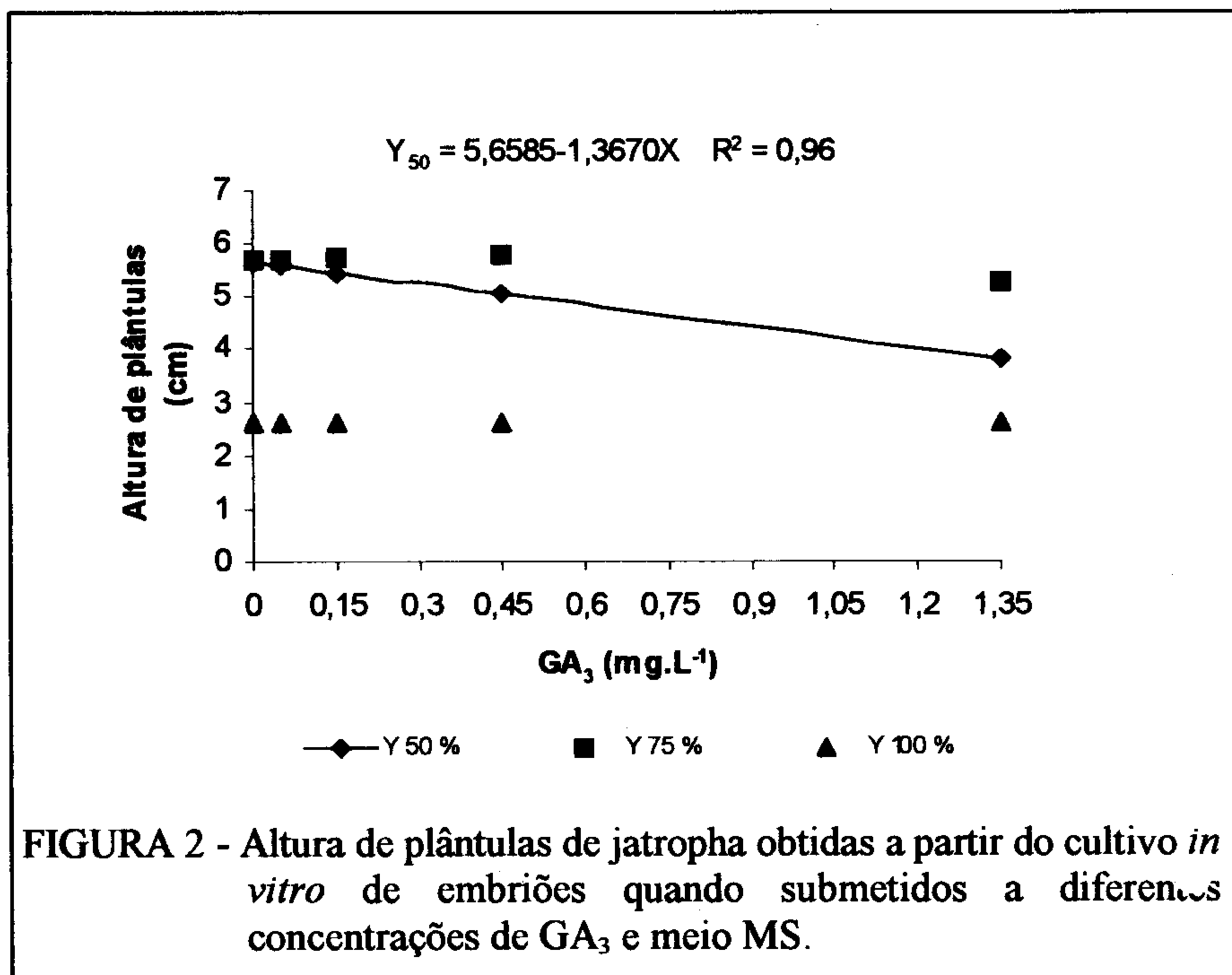
Esse resultado está de acordo com a afirmação de Pasqual (11), de que o ácido giberélico, em meio de cultura, normalmente diminui ou impede a formação de raízes. Segundo ele, normalmente o GA₃ inibe a formação de raiz, e sua adição em concentrações relativamente elevadas (1 a 10 mg L⁻¹) impede o processo, especialmente se as auxinas forem aplicadas simultaneamente.

Segundo Spera (14), no caso da *Jatropha podagrica*, o aumento das concentrações de GA₃, até um determinado valor, diminui o número de raízes. No mesmo trabalho, a autora constatou a emissão de até sete raízes em plântulas oriundas de embriões imaturos desta planta.

A constatação de que os maiores números de raízes foram obtidos em meio sem GA₃ parece indicar que explantes de *Jatropha podagrica* possuem um suprimento endógeno suficiente desse fitorregulador, não necessitando a sua inclusão em meio de cultura.

Quando se utilizaram meios com 50% dos sais nutrientes de MS, sem adição de GA₃, obteve-se maior altura de plântulas de *jatropha* (Figura 2). Com aumentos das concentrações exógenas desta giberelina, houve redução da altura de plântulas, provavelmente devido a efeito tóxico causado por uma concentração supra-ótima desse fitorregulador, resultante da aplicação exógena, por aumentar o nível endógeno dos explantes. Não houve diferença entre as concentrações de GA₃ quando se utilizaram 75 e 100% da concentração de sais do MS.

O mais conhecido efeito das giberelinas *in vitro* é o alongamento de partes aéreas (5, 9). Quando as partes aéreas produzidas não estão em condições de serem individualizadas, devido ao seu tamanho, o cultivo na presença de GA₃ pode provocar alongamento. Entretanto, a eficiência desse procedimento nem sempre é a desejável, obtendo-se poucas brotações alongadas. Além do aspecto da eficiência, a fase de alongamento é antieconômica por demandar mão-de-obra adicional que não resulta em multiplicação, e, sim, num simples ajuste das culturas. Desse modo, na propagação *in vitro*, deve-se priorizar a otimização do balanço auxina/citocinina, objetivando produzir partes aéreas suficientemente alongadas. Soma-se a isso o fato de que a *Jatropha podagrica* não responde de maneira satisfatória à adição de GA₃ no meio de cultura.



Os melhores resultados foram obtidos reduzindo-se a concentração de sais do meio MS. Na formulação de MS, a concentração de sais nutrientes do meio tem sido identificada como elevada (12), e muitas modificações têm sido sugeridas para a referida formulação, objetivando maior adaptação das culturas e redução dos custos (4), e, além disso, a alta concentração de sais do meio MS pode ser inadequada ao processo morfogênético.

CONCLUSÕES

1) Não há influência das concentrações de MS e GA₃ na germinação de embriões de *Jatropha podagrica*.

2) A formulação de MS com 50% da concentração dos sais nutrientes e sem GA₃ proporciona melhor crescimento e desenvolvimento de embriões.

REFERÊNCIAS

1. ANDREOLI, C. Cultura de embriões. In: Simpósio de Cultura de Tecidos Vegetais, I, Brasília, 1985. Anais, Brasília, ABCTP/EMBRAPA, 1986. p.25-8.

2. BRUCK, D.K. & WALKER, D.B. Cell determination during embryogenesis in *Citrus jambhiri*. II. Epidermal differentiation as a out-time event. *American Journal of Botany*, 72:1602-9, 1985.
3. FORNI-MARTINS, E.R. & CRUZ, N.D. da. Pesquisa em desenvolvimento com pinhão-paraguaio no Instituto Agrônômico. *O Agrônômico*, 37:109-13, 1985.
4. GEORGE, E.F. & SHERRINGTON, P.D. Plant propagation by tissue culture. Handbook and direction of commercial laboratories. Exegetics, Eversley, 1984. 593p.
5. GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M.A. Micropropagação. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S. & Buso, J.A. (eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, CBAB/EMBRAPA. CNPH, 1998. p.183-260.
6. HU, C.Y. & FERREIRA, A.C. Cultura de embriões. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S. & Buso, J.A. (eds.). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília, EMBRAPA-CNPH, 1998, p.371-93.
7. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultivars. *Physiologia Plantarum*, 15:473-9, 1962.
8. MUNCH, E. & KIEFER, J.F. Purging nut (*Jatropha curcas* L.) multiple use plant as a source of fuel in the future? *Schriftenreihe der Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit GmbH*, 209:1-32, 1989.
9. NICKELL, L.G. Plant growth substances. *Encyclopedia of Chemical Technology*. 3 ed. 18:1-23, 1982.
10. OJEWOLE, J.A.O. & ODEBIYI, O.O. Neuromuscular and cardiovascular action of tetramethylpyrazine from the stem of *Jatropha podagrica*. *Planta Medica*, 38:332-8. 1980.
11. PASQUAL, M. *Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações - Meios de cultura*. Lavras, UFLA/FAEPE, 2001. 74p.
12. PIERIK, R.L.M. *In vitro* culture of higher plants. Dordrecht, Martinus Nyjhoff, 1987. 344p.
13. SAKUTA, M. Effects of sucrose source on betacyanin accumulation and growth in suspension culture of *Phytolacca americana*. *Physiologia Plantarum*, 17:459-63, 1987.
14. SPERA, M.R.N. Propagação *in vitro* de *Jatropha podagrica* Hook. Lavras, UFLA, 1995. 78p. (Dissertação de Mestrado).
15. SUJATHA, M. & DHINGRA, M. Rapid plant regeneration from various explants of *Jatropha integerrima* - Hypocotyl culture, shoot culture, leaf culture and peduncule culture medium optimization for oilseed ornamental plant propagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 35:293-6, 1993.