

**ANATOMIA FLORAL, CULTIVO *IN VITRO* E
CRIOPRESERVAÇÃO DE MAMONEIRA**

DAIANE PEIXOTO VARGAS

2009

DAIANE PEIXOTO VARGAS

**ANATOMIA FLORAL, CULTIVO *IN VITRO* E
CRIOPRESERVAÇÃO DE MAMONEIRA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do do Curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Doutor".

Orientador

Prof. Renato Paiva, PhD

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Vargas, Daiane Peixoto.

Anatomia floral, cultivo *in vitro* e criopreservação de mamoneira
/ Daiane Peixoto Vargas. – Lavras : UFLA, 2009.

189 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Renato Paiva.

Bibliografia.

1. Micropropagação. 2. Haplóides. 3. Criopreservação. 4.
Ricinus communis L. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.69146
– 633.85153

DAIANE PEIXOTO VARGAS

**ANATOMIA FLORAL, CULTIVO *IN VITRO* E
CRIOPRESERVAÇÃO DE MAMONEIRA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 19 de fevereiro de 2009

Prof. Dr. Sandro Barbosa	UNIFAL- MG
Profra. Dr ^a . Raírys Cravo Nogueira	UFPA
Dr ^a . Fernanda Pereira Soares	MAPA
Dr. Marcelo Murad Magalhães	UFLA

Prof. Renato Paiva, PhD

UFLA

(Orientador)

Lavras

MINAS GERAIS - BRASIL

2009

À minha querida mãe, por seu grande amor, por estar ao meu lado e pelo apoio incondicional e verdadeiro,

OFEREÇO

Aos meus amados pais, Paulo Roberto e Iara Maria,

A minha querida irmã, Michele,

À minha dinda amada Zair,

Ao meu marido e grande companheiro, Bennett,

pelo amor incondicional, apoio e incentivo.

DEDICO

A minha família,

A minha Avó Felicidade (in memoriam),

por continuar com muito amor ao meu lado,

À grande amiga Raírys,

Ao meu orientador, Renato Paiva,

por todo o auxílio e torcida,

AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro ao Projeto e pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu querido pai, Paulo Roberto Rodrigues Vargas e minha mãe, Iara Maria Peixoto Vargas, pelo apoio, incentivo e pelo amor verdadeiro.

Ao meu orientador, Professor Renato Paiva, pela acolhida em Minas, pela grande oportunidade, por seu profissionalismo e incentivo durante todo o doutorado.

À Professora Dra. Vera Lúcia Bobrowski, pela orientação durante parte da iniciação científica e mestrado e, sobretudo, pelo apoio e amizade mesmo à distância durante todos esses anos.

À Professora Dra. Maria Laene Carvalho Moreira de Carvalho pelo apoio e valiosa contribuição.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Rairys Cravo Nogueira, Dr. Sandro Barbosa, Dra. Fernanda Pereira Soares, Dr. Marcelo Murad Magalhães.

Ao Professor Evaristo Mauro de Castro, pela disponibilidade do Laboratório de Anatomia Vegetal.

Ao Professor Eduardo Alves, pela disponibilidade do Laboratório de Microscopia Eletrônica.

Ao Dr. José Marcello Salabert de Campos e à Universidade Federal de Juiz de Fora pelo auxílio e contribuição.

A minha amiga gaúcha Letícia (Kabeça) pelo apoio até nas horas de lazer.

A todos os professores da UFLA, pelos conhecimentos adquiridos durante o curso, em especial ao Professor Evaristo, por ser um exemplo de docente para mim.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas: Ana Carolina, Cristiano, Douglas, Lígia, Luciano, Gabriela, Marcelo Padovani, Milene, Raírys, Tina, Stephânia, Thaíse pela colaboração e amizade.

À amiga especial Maísa, por todo o auxílio prestado na condução dos experimentos e pelos diálogos intermináveis e muito construtivos no dia-a-dia.

À amiga Raírys, por sua constante orientação e ajuda, durante a execução desse trabalho.

A minha irmã espiritual Vanessa por todo apoio e amizade.

Ao meu grande amigo Diogo, que iluminou e apoiou a finalização do trabalho.

Aos funcionários técnico-administrativos: Barrinha, Celen, Joel, Lena, Odorêncio e Tina, pelo auxílio e amizade.

A todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	i
GENERAL ABSTRACT.....	iii
CAPÍTULO 1 – Introdução geral.....	1
1 Introdução.....	2
2 Referencial teórico.....	3
2.1 Características botânico-agronômicas da mamoneira.....	3
2.2 Biologia floral.....	6
2.3 Aspectos econômicos.....	8
2.4 Propagação da mamoneira.....	11
2.4.1 Propagação sexuada.....	11
2.4.2 Propagação assexuada.....	11
2.4.3 Micropropagação.....	12
2.5 Cultura de haplóides.....	14
2.6 Criopreservação.....	15
3 Considerações gerais e perspectivas para a espécie.....	17
4 Referências Bibliográficas.....	18
CAPÍTULO 2 – Anatomia, fertilidade e ontogenia do botão floral masculino de mamoneira.....	25
1 Resumo.....	26
2 Abstract.....	27
3 Introdução.....	28
4 Material e métodos.....	30
4.1 Viabilidade polínica em diferentes genótipos de mamoneira.....	30
4.2 Relação entre botão floral e estádios da microsporogênese e microgametogênese	31
4.3 Aspectos anatômicos do botão floral masculino.....	32
4.4 Composição química do pólen.....	33
5 Resultados e discussão.....	36
5.1 Potencial de fertilidade polínica em mamoneira.....	36
5.2 Relação entre botão floral e estádios da microsporogênese e microgametogênese	38
5.3 Aspectos anatômicos do botão floral masculino.....	41
5.4 Composição química do pólen.....	45
6 Conclusões.....	47

7 Referências Bibliográficas.....	47
CAPÍTULO 3 – Calogênese em anteras de mamoneira cv. BRS 149-Nordestina.....	53
1 Resumo.....	54
2 Abstract.....	55
3 Introdução.....	56
4 Material e métodos.....	58
4.1 Material botânico.....	58
4.2 Desinfestação dos botões florais.....	58
4.3 Efeito de diferentes concentrações de PVP e ácido ascórbico.....	58
4.4 Efeito do 2,4-D na indução de calos de anteras.....	60
4.4.1 Análise citológica dos calos.....	61
4.5 Efeito dos reguladores de crescimento: ANA, Picloram e TDZ na indução de calos androgênicos.....	61
4.6 Efeito de nitrato de prata na indução de calos androgênicos.....	62
5 Resultados e discussão.....	64
5.1 Efeito dos antioxidantes: PVP e ácido ascórbico.....	64
5.2 Efeito do 2,4-D na indução de calos androgênicos.....	66
5.2.1 Análise das preparações citológicas dos calos.....	69
5.3 Efeito dos reguladores de crescimento: ANA, Picloram e TDZ na indução de calos.....	70
5.4 Efeito de nitrato de prata na indução de calos androgênicos.....	73
6 Conclusões.....	76
7 Referências Bibliográficas.....	77
CAPÍTULO 4 – Criopreservação de grãos de pólen de mamoneira.....	83
1 Resumo.....	84
2 Abstract.....	85
3 Introdução.....	86
4 Material e métodos.....	89
4.1 Material botânico.....	89
4.2 Viabilidade polínica em mamoneira.....	90
4.3 Criopreservação dos grãos de pólen.....	91
4.4 Integridade do DNA nuclear.....	95
5 Resultados e discussão.....	95
5.1 Viabilidade polínica em mamoneira.....	97
5.2 Criopreservação dos grãos de pólen.....	98
5.2.1 Análise após 1(uma) hora de congelamento.....	98
5.2.2 Análise após 15 dias de congelamento.....	108
5.2.3 Análise após 30 dias de congelamento.....	115
5.2.4 Análise após 6 (seis) meses de congelamento.....	122

5.3 Integridade do DNA nuclear.....	130
6 Conclusões.....	131
7 Referências bibliográficas.....	132
CAPÍTULO 5 – Cultivo <i>in vitro</i> de mamoneira.....	138
1 Resumo.....	139
2 Abstract.....	140
3 Introdução.....	141
4 Material e métodos.....	143
4.1 Material botânico.....	143
4.2 Germinação <i>in vitro</i>	143
4.2.1 Efeito de concentração dos sais e do GA ₃	143
4.2.2 Influência do pH.....	145
4.3. Multiplicação <i>in vitro</i>	147
4.3.1 Efeito da interação BAP e ANA na indução de brotações.....	147
4.3.2 Efeito das citocininas na indução de brotos.....	149
4.4 Influência do ANA no enraizamento <i>in vitro</i>	151
5 Resultados e discussão.....	152
5.1 Germinação <i>in vitro</i>	152
5.1.1 Efeito de concentração dos sais e do GA ₃	152
5.1.2 Influência do pH.....	164
5.2. Multiplicação <i>in vitro</i>	168
5.2.1 Efeito da interação BAP e ANA na indução de brotações.....	168
5.2.2 Efeito das citocininas na indução de brotos.....	176
5.3 Influência de ANA no enraizamento <i>in vitro</i>	180
6 Conclusões.....	185
7 Referências Bibliográficas.....	186

RESUMO GERAL

VARGAS, Daiane Peixoto. **Anatomia floral, cultivo *in vitro* e criopreservação de mamoneira**. 2009. 189 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A demanda por conhecimentos sobre a mamona ou palma-cristi no Brasil se intensificou nos últimos anos, devido ao estímulo do governo para a produção de biocombustíveis e pelas diversas aplicações já consolidadas do óleo de mamona na indústria química e farmacêutica, atualmente gerando cerca de 700 subprodutos comerciais. Diante deste contexto, dimensionar e caracterizar a heterogeneidade de cultivares utilizadas no Brasil torna-se uma ferramenta estratégica para o país. Este trabalho teve por objetivo estudar aspectos da reprodução sexuada, do cultivo de anteras, como ferramenta à obtenção de haplóides, bem como analisar a tolerância ao congelamento de grãos de pólen, visando à caracterização e preservação a médio e longo prazo da espécie; e do cultivo *in vitro* de mamoneira (*Ricinus communis* L.). Na análise ontogênica, a escala sugerida para o comprimento do botão floral masculino (eixo longitudinal) pode ser correlacionada com os estádios de meiócitos, micrósporos, tétrades e grãos de pólen maduros, como parâmetro indicativo para fases da gametogênese. As condições mais adequadas para germinação dos grãos de pólen *in vitro* variam nas diferentes cultivares, sendo que as cultivares IAC-80 e BRS Nordestina apresentaram a maior viabilidade polínica, respectivamente, 70,5 e 69,25. A composição química do pólen se caracteriza pela presença de elevados teores de proteína (47,01%), resíduo mineral, vitamina C, extrato etéreo, e baixo conteúdo de amido, podendo ser classificados como proteináceos. Anatomicamente, a antese do botão floral e deiscência das anteras puderam ser observadas em botões florais com eixo longitudinal com diâmetro superior a 6,0 mm. Para a calogênese *in vitro* a partir de anteras da cultivar BRS-Nordestina, o uso do ácido ascórbico (200 mg L⁻¹) foi efetivo como antioxidante. A concentração de 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D adicionada ao meio MS proporcionou maior peso fresco (g) de calos. ANA, TDZ e Picloram induziram a formação de calos, entretanto, a maior matéria fresca pode ser obtida com a utilização do Picloram (3,0 mg L⁻¹). O uso de nitrato de prata e 2,4-D no meio de cultura foram eficientes na formação de calos não oxidados. Métodos de coloração citotógica com o uso do carmim-acético (98,0a) ou R. Alexander (97,7a), bem como a germinação *in vitro* (58,0b) podem ser utilizados para a determinação da viabilidade do pólen de mamona. Na criopreservação a

* Comitê Orientador: Renato Paiva, PhD - UFLA (Orientador); Dra. Maria Laene de Carvalho – UFLA; Dra. Vera Lúcia Bobrowski – UFPel (Co-orientadoras).

integridade do núcleo de grãos de pólen submetidos a temperatura de -196°C foram maiores quando utilizou-se o crioprotetor glicerol (5% ou 15%) analisados após 30 dias de congelamento. Na análise citológica a viabilidade celular do grão de pólen, permaneceu alta (superior a 50%) quando este é conservado por até seis meses a -196°C e -80°C. Os resultados obtidos neste trabalho confirmam a possibilidade de criopreservação como uma alternativa viável para a conservação de pólen de mamoneira. Na análise da micropropagação, verificou-se que a germinação com o uso de GA₃ não foi efetivo, contudo, a concentração completa de sais do MS (proporção de 0,8) e o ajuste do pH (5,8) foram satisfatórios (proporção de 1,0). Brotações a partir de segmentos apicais em meio de cultura com a utilização de ANA na concentração de 1,0 mg L⁻¹ foi determinante para a formação de plântulas não hiperhídricas, assim como, no enraizamento, a adição deste regulador (3,0 mg L⁻¹) foi eficiente para a formação de raízes *in vitro*, sendo que o mesmo tem efeito positivo sobre a formação de folha promovendo maior produção de peso fresco e seco.

Palavras-chave: micropropagação, haplóides, criopreservação, *Ricinus communis*.

GENERAL ABSTRACT

VARGAS, Daiane Peixoto. **Floral anatomy, *in vitro* culture and cryopreservation of castor bean.** 2009. 191 p. Thesis (Doctorate in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG. *

The demand for knowledge of the castor bean or palma-cristhi in Brazil, has been intensified in recent years due to government stimulus for biofuels production and various consolidated applications of castor oil in chemical and pharmaceutical industries, currently generating approximately 700 commercial products. In this context, the characterization of cultivar diversity used in Brazil is strategic for the country. The objective of this work was to examine aspects of sexual reproduction and anthers cultivation as a tool for obtaining haploid as well as to analyze freezing tolerance of pollen grains, in order to characterize and conserve the species at medium and long-term; and the *in vitro* cultivation of castor bean (*Ricinus communis* L.). On the ontogenic analysis, the scale suggested for the length of the male floral button (longitudinal axis) may be correlated with the stages of meiocyt, microspores, tetrad and mature pollen grains, as an indicative parameter for the stages of gametogenesis. The most adequate conditions for *in vitro* germination of pollen grains vary within cultivars, with IAC-80 and BRS Nordestina showing the highest pollen viability, 70.5 and 69.25, respectively. The chemical composition of the pollen is characterized by the presence of high levels of protein (47.01%), residue mineral, vitamin C, ether extract, and low content of starch, classifying it as proteinaceous. Anatomically, button's floral anthesis and anthers dehiscence can be observed in flower buds with longitudinal axis with diameter exceeding 6.0 mm. For *in vitro* callus formation from anthers of BRS-Nordestina, the use of ascorbic acid (200 mg L⁻¹) was effective as antioxidant. The concentration of 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D added to MS medium provided higher callus fresh weight (g). NAA, picloram and TDZ induced the formation of callus; however, the largest fresh weight could be obtained with the use of picloram (3.0 mg L⁻¹). The use of silver nitrate and 2,4-D in culture medium were effective in the formation of non oxidized callus. Cytological staining methods using carmin-acetic acid (98.0 a) or R. Alexander (97.7a), as well as *in vitro* germination (58.0b) can be used to determine the viability of castor bean pollen. During cryopreservation, the integrity of the pollen grain nucleus, subjected to temperature of -196 ° C was

* Guidance Committee: Renato Paiva, PhD (Adviser)- UFLA; Dr. Maria Laene de Carvalho – UFLA; Dr. Vera Lúcia Bobrowski – UFPel (Co-advisers).

higher using the cryoprotector glycerol (5% or 15%) after 30 days of freezing. In cytological analysis, pollen grain cell viability remained high (above 50%) when maintained up to six months at -196° C and -80° C. The results of this study confirm the possibility of cryopreservation as an alternative for the storage of castor bean pollen. During micropropagation, the use of GA₃ was not effective on germination, although the use of full concentration of MS salts (ratio of 0.8) and pH adjusted to 5.8 were considered satisfactory (proportion of 1.0). Formation of shoots from apical segments cultivated on medium containing 1.0 mg L⁻¹ NAA was essential for the formation of non hiperhidric seedlings. During rooting, the use 3.0 mg L⁻¹ NAA was effective for the formation of *in vitro* roots and presented positive effect on leaf formation promoting higher production of fresh and dry weight.

Key-word: micropropagation, haploid, cryopreservation, *Ricinus communis*.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

A mamoneira (*Ricinus communis* L.), oleaginosa de alto valor econômico por possuir inúmeras possibilidades de aplicação na área industrial, conhecida também pelo nome de carrapateira ou palma-cristhi, tem sua popularização há 4.000 anos, principalmente pelo uso medicinal e em cosméticos. O óleo extraído de suas sementes atualmente é utilizado na fabricação de vários subprodutos como tintas, corantes, desinfetantes, germicidas, óleos lubrificantes de baixa temperatura, colas, náilon e matéria plástica. Além de outros subprodutos, tem destaque a torta de mamona, com aplicação na ração animal e grande capacidade de restauração de terras esgotadas.

Entre as alternativas de plantas oleaginosas, visando à produção de biodiesel, a mamona é colocada como uma espécie de excelente potencial, principalmente nas regiões menos desenvolvidas do Brasil. No entanto, a sustentabilidade de um programa de biodiesel baseado na espécie exige o fortalecimento substancial da base agrícola tecnológica para dar suporte ao desenvolvimento, com a indicação de novos cultivares. Os benefícios ambientais deste cultivo proporcionam a redução na emissão de CO₂, seqüestro de CO₂ da atmosfera, redução de emissão de óxidos de enxofre e hidrocarbonetos.

Diante da grande diversidade de cultivares e do potencial da espécie no mercado, a conservação de germoplasma existente e o melhoramento genético tornam-se ferramentas auxiliares na busca por uma eficiente exploração deste recurso. Neste contexto, as técnicas de preservação e propagação *in vitro* se adequam a programas de introdução, armazenamento e intercâmbio de germoplasma, além da possibilidade de melhoramento e obtenção de cultivares mais produtivas e adaptadas às diversas regiões do país.

A grande diversidade genética observada no germoplasma de mamona proporciona o desenvolvimento de diferentes estratégias para incrementar os programas de melhoramento, uma vez que a variabilidade é a base para geração de genótipos superiores. Dentre as técnicas de preservação desta diversidade destaca-se a criopreservação que atualmente tem sido apontada como promissora para a mamoneira.

No entanto, o estudo da mamona ainda é incipiente e todo o trabalho realizado buscando o conhecimento trará informações para o desenvolvimento e aproveitamento do grande potencial que oferece essa cultura. A compreensão dos processos biológicos e conservação deste recurso, bem como a busca e caracterização de genótipos superiores auxiliarão sobremaneira à manutenção da diversidade da espécie.

Este trabalho objetivou estudar os aspectos do botão floral masculino, do cultivo de anteras visando a produção de duplo-haplóides; da tolerância ao congelamento de grãos de pólen e da micropropagação de mamoneira, buscando a preservação a médio e longo prazo da espécie.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características botânico-agronômicas da mamoneira

Pertencente à família Euphorbiaceae, a mamoneira (*Ricinus communis* L.), também chamada carrapateira, baforeira, palma-cristi e бага, é uma dicotiledônea presente predominantemente na região tropical. É possivelmente originária da antiga Abissínia, hoje Etiópia, no continente africano. A mamona é uma espécie perene que pode viver mais de 12 anos e atingir até 10 metros de altura, sendo uma planta de hábito arbustivo, com diversas colorações de caule, folhas e frutos tipo racemos (cachos), podendo possuir cera no caule e no pecíolo. Os frutos, geralmente apresentam acúleos, e as sementes apresentam

diferentes tamanhos, formatos e grande variabilidade de coloração (Moreira et al., 1996; Rodrigues et al., 2002) (Figura 1).



FIGURA 1 Aspecto geral da inflorescência (A), das plantas jovens (B e C), e das sementes (D) de *Ricinus communis* L.

A semente carúnculada varia no formato, tamanho, peso e coloração. Também se observa variabilidade na altura das plantas, no teor de óleo, na tolerância a pragas e doenças e a estresse ambiental (Figueiredo Neto et al., 2004).

Segundo Perry (1943), o número cromossômico da espécie é $2n= 20$. Conforme Mazzani (1983), a mamoneira seria considerada um tetraplóide natural com número básico de cromossomos $x=5$, já que um indivíduo $2n=10$ foi encontrado e classificado com diplóide verdadeiro já extinto.

A cultura da mamona é explorada industrialmente em função do óleo contido em suas sementes. Além do óleo, a mamona também produz a torta, resultante da extração do óleo, que é dividida em casca, a qual serve como fertilizante, e polpa que é rica em proteína e carboidrato utilizada na ração animal. É possível também aproveitar a haste (caule) da planta para a produção

de celulose, além de ser matéria-prima para a confecção de tecidos mais rústicos (Carneiro, 2003). Embora as sementes tenham alta toxicidade, o óleo de rícino não é tóxico, visto que a ricina, proteína tóxica das sementes, não é solúvel em lipídeos, permanecendo todo o componente tóxico restrito à torta (Savy Filho, 2001). As folhas da mamoneira são usadas popularmente no Brasil como hipoglicemiante e como diurético, também têm atividade antimicrobiana e filaricida comprovada. Contudo, estas aplicações são menos conhecidas e os aspectos farmacognósticos da espécie são igualmente importantes (Jombo & Enebeaku, 2007; Takano, 2007).

Nas regiões tropicais, a mamoneira apresenta ciclo de 250 a 300 dias, apresentando floração com apenas 50 a 60 dias da germinação. A organogênese da mamoneira envolve 12 diferentes estádios do desenvolvimento, considerando desde a germinação à completa maturidade de cada cacho, e a duração de cada estágio depende da cultivar e do ambiente (Beltrão, 2003).

As cultivares atuais de mamoneira (BRS-149 Nordestina, Paraguaçu, IAC-80, Mirante e Guarany, entre outras) são classificadas segundo seu porte, teor de óleo e o grau de deiscência do fruto maduro. Quanto ao porte, pode ser baixo, com até 1,8m; médio, entre 1,8-2,5m; e alto, com 2,5 a 10 m. Quanto à deiscência do fruto, são classificadas como deiscente, com abertura total; semideiscente, com abertura parcial, e indeiscente, sem abertura do fruto (Souza & Fernandes, 2004).

No Brasil, a baixa produtividade brasileira poderá comprometer a oferta de mamona para atender à crescente demanda por óleos vegetais para uso no Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) (Ramos et al., 2006). Para atender ao agronegócio da mamona no Brasil, diversas cultivares foram lançadas pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC), pela Embrapa Algodão, entre outras instituições no país.

Dentre elas destacam-se: a cultivar BRS-149 Nordestina por apresentar porte médio, ciclo biológico de até 250 dias e boa tolerância à seca, 48% de óleo em suas sementes e com produtividade seja de cerca de 1500 kg/ha (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Algodão, 2008); a cultivar IAC-80 de frutos deiscentes, porte alto, altura média de 2,50 a 3,50 m, ciclo de 240 dias, potencial produtivo de 1.500 a 4.000 kg/ha, 47% de óleo nas sementes, peso de 100 sementes de 43 g; a cultivar AL-Gurarany 2002 (lançado pela Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, São Paulo - CATI) (Amaral, 2009) apresentando frutos indeiscentes, relativa rusticidade, é resistente à seca e apresenta capacidade de produção média entre 1.000 e 2.000kg/ha de grãos (bagas ou frutos descascados) em condições de sequeiro, a colheita é manual e teor de óleo de suas sementes fica em torno de 47% (Amaral, 2009).

2.2 Biologia floral

A biologia floral da mamoneira é bastante complexa, apresentando diversas expressões da sexualidade (Moshkin, 1986). Além dos tipos de expressões, existem plantas com flores hermafroditas, podendo ainda ocorrer a reversão sexual, dependendo de fatores genéticos, do ambiente e do manejo cultural praticado (Prenner et al., 2008).

A inflorescência da mamoneira é do tipo panicular, denominada racemo, com flores femininas e masculinas, com distribuição característica de acordo com a determinação genética. Segundo Beltrão (2003), a mamona não tem um período de reprodução fixo, a maturidade é desuniforme, o que evidencia a dependência direta do ambiente e do nível de pluviosidade, por exemplo, o primeiro cacho floresce após 60 dias de germinação e a floração de segunda ordem inicia-se após 10 a 12 dias. Contudo o ciclo é de 250 a 300 dias. Por isso, conforme Souza & Fernandes (2004), são os de segunda ordem que mais contribuem com o rendimento total da cultura seguido pelos terciários.

As variedades botânicas apresentam as flores masculinas e femininas que podem estar organizadas caracteristicamente ao longo da inflorescência. Os racemos podem apresentar formatos cônicos, cilíndricos ou ovais (Moshkin & Perestova, 1986).

As flores masculinas, assim como as femininas, são apétalas, sendo protegidas no botão floral por 3 a 5 sépalas. As flores masculinas possuem um grande número de estames com filamentos ramificados – 20 a 40 ramificações primárias, 40 a 80 ramificações secundárias com 500 a 800 anteras. As anteras são arredondadas e de coloração amarela, sendo constituídas de duas tecas que se abrem explosivamente lançando pólen a grandes distâncias (Távora, 1982).

A liberação de grãos de pólen viáveis geralmente acontece duas a três horas antes do amanhecer, continuando por um a dois dias. Altas temperaturas, a idade da planta e o dia de comprimento curto favorecem o surgimento de flores masculinas. A flor feminina apresenta pedúnculo geralmente não articulado e cálice com cinco sépalas desiguais, ovário súpero tricarpelar, com placentação axial, estilo curto e trifurcado. A antese parece acontecer da base para o ápice da inflorescência (Prenner et al., 2008).

Os estigmas ficam receptivos algum tempo antes das flores masculinas abrirem. Há controvérsias sobre isso, já que a abertura das flores ocorre da base para o ápice, e como as flores masculinas se encontram na base, essas devem abrir primeiramente que as flores femininas. Mesmo que aconteça a protoginia, esse fato por si só não constitui barreira à autopolinização, pois as flores femininas permanecem receptivas por um período de 5 a 10 dias. Outro aspecto a ser considerado barreira à autopolinização é a localização das flores (flores masculinas na base e flores femininas no ápice). Porém, a explosiva deiscência da antera, leveza e grande produção de pólen podem contornar essa barreira (Prenner et al., 2008).

Segundo Severino & Gondim (2006), prevalece na mamoneira a anemofilia e abelhas contribuem para sua polinização. Rizzardo (2007) observou que a introdução de colônias de *Apis mellifera* levou ao acréscimo na produção de frutos e sementes na mamoneira, tendo as colmeias apresentado maior teor de mel, quando comparada com área semelhante sem a introdução de abelhas.

2.3 Aspectos econômicos

A mamona é produzida em 30 países. Considerando um valor médio da produção de US\$ 300,00/t na safra de 2004, isto equivaleu à geração de US\$ 394,3 milhões/ano, segundo a Food and Agriculture Organization - FAO (2004).

Entre 1980 e 1999, a China e a Índia eram os principais produtores mundiais de mamona. A participação desses países no total da produção mundial variou de 51%, entre 1980 a 1985, para 92% em 1999 (Azevedo & Lima, 2001).

Em 2002, a participação do Brasil na produção mundial de óleo representou pouco mais de 7%, com 37.000 toneladas de óleo. Enquanto ocorria o declínio da produção no Brasil, a produção mundial manteve-se constante. Atualmente, a Índia é o principal produtor de mamona, respondendo no mercado mundial por 51%, seguido da China (35%) e do Brasil (8%), dados de 2003 conforme FAO (2004).

O Brasil consome por ano 36 milhões de litros de diesel, sendo importado já refinado (10%) e para refinar (20%). O mercado energético projetado hoje, portanto, é de 800 milhões de litros de biodiesel B2 (2% adicionado a diesel) e para 2010, a utilização de B5, ou seja, a adição de 5% de biodiesel (Savy Filho, 2005). O desafio nacional é implantar um projeto energético auto-sustentável para esta demanda.

No Brasil, a área plantada de mamoneira em 2005 foi de 242.057 hectares com uma produção de 168.059 toneladas (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2007). A produção da mamona no Brasil na safra

2007/2008 teve perspectiva de crescimento para 146 mil toneladas - 55,8% a mais que no ciclo 2005/2006, segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2008). Para a produção segundo CONAB (2009) a safra dezembro/2008 no Brasil foi de 164,4 mil toneladas e para janeiro/2009 foi de 163,9.

Nos Estados de São Paulo e Minas Gerais foram alcançadas produtividades de até 2.500 kg/ha, sendo comum a produtividade média de 1.800 kg/ha (Macedo, 2003).

A produção de mamona em Minas Gerais foi de 3.620 t na safra do 2005 e para o ano 2007/08 foi previsto 3.832 t. Em 2000, a área plantada foi de 15 mil hectares com produção de 9 mil toneladas e, em 2005, essa produção decresceu para 6 mil toneladas em área colhida com cerca de 4 mil hectares (IBGE, 2007).

As principais unidades produtoras de biodiesel em Minas Gerais estão principalmente no Vale do Jequitinhonha com mais de 10 milhões de litros anualmente. O estado é o segundo maior consumidor de diesel do País, sendo apenas precedido por São Paulo.

A mamoneira vem sendo pesquisada há cerca de 30 anos no Brasil principalmente pela Embrapa Algodão, com intuito de gerar tecnologias que auxiliem a agricultura familiar do Brasil. Segundo Ferreira et al. (2006), diante do cenário nacional e internacional para a cultura, é igualmente necessária a consolidação da espécie no Cerrado como forte alternativa de rotação de culturas.

No entanto, a análise, em nível nacional, indica que para suprir o volume de óleo necessário para a produção de B2 (ou seja, 2% de biodiesel adicionado ao diesel de petróleo), exclusivamente à base de óleo de mamona, a ricinocultura deveria ocupar cerca de 570 mil hectares (Beltrão et al., 2001). Segundo a CONAB, na safra de 2004, ela utilizou apenas 161 mil. Assim, quando se refere às vantagens socioeconômicas e às ambientais da implementação de plantas para

produção de biodiesel à base de óleo de mamona no nordeste brasileiro, a produtividade dessa oleaginosa foi consideravelmente mais baixa na região. Por isso, torna-se fundamental o fomento a ricinocultura acompanhado de investimentos em pesquisas agronômicas (Freitas & Fredo, 2005).

A produção brasileira de biodiesel em 2008 foi de 1.164.332 m³/ano e os principais Estados produtores foram: Rio Grande do Sul, Mato Grosso e Goiás (CONAB, 2009).

A ricinocultura constitui uma atividade econômica capaz de engajar-se em programas do Governo Nacional. A importância da ricinocultura deriva-se do próprio sistema de produção da mamona que, praticado por pequenos produtores, é intensivo em mão-de-obra (gera empregos) e pode ser feito em consórcio e/ou rotação com outras culturas, aumentando não só a renda do agricultor por hectare, como também o volume de alimentos por área. Destaca-se que, além das vantagens sócio-econômicas, a cultura apresenta teor de óleo acima das demais, cada hectare cultivado absorve cerca de dez toneladas de gás carbônico, ou seja, quatro vezes mais quando comparado a outras oleaginosas (Ferreira et al., 2006).

Segundo Ponchio (2001), apesar de existirem vários estudos sobre a produção de mamona e seu ciclo de exploração econômica, a cadeia produtiva desta oleaginosa ainda não está efetivamente organizada, devido aos volumes de produção oscilantes ao longo do tempo acompanhando a oscilação de preços, e também devido às flutuações da demanda externa e à inconstante política pública de incentivos.

2.4 Propagação da mamoneira

2.4.1 Propagação sexuada

Quanto ao sistema reprodutivo, a mamona é considerada como tipo misto, com predominância da autofecundação. Porém, apresenta altas taxas de alogamia, podendo chegar a mais de 40%, embora seja considerada autógama. Este sistema proporciona um aumento da variabilidade genética. Com isso, essa alogamia dificulta a fixação e manutenção de cultivares melhoradas (Savy Filho, 1999).

A complexidade reprodutiva apresentada pela mamona tem dificultado a obtenção de genótipos com pureza varietal.

Embora as sementes da mamona sejam consideradas ortodoxas, quando comparadas com outras espécies classificadas igualmente, toleram um curto período de armazenamento, geralmente no máximo dois anos. Dessa forma, na propagação sexuada pode haver perdas do germoplasma existente, mesmo sob condições ótimas, em virtude do grande número de alterações prejudiciais que ocorrem durante a estocagem, resultando em anormalidades citológicas e metabólicas das sementes (Carvalho, 2005).

As sementes de mamona apresentam grande variação de tamanho e densidade, apresentando dificuldades para a regulação de sementeiras e desuniformidade na emergência das plantas, resultando em populações desiguais. Apresentam ainda problemas de dormência tegumentar, que distribui a germinação no tempo, além de baixa qualidade fisiológica das sementes disponíveis no mercado (Shepetina & Sevastyanova, 1986).

2.4.2 Propagação assexuada

A propagação vegetativa, geralmente feita por meio de estaquia com o objetivo de multiplicar fielmente genótipos de interesse, foi obtida por Milani et al. (2006), contudo, estes relatam que a produção de mamona através deste

método é pouco freqüente quando em comparação com outras espécies da mesma família, mandioca, pinhão-manso e seringueira.

Os trabalhos iniciais ainda afirmam que a produção de mudas por estaca independe do uso de reguladores de crescimento para o enraizamento. Macedo (2003) utilizaram estacas caulinares tratadas com AIA e AIB, que apresentaram, ao final de 45 dias após o plantio, raízes e folhas desenvolvidas. As médias de peso de raízes e folhas obtidas para as mudas tratadas e não tratadas com os reguladores de crescimento foram muito semelhantes não sendo observadas vantagens no uso de regulador nas condições em que o experimento foi conduzido.

2.4.2.1 Micropropagação

A micropropagação ou propagação vegetativa *in vitro* é uma alternativa à multiplicação fiel de um genótipo selecionado por meio das técnicas da cultura de tecidos de plantas, diferindo da propagação vegetativa convencional, por utilização de ambiente asséptico, permitindo o desenvolvimento sem a interferência de patógenos. Dentre as técnicas de cultura de tecidos de plantas, a micropropagação é a mais disseminada e a de maior impacto econômico (Grattapaglia & Machado, 1998).

Além disso, este método permite a formação de indivíduos geneticamente idênticos a partir de células, órgãos ou fragmentos de uma planta matriz. Para o enfoque econômico, esta técnica permite a produção em larga escala de plantas, a conservação *in vitro* e ainda auxilia no intercâmbio de germoplasma (Torres et al., 1996; Termignoni, 2005).

A maioria das plantas desenvolvidas *in vitro* é obtida pela multiplicação de brotações axilares. O padrão morfogênético *in vitro* é altamente dependente da interação entre as substâncias de crescimento que ocorrem naturalmente na planta (hormônios) e os análogos sintéticos (reguladores de crescimento),

adicionados ao meio de cultura (George, 1996). Os principais grupos destas substâncias são auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico.

Poucos são os trabalhos que têm demonstrado o potencial e a viabilidade de regeneração *in vitro* da mamoneira (Sujatha & Reddy, 1998). Mesmo com alguns avanços, nas duas últimas décadas, ainda há limitações ao processo de micropropagação da espécie, principalmente em função do comportamento recalcitrante *in vitro*.

A micropropagação pode ser utilizada como método alternativo para a multiplicação fiel de um genótipo de interesse. As plantas obtidas por melhoramento genético com características favoráveis podem ser fixadas e reproduzidas indefinidamente (Nass, 2001).

Apesar da existência de pesquisas sobre a cultura de tecidos de mamona, nas últimas décadas, nenhum protocolo de fácil reprodutibilidade foi estabelecido até o momento (Sailaja et al., 2008). Para a transformação genética de mamona, a única alternativa atualmente utilizada é a cultura de meristema. No entanto, a espécie é considerada recalcitrante *in vitro* por apresentar baixa taxa de multiplicação e cultivo pouco reprodutível (Sujatha & Reddy, 1998).

O embrião de mamona apresenta dormência que pode ser superada pelo cultivo *in vitro*. Pesquisas voltadas à transformação genética da espécie são recentes e buscam minimizar ou reduzir a produção de ricina, uma toxina encontrada em sementes, sendo considerada uma das barreiras à utilização da espécie (Carvalho, 2005). Por isso, a necessidade do estabelecimento de protocolos mais eficientes de regeneração *in vitro* torna-se fundamental (Ah et al., 2007).

Segundo George (1996), o estabelecimento de protocolos eficientes para a regeneração de uma espécie é condição prévia para a aplicação de técnicas biotecnológicas e aprimoramento dos programas de melhoramento da cultura.

2.5 Cultura de haplóides

Dentre as técnicas auxiliares do melhoramento, a cultura *in vitro* de anteras apresenta-se como uma ferramenta de grande utilidade, principalmente por reduzir o tempo necessário para a obtenção de linhagens homozigóticas. Essa técnica possibilita a substituição das inúmeras gerações de autofecundação necessárias no processo convencional e por permitir o estudo de mutações recessivas, visto que indivíduos haplóides apresentam a metade do patrimônio genético (Palú et al., 2004).

As plantas haplóides podem ser obtidas de duas maneiras, por androgênese direta ou por androgênese indireta. Três pontos são de fundamental importância na obtenção de plantas através da cultura de anteras por meio da androgênese indireta: (1) formação de calos a partir de anteras; (2) formação de gemas a partir de calos e (3) obtenção de plantas a partir das gemas. A primeira etapa é essencial e devemos considerar alguns fatores como o genótipo, o meio de cultivo e o estágio de desenvolvimento do grão de pólen, que podemos correlacionar com o tamanho do botão floral em muitas espécies (Bobrowski et al., 1995; Peters et al., 1999).

Pescador et al. (2000), reportam que a possibilidade de manipular sistemas *in vitro* para a clonagem de genótipos vegetais superiores depende de vários fatores, desde as condições de indução da calogênese, até parâmetros morfológicos, genéticos, bioquímicos e citológicos, como o conhecimento da fisiologia do desenvolvimento celular, que é de fundamental importância para se obter respostas morfogenéticas nos sistemas de cultura *in vitro*.

As diferentes composições do meio de cultura, as fontes de carboidratos, juntamente com as substâncias reguladoras de crescimento, podem induzir uma considerável gama de respostas nos diferentes tecidos de uma planta, dependendo da competência das células-alvo (Kerbaudy, 1998).

Na androgênese direta, o micrósporo comporta-se como um zigoto e passa por vários estádios de embriogênese, semelhante ao que ocorre *in vivo*. Na androgênese indireta, que ocorre com mais frequência, os micrósporos dividem-se algumas vezes, formando calos, os quais emergem através da parede da antera (Peters et al., 1999).

Uma planta androgênica, formada a partir do cultivo *in vitro* de anteras, tem somente metade do número de cromossomos da espécie. Entretanto, a duplicação de seus cromossomos pode ocorrer de maneira espontânea ou induzida, recuperando, assim, sua condição diplóide totalmente homozigota (Bajaj, 1984).

Portanto, esta técnica justifica-se pela redução do tempo necessário para a obtenção de linhagens homozigóticas puras, bem como para ampliar a eficiência de seleção de características agronômicas desejáveis. Além disso, é importante em trabalhos envolvendo obtenção de mutantes, fusão somática, mapeamento gênico em duplo-haplóides, e ainda como alvo para a transferência de genes.

No entanto, uma série de fatores químicos, físicos e genéticos interagem de forma complexa, influenciando tanto na indução do embrião haplóide como sua diferenciação em plântula (Santos, 2004). Dentre os fatores críticos para a indução da androgênese, temos o genótipo e as condições fisiológicas da planta doadora, o estágio de desenvolvimento dos micrósporos, o tipo de pré-tratamento aplicado nos botões florais e a composição do meio de cultura (Peters et al., 1999).

2.6 Criopreservação

A criopreservação ou criarmazenamento é a conservação de material biológico sob condições de temperatura ultra-baixa em nitrogênio líquido a -196°C , ou em sua fase de vapor a -170°C . É capaz de interromper todo

metabolismo celular e tem sido considerada a maneira mais promissora de preservação a longo prazo para células, tecidos e órgãos vegetais (Carvalho & Vidal, 2003).

Para a conservação do material *in vitro* existem dois métodos principais, são eles: o crescimento lento (períodos médios) e a criopreservação (períodos longos). No primeiro, há necessidade de subculturas periódicas, com maior custo de manutenção, sendo aplicado em várias espécies de importância econômica, tais como: cafeeiro (*Coffea arabica* L.), morangueiro (*Fragaria* spp.), bananeira (*Musa* spp.) (Santos, 2001).

Nas últimas décadas, diversas espécies foram criopreservadas a partir de explantes micropropagados vegetativamente, dentre as quais se destacam os cereais e gramíneas, plantas ornamentais, frutíferas, leguminosas e oleaginosas, medicinais e aromáticas, entre outras.

Algumas culturas de células *in vitro* são fontes principais de produtos químicos. A quantidade desses fitoquímicos pode variar em subcultivos prolongados. Por isso, torna-se extremamente importante a manutenção dessas linhagens celulares com o auxílio da criopreservação (Winkelmann et al., 2004).

Diferentes métodos de criopreservação têm sido utilizados especificamente para cada material biológico, como por exemplo: protoplastos, calos, meristemas, sementes, grãos de pólen, embriões somáticos e zigóticos e culturas produtoras de metabólitos secundários de interesse econômico e linhagens celulares geneticamente modificadas (produtos biotecnológicos) (Sakai, 1995; Stushnoff & Seufferheld, 1995; Sant et al., 2008).

A chave do sucesso para a criopreservação não reside na indução à tolerância ao congelamento, mas sim na tolerância à desidratação. Um dos maiores desafios na criopreservação é realizar um congelamento sem que haja a formação de cristais de gelo no interior das células. A formação de gelo causa ruptura do sistema de membranas celulares, resultando em perda da

semipermeabilidade e da compartimentação celular, levando à morte celular. Portanto, a água precisa ser removida antes do congelamento, para evitar as injúrias (Engelmann, 1997; Santos, 2001).

Os crioprotetores nesta fase constituem-se em um meio para superar o problema de injúrias provocadas pelo congelamento. Têm como função diminuir o ponto de congelamento, com queda de 2 a 3°C, promover estabilidade das membranas e a alteração na estrutura física do gelo (Seidel, 1996). Existem vários produtos que podem ser utilizados com essa finalidade, como o etanol, glicóis, dimetilsulfóxido (DMSO), acetado de amônio, carboidratos, sorbitol, uréia, açúcares, vários aminoácidos, e o glicerol (1, 2, 3 propanotriol), sendo esse o menos tóxico e mais utilizado atualmente (Sousa, 1990).

Na fase de recuperação do material congelado, o restabelecimento do crescimento indica o sucesso do processo de criopreservação. Sendo assim, as culturas devem ser estimuladas para reinício dos processos metabólicos com procedimentos específicos a cada tipo de cultura (Santos, 2004; Steinmacher, 2005).

Atualmente, pesquisas sobre a criopreservação da mamoneira são escassas. Há relatos somente da conservação utilizando eixos embrionários e sementes intactas, que indicam um nível máximo de umidade entre 4 e 10% , porém ocupando um espaço maior no armazenamento. Contudo, as avaliações são preliminares, sem a aplicação de crioprotetores eficientes e sem o estabelecimento de protocolo para a espécie (Lopes et al., 2004).

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS E PERSPECTIVAS PARA A ESPÉCIE

O estudo da mamoneira e o conhecimento gerado acerca desse estudo fornecem informações sobre a reprodução sexuada, alternativas de propagação,

ou mesmo da diversidade genética da espécie, o que por consequência trará maior aplicabilidade da cultura no Brasil.

A pesquisa com esta espécie possibilitará a exploração racional dos seus subprodutos, incentivando a indústria ricinoquímica e bioenergética e, conseqüentemente, o crescimento da mão-de-obra necessária para a manipulação dos cultivos comerciais no Brasil.

Vale ressaltar ainda que a mamona apresenta dificuldades para propagação *in vitro* e o estabelecimento de protocolos eficientes será fundamental para a aplicação de técnicas de transformação genética que viabilizem a produção de novos cultivares. Neste sentido, a obtenção de um protocolo de propagação via cultura de tecidos contribuirá sobremaneira para a conservação de genótipos de interesse.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 cellular and developmental biology-Plant**, Berlin, v. 43, n. 1, p. 43-49, Feb. 2007.

AMARAL, J. G. C. do. **Cultivo de mamona AL- Guarany 2002**. São Paulo: CATI, 2009. Disponível em: <http://www.cati.sp.gov.br/novacati/tecnologias/catiresponde/cr52mamona_guarany.htm>. Acesso em: 20 fev. 2009.

AZEVEDO, D. M. P. de; LIMA, E. F. **O agronegócio da mamona no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2001. 305 p.

BAJAJ, Y. P. S. *In vitro* production of haploids. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. U.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture techniques for propagation and breeding**. New York: Macmillan, 1984. v. 1, 229 p.

BELTRÃO, N. E. de M.; SILVA, L. C.; VASCONCELOS, O. L.; AZEVEDO, D. M. P. de; VIEIRA, D. J. Fitologia. In: AZEVEDO, D. M. P. de; LIMA, E. F. **O agronegócio da mamona no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2001. p. 37- 61.

BELTRÃO, N. E. de M. **Crescimento e desenvolvimento da mamoneira (*Ricinus communis* L.)**. Campina Grande, PB: Embrapa Algodão, 2003. 4 p. (Comunicado Técnico, 146).

BOBROWSKI, V. L.; PETERS, J. A.; AUGUSTIN, E.; VIÉGAS, J. Efeitos de meios de cultura na formação de calos a partir de anteras de aspargo (*Asparagus officinalis* L). **Acta Botanica Brasílica**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 1, p. 112-115, 1995.

CARNEIRO, R. A. F. A produção do biodiesel na Bahia. **Conjuntura & Planejamento**, Salvador, n. 112, p. 35-43, set. 2003.

CARVALHO, J. M. F.; VIDAL, M. S. **Crioconservação no melhoramento vegetal**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. 22 p. (Embrapa Algodão. Documentos, 115).

CARVALHO, B. C. L. **Manual do cultivo da mamona**. Salvador: EBDA, 2005. 65 p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Mamona**. Brasília, 2008. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/>>. Acesso em: 16 nov. 2008.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Quinto levantamento de avaliação da safra 2008/2009**. Brasília, Jan. 2009. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3graos_08.09.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA ALGODÃO. **Mamona**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2008. Disponível em: <<http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/index.html>>. Acesso em: 05 jun. 2008.

ENGELMANN, F. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Rome, n. 112, p. 9-18, 1997.

FERREIRA, G. B.; BELTRÃO, N. E. M.; SEVERINO, L. S.; GONDIM, T. M. S.; PEDROSA, M. B. **A cultura da mamona no cerrado: os riscos e oportunidades.** Campina Grande: Embrapa, 2006. 72 p. (Comunicado Técnico, 149).

FIGUEIREDO NETO, A.; ALMEIDA, F. de A. C.; GOUVEIA, J. P. G. de; NÓBREGA, M. B. M.; CARNEIRO, R. M.; PEDROZA, J. P. Divergência genética em acessos de mamona (*Ricinus communis* L.) baseada nas características das sementes. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Paraíba, v. 4, n. 2, p. 7, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Castor bean in the word.** Roma: FAOSTAT Database, 2004. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat/form?collection=Production.Crops.Primary&Domain=Production&servlet=1&hasbulk=0&version=ext&language=EN>>. Acesso em: 18 jan. 2006.

FREITAS, S. M.; FREDO, C. E. Biodiesel à base de óleo de mamona: algumas considerações. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 1-6, jan. 2005.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: part I: the technology.** 2.ed. Hardcover: Exegetics, 1996. 574 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998. v. 1, p. 183-260.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola.** 2007. (Comunicação Social). Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acessado em: 20 jun. 2008.

JOMBO, G. T. A.; ENENEBEAKU, M. N. O. Antimicrobial susceptibility patterns of bacteria to seed extracts of *Ricinus communis*: findings of a preliminary study in Nigeria. **The Internet Journal of Microbiology**, Calabar, v. 4, n. 1, p. 50-56, 2007.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa, 1998. v. 2, p. 569-612.

LOPES, K. P.; ALMEIDA, F. de A. C.; CARVALHO, M. J. F. C.; BRUNO, R. de L. A. Protocolo para crioconservação de mamona (*Ricinus communis* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, ENERGIA SUSTENTABILIDADE, 2004, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: Embrapa–CNPA, 2004. 1 CD-ROM.

MACEDO, M. H. G. **Mamona**. Brasília: CONAB, 2003. 7 p.

MAZZANI, B. Euforbiáceas oleaginosas Taitago. In: _____. **Cultivo y mejoramiento de plantas oleaginosas**. Caracas, Venezuela: Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuárias, 1983. p. 277-360.

MILANI, M.; MIGUEL JÚNIOR, S. R.; OLIVEIRA, E. C. S.; NÓBREGA, M. B. de M. V.; COSTA, M. N. **Caracterização taxonômica de acessos de mamona (*Ricinus communis* L.) do banco ativo de germoplasma da Embrapa Algodão**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 17 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 67).

MOREIRA, J. A. N.; LIMA, E. F.; FARIAS, F. J. C.; AZEVEDO, D. M. P. de. **Melhoramento de mamoneira (*Ricinus communis* L.)**. Campina Grande: Embrapa–CNPA, 1996. 29 p. (Embrapa-CNPA. Documentos, 44).

MOSHKIN, V. A. (Ed.). **Castor**. NewDelhi: Amerind, 1986. 315 p.

MOSHKIN, V. A.; PERESTOVA, T. A. Morphology and anatomy. In: MOSHKIN, V. A. (Ed.). **Castor**. New Delhi: Amerind, 1986. p. 28-33.

NASS, L. L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C.; PESCADOR, R.; ARAÚJO, P. S.; MAAS, C. H.; REBELO, R. A.; GIOTO, C. R.; WENDHAUSEN JR., R.; LARGURA, G.; TAVARES, L. B. B. Biotecnologia de *Piper hispidinervium*-pimenta longa. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 15, p. 19-23, 2000.

PALÚ, E. G.; SILVA, A. B. da; PASQUAL, M. Calogênese *in vitro* em anteras de *Coffea arabica* L. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 4, n. 28, p. 736-742, 2004.

PERRY, B. A. Chromosome number and phylogenetic relationships in the Euphorbiaceae. **American Journal of Botany**, St. Louis, n. 30, p. 527-543, 1943.

PESCADOR, R.; ARAÚJO, P. S.; MAAS, C. H.; REBELO, R. A.; GIOTO, C. R.; WENDHAUSEN JR., R.; LARGURA, G.; TAVARES, L. B. B. Biotecnologia de *Piper hispidinervium*-Pimenta Longa. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n. 15, p. 18-23, 2000.

PETERS, J. A.; BOBROWSKI, V. L.; ROSINHA, G. M. S. Produção de haplóides e duplohaplóides. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1999. v. 1, p. 569-612.

PONCHIO, J. A. R. **Relatório final**: cadeia produtiva da mamona para biodiesel. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. 56 p.

PRENNER, G.; BOX, M. S.; CUNNIFF, J.; RUDALL, P. J. The branching stamens of *Ricinus* and the homologies of the angiosperm stamen. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 6, n. 169, p. 735-744, 2008.

RAMOS, N. P.; AMORIM, E. P.; SAVY FILHO, A. Potencial da cultura da mamona como fonte de matéria-prima para o programa nacional de produção e uso de biodiesel. In: CÂMARA, G. M. de S.; HEIFFIG, L. S. (Coord.). **Agronegócio de plantas oleaginosas: matérias-primas para biodiesel**. Piracicaba: Esalq, 2006. p. 81-104.

RIZZARDO, R. A. G. **O papel de *Apis mellifera* L. como polinizador da mamoneira (*Ricinus communis* L.): avaliação da eficiência de polinização das abelhas e incremento da produtividade da cultura**. 2007. 80 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

RODRIGUES, R. F. 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.

SAILAJA, M.; TARAKESWARI, M.; SUJATHA, M. Stable genetic transformation of castor (*Ricinus communis* L.) via particle gun-mediated gene transfer using embryo axes from mature seeds. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, n. 9, p. 1509-1519, Sept. 2008.

SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry: cryopreservation of plant germplasm I**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. v. 32, p. 53-69.

SANTOS, I. R. I. **Criopreservação de eixos embrionários de espécies de citrus usando encapsulamento e desidratação.** Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 23 p. (Embrapa. Boletim Técnico, 115).

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 20, p. 60-65, maio/jun. 2001.

SANT, R.; PANIS, B.; TAYLOR, M.; TYAGI, A. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, p. 107-111, 2008.

SAVY FILHO, A. Hibridação em mamona. In.: BORÉM, A. (Ed.). **Hibridação artificial de plantas.** Viçosa, MG: UFV, 1999. p. 321-342.

SAVY FILHO, A. Mamoneira: técnicas de cultivo. **O Agrônomo**, Campinas, v. 53, n. 1, p. 10-13, 2001

SAVY FILHO, A. **Mamona tecnologia agrícola.** Campinas: EMOPI, 2005. 105 p.

SEIDEL, G. E. J. Cryopreservation of equine embryos. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 22, n. 1, p. 831-841, Apr. 1996.

SEVERINO, L. S.; GONDIM, T. M. de S. **Cooperação técnica Brasil - Venezuela para transferência de tecnologia para produção de mamona.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 16 p. (Embrapa Algodão. Documentos, 159).

SHEPETINA, F. A.; SEVASTYANOVA, L. B. Seed technology. In: MOSCKIM, V. A. **Castor.** New Delhi: Amerind, 1986. p. 175-178.

SOUSA, V. A. de. Criopreservação de pólen de *Eucalyptus* spp. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 21, p. 15-19, dez. 1990.

SOUZA, A. S.; FERNANDES, F. J. A. T. Florescimento e produtividade da mamoneira cultivada em diferentes épocas In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 2004, Aracaju. **Anais...** Aracaju: Embrapa, 2004. 1 CD-ROM.

STEINMACHER, D. A. **Germinação *in vitro*, criopreservação e embriogênese somática em pupunha**. 2005. 146 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

STUSHNOFF, C.; SEUFFERHELD, M. Cryopreservation of apple (*Malus species*) genetic resources. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry, cryopreservation of plant germplasm I**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. v. 32, p. 87-101.

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**, Berlin, v. 17, n. 6/7, p. 561-566, Apr. 1998.

TAKANO, E. H. Inibição do desenvolvimento de fungos fitopatogênicos por detergente derivado de óleo da mamona (*Ricinus communis*). **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 5, p. 1235-1240, 2007.

TÁVORA, F. J. A. F. **A cultura da mamona**. Fortaleza: Empresa de Pesquisa Agropecuária do Ceará, 1982. 111 p.

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: UFRGS, 2005. 182 p.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1996. v. 1, 509 p.

WINKELMANN, T.; MUSSMANN, V.; SEREK, M. Cryopreservation of embryogenic suspension cultures of *Cyclamen persicum* Mill. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, n. 1/2, p. 1-8, May 2004.

CAPITULO 2

ANATOMIA, FERTILIDADE E ONTOGENIA DO BOTÃO FLORAL MASCULINO DE MAMONEIRA

1 RESUMO

A mamona ou palma-cristi (*Ricinus comunis* L.) é uma planta de ampla utilização industrial e de grande importância econômica, tanto no Brasil como no mercado mundial. O óleo de rícino extraído de suas sementes serve, entre outras utilidades, como lubrificante para aviões a jato, fluidos hidráulicos, no preparo de tintas e vernizes, na fabricação de plásticos, e de produtos farmacêuticos. Atualmente, a cultura da espécie vem sendo indicada para exploração apícola, com alta produtividade. Os estudos de preservação e de reprodução das espécies de importância agrícola exigem conhecimentos básicos sobre potencial de fertilização, morfologia e a estrutura de suas flores. Portanto, este trabalho teve por objetivo buscar informações sobre a capacidade de fertilização dos grãos de pólen das cultivares Mirante, AL-Guarany 2002, Nordeste BRS-149, IAC-80 e do tipo silvestre (ruderal); os aspectos anatômicos da formação do botão floral masculino; a formação dos gametas e sobre a composição físico-química dos grãos de pólen de mamoneira. Para a análise das fases da gametogênese determinou-se uma escala do eixo horizontal do botão floral ($\geq 2,9$; 3,0-3,9; 4,0-4,9; 5,0-5,9 e $6,0 \leq$ mm). Os dados referentes ao comprimento dos botões foram avaliados com relação aos estádios da microsporogênese e microgametogênese encontrados. Para o teste de viabilidade polínica *in vitro* das cultivares e do tipo silvestre foram avaliadas a germinação do pólen em diferentes meios de cultivo: MC 1 - 10% sacarose + 0,03% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ + 0,01% KNO_3 + 0,02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 0,01% H_3BO_3 ; MC 2 - sacarose a 10% + 0,01% H_3BO_3 + 0,02%; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ MC 3 - 10% sacarose; e MC 4 - 30% sacarose, sendo todos solidificados com 0,8% de ágar. A composição química do pólen foi feita avaliando-se as características: grau de umidade, extrato etéreo, proteína bruta, amido, resíduo mineral e vitamina C. Para a análise anatômica os botões florais foram feitas em material fixado em etanol:ácido acético, proporção 3:1. Para o preparo histológico, utilizou-se a técnica de inclusão em parafina após desidratação em série alcoólica etílica. De acordo com a análise citológica realizada neste estudo, o tamanho do botão floral pode ser usado como parâmetro indicativo para fases da gametogênese. A escala sugerida para a classificação do comprimento do botão floral masculino pode ser correlacionada aos estádios de micrósporo e grão de pólen. As condições mais adequadas para germinação dos grãos de pólen *in vitro* variaram nas diferentes cultivares de *R. communis*, sendo IAC-80 e BRS-Nordestina as que apresentaram viabilidade polínica superiores. O pólen de mamona pode ser classificado como proteináceo, devido ao elevado teor de proteína. O pólen *in natura* de mamona apresenta altos valores nutricionais, apresentando potencial para a exploração apícola no Brasil.

Palavras-chave: microsporogênese, pólen, *Ricinus communis*.

2 ABSTRACT

Castor bean or palma-cristi (*Ricinus communis* L.) is a plant widely used in the industry which presents economical importance in Brazil and world market. Oil extracted from its seeds is used, among other utilities, as a lubricant for jet aircraft, hydraulic fluids, preparation of paints and varnishes, manufacture of plastics and pharmaceutical products. The species has also been indicated for the production of honey. Studies of preservation and reproduction of species of agricultural importance require basic knowledge of fertilization potential, morphology and structure of their flowers. Therefore, the objectives of this work were to obtain information regarding the fertilization capacity of pollen grains of the castor bean cultivars Belvedere, Guarany AL-2002, Nordeste BRS-149, IAC-80 and the wild type (ruderal), to study anatomical aspects of the formation of the button male, the formation of gametes and determine the physico-chemical composition of pollen grains. For the analysis of the stages of gametogenesis, a scale of horizontal axis of the button flower (≥ 2.9 ; 3.0-3.9, 4.0-4.9, 5.0-5.9 and $6.0 \leq$ mm) was determined. Data of buttons length were evaluated with respect to the founded stages of microsporogenesis and microgametogenesis. For *in vitro* pollen viability of wild-type and cultivars, pollen germination was evaluated in different culture media: (MC 1) 10% sucrose + 0.03% Ca (NO₃)₂ 4H₂O + 0.01% KNO₃ + 0.02% MgSO₄.7H₂O + 0.01% H₃BO₃; (MC 2) 10% sucrose + 0.01% H₃BO₃ + 0.02% CaCl₂. 2H₂O; (MC 3) 10% sucrose, and (MC 4) 30% sucrose, all solidified with 0.8% agar. Chemical composition of pollen was evaluated by analyzing the following characteristics: moisture content, ether extract, crude protein, starch, mineral residue and vitamin C. For the anatomical analysis, flower buds were fixed in ethanol: acetic acid, 3:1 ratio. For histological preparation, the technique of embedding in paraffin after dehydration in ethanol series was used. According to the cytological analysis, the size of floral button can be used as an indicative parameter of the stages of gametogenesis. The scale proposed for the classification of the length of the male floral button can be correlated with the stages of microspores and pollen grain. The most adequate conditions for *in vitro* germination of pollen grains vary within cultivars, with IAC-80 and BRS Nordeste showing the highest pollen viability. The pollen of castor oil can be classified as proteinaceous due to high content of protein. The castor bean pollen in nature presents high nutritional values presenting potential for honey production in Brazil.

Key words: microsporogenesis, pollen, *Ricinus communis*.

3 INTRODUÇÃO

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma planta de porte arbustivo do gênero monoespecífico. Segundo Weiss (2000), a espécie é considerada de ampla distribuição geográfica, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. O óleo de rícino extraído de suas sementes é altamente versátil e seus derivados têm inúmeras aplicações industriais como composto lubrificante de alta qualidade, pinturas, plásticos e revestimentos.

No comércio mundial, a Índia é atualmente a maior produtora do óleo de rícino, representando 85% da produção, seguido da China e do Brasil (Silva, 2006). No contexto econômico e atual, a mamoneira tem grande importância para o Brasil pois, além destas inúmeras aplicações historicamente consagradas, a espécie pode ser utilizada como matriz energética para a produção de biodiesel.

Segundo Moshkin (1986 apud Monteiro, 2005), a biologia floral da mamoneira é bastante complexa, apresentando diversas expressões da sexualidade, como a chamada fêmea estável (plantas com somente flores femininas), a fêmea instável (com racemo central pistilado e os demais parcial ou totalmente monóicos); plantas monóicas (normal), e plantas com somente flores masculinas. Além destes arranjos das inflorescências, também podem ser encontradas plantas do tipo hermafroditas.

As flores masculinas são constituídas por numerosos estames com ramificados filetes de 20 a 80 primárias e secundárias e com 500 a 800 anteras com tecas globulares separadas. Segundo Távora (1982), o botão floral é apétalo e protegido por 3 a 5 sépalas. A liberação de grãos de pólen viável geralmente acontece duas a três horas antes do amanhecer, continuando por um a dois dias (Weiss, 1983).

Segundo Rizzardo (2007), apesar da polinização na espécie ser predominantemente por anemofilia, a introdução de colônias de *Apis mellifera*

induziu um aumento na produção de frutos e sementes na mamoneira. Além disso, estas apresentaram um maior teor de óleo, quando comparada com área semelhante sem a polinização por abelhas.

A possibilidade de agregar valor à cultura de mamona por meio da apicultura, relatada por Milfont (2007), indica o potencial da mamoneira para a produção de mel abelhas. A mamoneira apresenta-se como fonte importante de néctar e de pólen, acrescentando valor nutricional e com rendimento de 23,52 kg de mel em apenas 49 dias, alcançando o valor médio anual em área de campo silvestre.

Além disso, o pólen e o mel da mamoneira não são considerados tóxicos para abelhas melíferas e para roedores, indicando que, provavelmente, seja próprio para o consumo humano (Milfont, 2007).

No entanto, os estudos nesta área com a espécie são ainda incipientes e todo trabalho realizado no sentido de elucidar as características florais trarão informação para o desenvolvimento e aproveitamento do grande potencial que oferece esta cultura. Os estudos de preservação e de reprodução de espécies de importância agrícola também exigem conhecimentos básicos sobre a morfologia e a estrutura de suas flores.

Desta forma, este trabalho teve por objetivo buscar informações sobre a capacidade de fertilização dos grãos de pólen nos cultivares de mamona; os aspectos anatômicos da formação do botão floral masculino; a formação dos gametas masculinos (microsporogênese e microgametogênese); e sobre a composição físico-química dos grãos de pólen de mamoneira.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Viabilidade polínica em diferentes genótipos de mamoneira

Sementes de diferentes cultivares Mirante, AL-Guarany 2002, Nordestina (BRS-149), IAC-80 foram germinadas e mantidas em casa de vegetação, até o período de floração do primeiro racemo. Além das cultivares também foram coletadas espécimes do tipo ruderal (silvestre), na época de florescimento, entre os meses de outubro a novembro de 2007. As coletas foram feitas próximas ao campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA), localizada no município de Lavras, Minas Gerais. As plantas foram identificadas e as excicatas foram depositadas no herbário UFLA, do Departamento Biologia da UFLA, com número de registro 25.041.

O experimento foi executado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, do Setor de Fisiologia Vegetal, no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG.

Para o teste de viabilidade polínica *in vitro* foi avaliada a germinação do pólen desta espécie, conforme os diferentes meios de cultivo: **MC 1** - 10% sacarose + 0,03% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ + 0,01% KNO_3 + 0,02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 0,01% H_3BO_3 ; **MC 2** - sacarose a 10% + 0,01% H_3BO_3 + 0,02%; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; **MC 3** - 10% sacarose; e **MC 4** - 30% sacarose, sendo todos solidificados com 0,8% de ágar, segundo composição sugerida por Brewbaker & Kwack (1963) e Stanley & Linskens (1974).

O experimento constou de quatro repetições, contituídas de quatro tratamentos, quando foi avaliada a germinação de pólen, por meio da análise de Scott Knott a 5% de probabilidade. A análise estatística foi realizada de acordo com o delineamento experimental inteiramente causalizado pelo pacote Sisvar (Ferreira, 2000).

4.2 Relação entre botão floral e estádios da microsporogênese e microgametogênese de *Ricinus communis* L.

Sementes de *Ricinus communis* cv. Nordestina BRS-149, fornecidas pela Embrapa Algodão, Campina Grande, PB, foram germinadas e as plantas foram mantidas em casa de vegetação. Inflorescências do primeiro racemo (Figura 1) foram coletadas ao acaso após 70 dias de cultivo, no mês de abril de 2008. As análises dos botões florais foram feitas no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, do Setor de Fisiologia Vegetal, no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG.

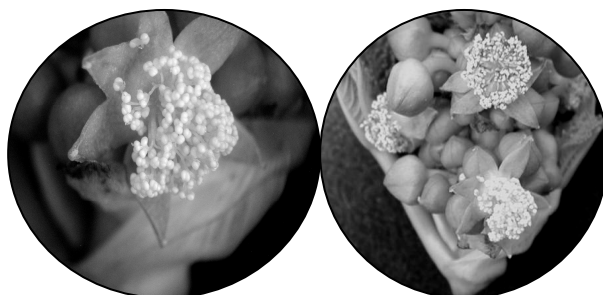


FIGURA 1 Aspecto geral da inflorescência de *Ricinus communis* L. com detalhe da flor masculina em antese.

Os botões florais foram classificados por diâmetro no eixo horizontal, com auxílio de um paquímetro digital (marca Vonder®, com precisão de 0,05 mm). Para a fixação do material foi utilizada a solução de etanol e ácido acético, na proporção de 3:1. Para as análises, as anteras foram lavadas em água destilada e isoladas com o auxílio de agulhas histológicas e bisturi sobre lâmina em microscópio estereoscópico. Foram maceradas cerca de 400 anteras em corante, carmim-acético a 1%, e posteriormente observadas ao microscópio óptico para o registro das fases (Guerra & Souza, 2002).

As fases da gametogênese de pré-antese, antese e pós-antese foram classificadas e separadas de acordo com uma escala referencial para o diâmetro

do botão floral. Os dados referentes ao comprimento dos botões são relativos a cada estágio da microsporogênese e microgametogênese.

O experimento foi instalado segundo um delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições com total de 100 células cada, em que os tratamentos constituíram-se de 5 escalas de comprimento do botão floral ($\geq 2,9$; 3,0-3,9; 4,0-4,9; 5,0-5,9 e $6,0 \leq \text{mm}$), na qual foram medidas as proporções de grãos de pólen maduros (binucleado com assimetria), micrósporos (com núcleo central), tétrades e meiócitos (fases da meiose).

A análise estatística foi realizada de acordo com o delineamento experimental por meio do pacote estatístico R (R Development Core Team, 2008). O modelo estatístico que descreve as observações é dado por:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \delta_k + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ijk},$$

em que:

y_{ijk} é o valor da variável dependente na k-ésima repetição que recebeu o i-ésima escala, no j-ésimo tipo de pólen, com $l = 1, \dots, r$;

μ é uma constante inerente a cada observação;

α_i é o efeito da i-ésima escala, com $i = 1, 2, \dots, 5$;

β_j é o efeito do j-ésimo tipo de pólen, com $j = 1, 2, 3, 4$;

$\alpha\beta_{ij}$ é o efeito da interação entre a i-ésima escala e o j-ésimo tipo de pólen;

ε_{ijk} é o erro experimental associado à parcela, independente e identicamente distribuído de uma Normal com média zero e variância σ^2 .

4.3 Aspectos anatômicos do botão floral masculino

Sementes de *Ricinus communis* cv. Nordestina BRS-149 fornecidas pela Embrapa Algodão, Campina Grande, PB, as plantas foram mantidas em casa de

vegetação. Inflorescências do primeiro racemo foram coletadas ao acaso após 70 dias de cultivo, no mês de abril de 2008. As análises foram feitas no Laboratório de Anatomia Vegetal, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG.

As flores foram coletadas e classificadas em escala do botão floral em milímetros, conforme descrito no item 4.2.

Análises morfológica e estrutural dos botões e flores foram feitas em material fixado em álcool etílico 70%. Para o preparo das lâminas permanentes dos cortes, utilizou-se a técnica de inclusão em parafina após desidratação em série alcoólica etílica, segundo Johansen (1940).

Os botões foram cortados em seções transversais e longitudinais com auxílio de um micrótomo rotatório, e submetidos à dupla coloração com Safrablau. A montagem de lâminas permanentes foi feita em Bálsamo do Canadá. As fotomicrografias foram captadas com o auxílio de um microscópio de luz acoplado a uma ocular micrométrica.

4.4 Composição química do pólen

A determinação da composição química dos grãos de pólen foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular, no Setor de Fisiologia Vegetal (DBI), e no Laboratório de Produtos Vegetais no Departamento de Ciência dos Alimentos, na UFLA.

As análises físico-químicas foram realizadas a partir de grãos de pólen de *Ricinus communis* L. de espécimes do tipo silvestre coletadas, na época de florescimento, próximo ao campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA), nos meses de outubro a novembro de 2007. As plantas foram identificadas e as excisatas foram depositadas no herbário UFLA, do Departamento Biologia da UFLA, com número de registro 25.041.

Os grãos de pólen, em seguida, foram secos em estufa, a 60°C, por 72 horas, sendo, posteriormente, moídos em graal. Foram realizadas as seguintes determinações:

a) Grau de umidade

Pesaram-se, aproximadamente, 0,5 g de grãos de pólen moídos em placas de Petri de 7 cm previamente secas e taradas. Em seguida, foram secos em estufa regulada a $105\pm 3^\circ\text{C}$, por 24 horas, e os dados expressos em porcentagem, conforme método descrito pela Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1990).

b) Teor de amido

A determinação do amido foi realizada segundo metodologia descrita por Somogy, adaptada posteriormente por Nelson (1944).

d) Resíduo mineral fixo

Para a determinação de resíduo mineral fixo (cinzas total), foram pesados aproximadamente 2g de material desengordurado (em éter etílico) em cadinho de porcelana, o qual foi previamente incinerado, esfriado e tarado. O material foi carbonizado com posterior calcinação em mufla a 550°C, por 4 horas. A diferença entre o peso do conjunto e o peso do cadinho vazio expressou a quantidade de cinza total na amostra (AOAC, 1990).

d) Proteína bruta (N total)

Pesou-se 0,1g de material desengordurado, sendo a amostra transferida para tubo de digestão; adicionaram-se 1,5g de sulfato de potássio e 0,3g de sulfato de cobre, acrescentando-se, posteriormente, 3,0mL de ácido sulfúrico concentrado. Os tubos foram levados para o bloco digestor a 50°C, aumentando a temperatura lentamente até atingir 370°C. A mistura foi deixada no bloco

digestor até a solução apresentar cor verde-clara. Depois de esfriada, adicionaram-se 30mL de água destilada, agitando-se até dissolver o resíduo, estando o material pronto para a determinação do nitrogênio total. Na determinação do teor de nitrogênio total, utilizou-se o método de micro-Kjeldahl (AOAC, 1990), aplicando-se o fator 6,25 para o cálculo do teor de proteína bruta.

f) Teor de extrato etéreo

Pesaram-se 2g de amostra, transferindo quantitativamente para o cartucho de Soxhlet. A extração direta da amostra com éter etílico foi realizada em extrator contínuo de Soxhlet, utilizando-se reboiler previamente dessecado e tarado. Após a extração, o reboiler com o resíduo foi levado para a estufa a 65°C, por 24 horas, posteriormente pesados e os resultados expressos em percentagem (AOAC, 1990).

g) Teor de vitamina C

A determinação do teor de vitamina C foi feita pelo método colorimétrico com 2,4 dinitrofenilhidrazina, segundo Strohecker & Henning (1967) e os resultados expressos em mg de ácido ascórbico/100 g de amostra.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Potencial de fertilidade polínica em mamoneira

Na germinação do grão de pólen de *R. communis* das diferentes cultivares, observou-se valores inferiores no meio de cultura MC 4 para a cultivar Guarany e a silvestre, em que utilizou-se a sacarose a 30%, provavelmente pelo efeito do potencial osmótico. Contudo, valores superiores da germinação foram verificados no tipo silvestre e nas cultivares IAC-80 e BRS 149 Nordestina no meio de cultura MC2 (Tabela 1).

Segundo Galletta (1983), um dos fatores determinantes da integridade dos grãos de pólen é a manutenção do equilíbrio osmótico entre o meio de cultura e o conteúdo dos grãos de pólen. Supõe-se que tal equilíbrio possa ser determinado pela relação entre a concentração de sacarose e as concentrações de substâncias como ácido bórico e nitrato de cálcio, de forma que o excesso ou deficiência de qualquer desses componentes poderá promover o rompimento dos grãos de pólen.

Brewbaker & Kwack (1963) desenvolveram o meio de cultura para germinar grãos de pólen de espécies que apresentam dificuldades *in vitro*, com relação aos meios convencionais. Íons inorgânicos (Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ e Na^+) e boro são componentes adicionados e que estimulam e são considerados indispensáveis à germinação e ao crescimento do tubo polínico.

TABELA 1 Análise dos valores médios para o número de grãos de pólen germinados *in vitro* de *Ricinus communis* L. em diferentes meios de cultivo (MC) estabelecidos por Stanley & Linskens, 1974 e Brewbaker & Kwack, 1963, e modificados após o período de 24 horas de incubação.

Cultivares	MC1	MC2	MC3	MC4
Silvete (ruderal)	39,25 aA	58 aA	23,75 aB	7,00 bB
AL-Guarany 2002	28,25 aA	28,25 bA	18,5 aA	5,0 bB
Mirante	11,5 bB	8,5 cB	11,25 bB	32,25 aA
BRS-Nordestina	27,75aB	69,25 aA	23,5 aB	40,0 aB
IAC-80	28,75aB	70,5 aA	35,75 aB	41,0 aB

* Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo Teste de Scott Knott a 5% de significância; ** Letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo Teste de Skott Knott a 5% de significância. CV.:19.29%.

O desenvolvimento de métodos para determinar a viabilidade do pólen é útil para a análise do potencial de fertilização de uma espécie, permitindo realizar a avaliação prévia de genótipos quanto à sua capacidade de produzir frutos e sementes (Silva et al., 2000). Destaca-se que neste trabalho, conforme observado na Tabela 1, a cultivar IAC-80 apresentou viabilidade maior em todos os meios de cultivo testados, o que comprova certa potencialidade desta cultivar.

A viabilidade do pólen é um parâmetro de grande importância no estudo de plantas, pois, além de evidenciar a potencialidade reprodutora masculina da espécie, contribui em estudos taxonômicos, ecológicos e palinológicos, fornecendo informações básicas para a aplicação prática na conservação genética, bem como na agricultura, para o planejamento de algum tipo de melhoramento ou cultivo (Auler et al., 2006). Estudos preliminares sobre a viabilidade polínica com métodos de coloração foram feitos por Vargas et al. (2008), relatando altos índices de viabilidade, em torno de 90%, para genótipos cultivados no Rio Grande do Sul como as cultivares Cafelista e IAC-80, entre outras.

Yumbi et al. (2005) demonstraram que, para grãos de pólen de milho, meios de cultura contendo teor de sacarose entre 10% e 20% proporcionam maior germinação, sendo a concentração de 10% a mais indicada.

Pio et al. (2004) encontraram, em citros, quantidades de tubos polínicos soltos da estrutura do pólen na ausência do boro para todas as variedades testadas. O cálcio, assim como o boro, é indicado pelos autores como promotor da germinação e do alongamento do tubo polínico.

Apesar da alta viabilidade para duas cultivares, optou-se por trabalhar apenas com BRS-149 Nordestina, por se tratar de uma cultivar com potencial de exploração e adaptada ao clima da região sul de Minas Gerais.

5.2 Relação entre botão floral e estádios da microsporogênese e microgametogênese

Para a análise da proporção das estruturas observadas no processo de formação do pólen em relação às diferentes escalas de tamanho do botão floral houve interação significativa entre os fatores ($p < 0,05$). Os valores médios de proporção de estruturas encontrados, em função da escala e do tipo de pólen analisados demonstrados na Tabela 2, indicam que a proporção de grãos de pólen maduros foi significativamente maior nos botões florais (BF) com tamanhos de até 5,0 mm em relação às outras classificações. Maior proporção de meiócitos (Figura 2a) foi observada em botões florais com tamanhos inferiores a 2,9 mm, já a formação de tétrades e micrósporos (pólen uninucleado, Figura 2c) em botões florais com tamanhos de 4,9 até 3,0mm, grãos de pólen maduro foram observados em botões florais de 5,0-5,9 e maiores que 6 mm.

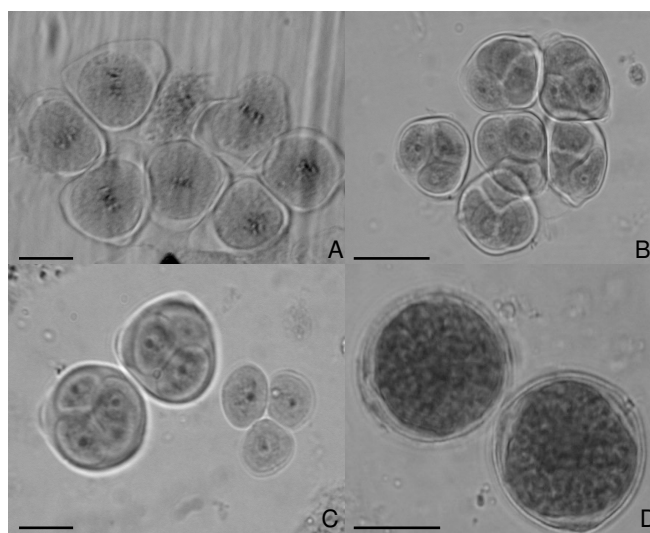


FIGURA 2 Gametogênese masculina de *R. communis* L. Meiócitos (A); tétrades (B); micrósporos (pólen uninucleado;seta) (C); e pólen maduro (D). Barras = 100 μ m (a, d), 20 μ m (b, c).

TABELA 2 Proporção de estruturas celulares da gametogênese, em função da escala do botão floral masculino (mm) e nas classificações celulares de *Ricinus communis* L.

Escala do diâmetro horizontal (mm) do botão floral.	Tipo de Pólen			
	P.Maduro	Micrósporo	Tétrade	Meiócito
6,0 \leq	1,00Aa	0,00Bb	0,00Bb	0,00Bb
5,0-5,9	0,97Aa	0,03Bb	0,00Bb	0,00Bb
4,0-4,9	0,37Ba	0,39Aa	0,10Bb	0,13Bb
3,0-3,9	0,20Ba	0,33Aa	0,30Aa	0,17Ba
$\geq 2,9$	0,00Cb	0,00Bb	0,06Bb	0,94Aa

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com um nível nominal de significância de 5%.

O estudo das estruturas reprodutivas destaca-se quando se trata da aplicação do conhecimento em técnicas de cultura de tecidos, pois a análise prévia caracterizando os diferentes estádios de desenvolvimento é um dos parâmetros determinante para o sucesso da propagação, o qual depende da regeneração de tecidos vegetais. A escolha da amostra utilizada para a realização

da propagação depende do conhecimento das potencialidades dos tecidos vegetais. Além disso, as substâncias reguladoras de crescimento também utilizadas nessas práticas interferem na formação das células e tecidos. Segundo Peters et al. (1999), as estruturas gaméticas, como os micrósporos unicleados, e sua fase antecessora em tétrade, são mais responsivas para a indução da androgênese *in vitro*, a partir da cultura de antera. Diante disto, este estudo da biologia floral fornece subsídio relevante para a aplicação da cultura de haplóide de mamoneira.

Numerosos estudos demonstram que os gametófitos respondem apenas em uma determinada etapa do seu desenvolvimento, sendo o estágio uninucleado o mais adequado para a maioria das espécies. Segundo Niizeki & Oono (1971), grãos de pólen no estágio anterior a tétrade, ou após o estágio binucleado, não respondem bem a cultura *in vitro*. Neste contexto, o estágio de desenvolvimento do botão floral está diretamente relacionado ao sucesso da metodologia para obtenção de haplóides e duplo-haplóides por meio da cultura de tecidos de anteras.

Segundo Pagliarini (2000), os eventos citológicos da gametogênese são controlados por um grande número de genes, que atuam desde a fase pré-meiótica até a pós-meiótica, e mutações nesses genes causam anomalias capazes de afetar a fertilidade das espécies.

Andrade et al. (1998) analisaram citologicamente quatro cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e em todos os genótipos houve associação entre os tamanhos dos botões florais e anteras apenas com estádios de desenvolvimento do micrósporo. Lauxen et al. (1995) relacionaram os estádios da microsporogênese a quatro intervalos pré-estabelecidos de comprimento de botão floral, em três cultivares brasileiras de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), e constataram a falta de sincronismo entre as anteras de um mesmo botão. No estudo com *Passiflora edulis flavicarpa*, foi verificado o parâmetro de relação

do tamanho da antera e de botão floral com as fases meióticas (Souza et al., 2002). Os estudos do botão floral para a mamona, neste trabalho, corroboram com os resultados encontrados pelos autores citados anteriormente.

A relação entre tamanho do botão floral e o estágio de desenvolvimento do grão de pólen tem sido buscada em várias espécies, principalmente como subsídio para estudos envolvendo microsporogênese e cultura de anteras (Willcox et al., 1990).

5.3 Aspectos anatômicos do botão floral masculino

O estudo da biologia floral de mamona foi realizado por Távora (1982), contudo não há descrição dos aspectos anatômicos, conhecimento este importante para estudos reprodutivos na espécie.

A inflorescência da espécie é do tipo panicular com flores em posições diferentes. Geralmente, na parte superior estão as femininas e, na parte inferior, as masculinas. A floração inicia-se no racemo principal e, após 10 a 12 dias dá-se início o florescimento do racemo de segunda ordem. Na espécie tanto as flores femininas como as masculinas são apétalas e são compostas por três ou cinco sépalas (Figura 3), sendo raro o aparecimento de flores hermafroditas (Távora, 1982).

As sépalas são revestidas interna e externamente por epiderme simples com cutícula espessa, cobrindo as paredes celulares periclinais externas. Na epiderme não há presença de tricomas (Figura 3).

O mesofilo parenquimático apresenta-se com células de formato variável e irregular (Figura 3). Feixes vasculares estão presentes, em detalhe da secção transversal da sépala, compostos por xilema e floema, distribuídos irregularmente (Figura 4).

Em *E. fulgens* as pétalas e sépalas apresentam epiderme simples e papilosa em algumas regiões, mesofilo homogêneo e sem especializações para

fotossíntese, conforme descrito para outras flores, incluindo aquelas de Orchidaceae. A vascularização é pouco desenvolvida, coerente com a efemeridade e o baixo metabolismo requerido por estes verticilos (Teixeira et al., 2004).

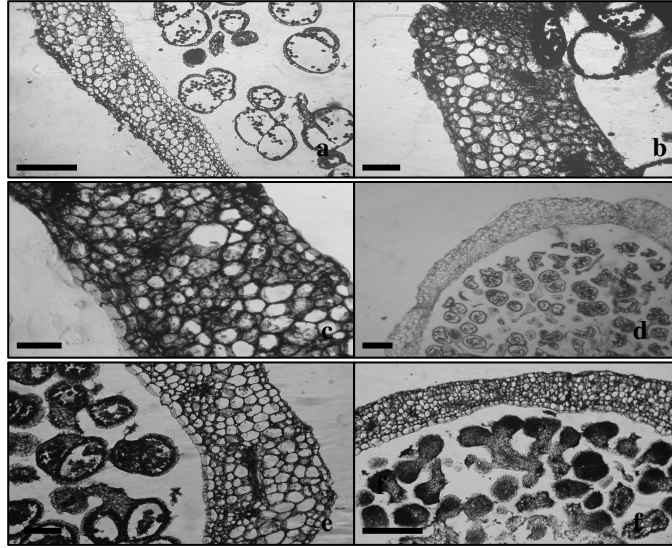


FIGURA 3 Detalhes do mesofilo das sépalas dos botões florais masculinos em diferentes fases do desenvolvimento (eixo longitudinal, mm). a= abertura do botão floral; b= > 6,0 mm; c=5,0-5,9 mm; d=4,0-4,9 mm; e= 3,0-3,9 mm; f=>2,9mm. Barras = 400 μ m (a, d, f), 100 μ m (b, c, e).

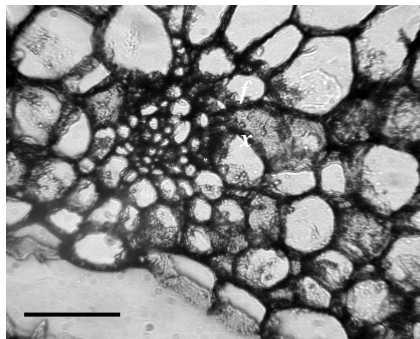


FIGURA 4 Detalhe anatômico da sépala em seção transversal (400x) no botão floral masculino com diâmetro de aproximadamente 3,0 a 3,9 mm. vf= feixe vascular; x= xilema; f = floema. p= parênquima; ep. int.= epiderme interna. (Br=100 μ m).

A técnica empregada na coloração dos cortes propiciou o acompanhamento da formação do botão floral com destaque para as anteras em desenvolvimento inicial sem a diferenciação dos tecidos internamente (Figura 5a) e maturação das anteras na antese (Figura 5f). No processo de deiscência da antera de mamona foram observadas mudanças estruturais na parede celular e influência das mudanças na umidade relativa. A única camada celular da antera foi composta por quatro tipos de células com base em forma e espessamento. O principal tipo de células presentes são células isodiamétricas lignificadas tangencialmente e nas paredes laterais (Bianchini & Pacini, 1996).

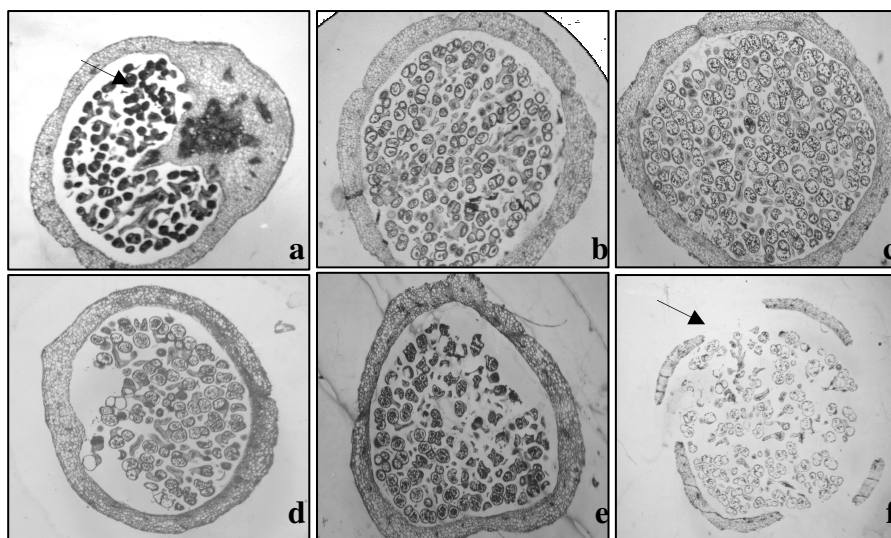


FIGURA 5 Desenvolvimento do botão floral (BF) masculino até o período de antese quando o eixo horizontal é superior a 6 mm. Escala em corte longitudinal BF menores que 2,9mm (a); e cortes transversais de BF 3,0-3,9mm (b); de BF 4,0-4,9mm (b); BF 5,0-5,9mm (d); BF 6,0≥ (e); e de BF aberto (seta) (f).

A antera diteca apresentou sacos polínicos com septo entre suas lojas, e na maturação dos grãos de pólen, cada saco polínico está envolvido por uma epiderme unisseriada e pelo endotécio (Figura 6b).

Anteras quando maduras revelam as seguintes zonas de tecidos: epiderme unisseriada, endotécio. Observou-se a formação e abertura do septo na antese para a liberação do grão de pólen (Figura 6a). Segundo Bianchini & Pacini (1996), analisando a deiscência explosiva da antera de mamona pode ser desencadeada por uma rápida desidratação da cutícula delgada das células, o que gera mudanças estruturais, forçando a separação das anteras no estômio. A pressão feita pela abertura do estômio causa nas paredes da antera próximo da região junto ao septo, forçando desta forma o lançamento do pólen.

Na antera madura verificou-se a formação do endotécio diferenciado na ausência do tapete e da camada mediana, apresentando pólen maduro no interior (Figura 6c). Semelhante ao observado por Mariath et al. (2003) referem-se sobre a possibilidade da epiderme da antera sofrer ruptura de suas células, permanecendo, neste caso, o endotécio como a camada celular mais externa da antera. Estudos histológicos das anteras com objetivo de aplicar e compreender o cultivo *in vitro* são prerrogativas destacadas por Rodrigues et al. (2004).

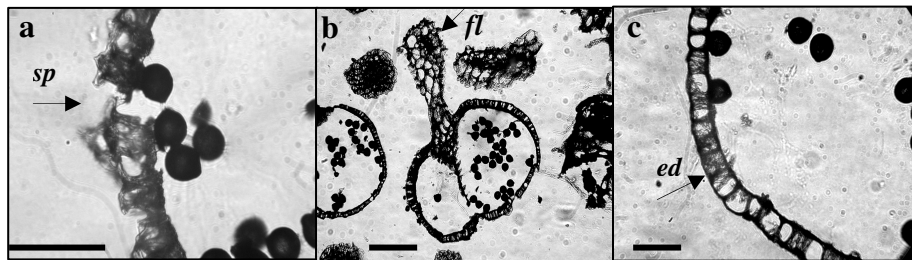


FIGURA 6 Antera madura. (A) região do septo na liberação dos grãos de pólen. (B) aspecto geral da antera e do filete. (C) Parede da antera e grãos de pólen. *sp*= septo, região estomial; *ed*= endotécio; *fl*: filete (Barras: (A) 50 μ m; (B) 100 μ m; e (C) 40 μ m) .

5.4 Composição química do pólen

A composição química do pólen varia com a origem floral, condições ambientais, climáticas, geográficas, idade e estado nutricional da planta e das estações do ano (Andrade, 1996). O pólen contém substâncias nutricionais como carboidratos, proteínas, lipídeos, vitaminas, macro e microelementos.

Na Tabela 3 observou-se que os grãos de pólen apresentam um conteúdo alto de água, aproximadamente 46,03%, e a porcentagem de proteína na amostra de pólen foi 47,01%, neste trabalho.

Segundo Barreto et al. (2000), foi encontrado um teor menor de proteínas de pólen-apícola, subproduto comercializado, extraído de colmeias e que é composto de aglutinações feitas pelas abelhas dos grãos de pólen de espécies. Em geral tem valor nutricional maior que o pólen *in natura*, extraído diretamente da planta. O pólen-apícola é conhecido também por “pão de abelha”, servindo de alimento às colmeias. A produção de mel, em condição experimental, com *A. mellifera* que coletava néctar e pólen em áreas de cultivo de mamoneira aumentou significativamente 20,1% quando comparadas à produção de mel em regiões silvestres.

As porcentagens de cinzas em amostras do pólen apresentaram valor de 4,66%, expressivamente superior aos valores encontrados por Sampaio (1991) (1,6 a 3,6%) para pólen-apícola coletado no estado do Paraná.

Os resultados verificados para extrato etéreo apresentaram aproximadamente, valor médio de 3,57%. Observou-se, ainda, que os grãos de pólen apresentaram, como fonte de reserva, o amido, que compreende aproximadamente 2,96g para 100g dos constituintes totais. O teor de ácido ascórbico de 12,52 mg/ 100g pode ser considerado alto, pois o referencial de pólen-apícola, o valor nutricional indicado é, em média, de 15,2 mg/100g para consumo humano (Lengler, 2002).

Possivelmente devido ao baixo teor de extrato etéreo, os grãos de pólen da espécie não podem ser classificados como oleaginosos, sendo classificados como proteináceos devido ao alto teor de proteína bruta (N total) próximo a 47,01%.

TABELA 3 Valores médios em base seca dos constituintes de grãos de pólen de *Ricinus communis* L. silvestre.

Contituíntes	Base seca
Grau de umidade	46,03%
Proteína Bruta	47,01 %
Cinza	4,66 %
Extrato etéreo	3,57%
Amido	2,96 (g/100g)
Vitamina C (ácido ascórbico)	12,52 (mg/100g)

O teor elevado de proteínas também pode contribuir para a redução do potencial de armazenamento, devido à elevada afinidade dessa substância com a água (Marcos Filho, 2005).

O pólen carregado pelas abelhas no processo de polinização representa a maior fonte de proteínas, lipídeos, minerais e vitaminas para a colônia de *Apis mellifera* (Singh et al., 1999), devido à sua grande importância por agregar valor nutricional ao mel. O cultivo da mamona é comprovadamente importante fonte de néctar e pólen, para a exploração apícola e para a produção de mel com qualidade (Milfont, 2007). Por isso, destaca-se neste trabalho a composição química dos grãos de pólen de *R. communis*.

Pólen-apícola coletado em colmeia de abelhas para ser comercializado no Brasil deve ter os seguintes requisitos físico-químicos: umidade máxima de 30%; cinzas com máximo de 4%; lipídeos com mínimo de 1,8%, e proteínas com mínimo de 8% (Brasil, 2001). O chamado pólen-apícola possui, em geral, maior valor nutricional do que o pólen *in natura*, porém esta afirmação não foi

comprovada neste trabalho, pois a composição química do pólen de mamona apresentou maior valor nutricional.

Os resultados deste trabalho sugerem que o pólen *in natura* de mamona apresenta altos valores nutricionais, tendo os requisitos básicos físico-químicos para compôr o polen-apícola comercializado no Brasil.

6 CONCLUSÕES

As cultivares IAC-80 e BRS-149 Nordestina apresentam viabilidade polínica superior no meio MC2.

De acordo com a análise citológica realizada neste estudo, o tamanho do botão floral pode ser usado como parâmetro indicativo para fases da gametogênese.

A escala sugerida neste trabalho para o comprimento do botão floral masculino de *Ricinus communis* L. pode ser correlacionada com os estádios de micrósporo e grão de pólen.

A técnica empregada para coloração anatômica propiciou o acompanhamento da formação do botão floral com destaque para as anteras em desenvolvimento até a maturação das anteras na antese.

O pólen de mamona pode ser classificado como proteináceo, devido ao elevado teor de proteína. O pólen *in natura* de mamona apresenta altos valores nutricionais, apresentando potencial para a exploração apícola no Brasil.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, P. B.; AMARAL, M. T.; ISABEL, P.; CARVALHO, J. C. M. F.; SEABRA, R. M.; CUNHA, A. P. Physicochemical attributes and pollen spectrum of Portuguese heather honeys. **Food Chemistry**, London, v. 66, n. 4, p. 503-510, 1996.

ANDRADE, L. M. C. O. **Otimização de técnicas de cultura de tecidos para o cafeeiro (*Coffea arabica*)**. 1998. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS. **Methods of the association of official analitical chemists**. 15.ed. Washington, 1990. 684 p.

AULER, N. M. F.; BATTISTIN, A.; REIS, M. S. Número de cromossomos, microsporogênese e viabilidade do pólen em populações de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 55-63, 2006.

BARRETO, L. M. R. C.; FUNARI, S. R. C.; ORSI, R. O. Perfil protéico do pólen coletado por *Apis mellifera* (Híbrida africanizada) no período outono-inverno no apiário do Centro de Estudos Apícolas da Universidade de Taubaté. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 13., 2000, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: CBA, 2000. p. 1-5.

BIANCHINI, M.; PACINI, E. Explosive anther dehiscence in *Ricinus communis* L. involves cell wall modifications and relative humidity. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 157, n. 6, p. 739-745, Nov. 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Instrução Normativa n. 3**, 19 de janeiro de 2001. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de apitoxina, de cera de abelha, de geléia real liofilizada, de pólen apícola, de própolis e de extrato de própolis. 2001. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/das/dipoa>>. Acesso em: 05 jan. 2009.

BREWBAKER, J. L.; KWACK, B. H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 50, n. 9, p. 859-865, 1963.

FERREIRA, D. F. **SISVAR – Sistema de análise de variância para dados balanceados, versão 4.0**. Lavras: UFLA, 2000.

GALLETTA, G. J. Pollen and seed management. In: MOORE, J. N.; JANICK, J. (Ed.). **Methods in fruits breeding**. Indiana: Purdue University, 1983. p. 23-47.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. 131 p.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523 p.

LAUXEN, M. S.; KALTCHUK-SANTOS, E.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Relação entre tamanho de botão floral e o estágio de desenvolvimento do grão de pólen em soja (*Glycine max* (L.) Merr.). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 41., 1995, Caxambu. **Programa e Resumos...** Caxambu: SBG, 1995. p. 312-314.

LEGLER, S. **Pólen apícola**. 2.ed. Santa Maria: Confederação Brasileira de Apicultura, 2002. 18 p.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p.

MARIATH, J. E. A.; SANTOS, R. P.; BITTENCOURT JR., N. S. Flor. In: APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Ed.). **Anatomia vegetal**. Viçosa, MG: Ed. Universidade Federal de Viçosa, 2003. p. 329-373.

MILFONT, M. O. **O potencial da mamoneira (*Ricinus communis*) para exploração apícola**: produção, toxidez e qualidade de mel. 2007. 90 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MONTEIRO, J. V. **Produtividade da mamoneira ‘AL-Guarany 2002’ (*Ricinus communis* L.) em função de diferentes arranjos populacionais**. 2005. 89 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

NELSON, N. A. Photometric adaptation of somogy method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 153, n. 1, p. 375-384, 1944.

NIIZEKI, H.; OONO, K. Rice plants obtained by anther culture. In: TABATA, M.; YAMAMOTO, H.; HIRAKAWA, N. **Les cultures de tissue de plantes**. Paris: Colloques Int. CNRS, 1971. p. 251-257.

PAGLIARINI, M. S. Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 4, p. 997-1002, 2000.

PETERS, J. A.; BOBROWSKI, V. L.; ROSINHA, G. M. S. Produção de haplóides e duplohaplóides. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1999. v. 1, p. 569-612.

PIO, L. A. S.; SANTOS, F. C.; RUFINI, J. C. M.; RAMOS, J. D.; ARAÚJO, A. G. Germination *in vitro* of citrus pollen under different concentrations of calcium and Boron. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 3, p. 293-296, jul./set. 2004.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing** reference index version 2.8.0. Vienna, Austria: Foundation for Statistical Computing, 2008. Pacote estatístico R Software livre UFG. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 16 nov. 2008.

RIZZARDO, R. A. G. **O papel de *Apis mellifera* L. como polinizador da mamoneira (*Ricinus communis* L.): avaliação de eficiência de polinização das abelhas e incremento de produtividade da cultura**. 2007. 78 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

RODRIGUES, L. R.; MARIATH, J. E. A.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Cultura de anteras x cultura de micrósporos isolados: dez razões para uma nova abordagem da embriogênese do micrósporo. **Revista Ciência Biotecnologia & Desenvolvimento**, Brasília, v. 33, p. 51-54, jul./dez. 2004.

SAMPAIO, E. A. B. **Caracterização do pólen apícola processado comercial e armazenado na colmeia-pão de abelhas, de algumas localidades do Paraná**. 1991. 118 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SILVA, A. C. T. F.; LEITE, I. C.; BRAZ, L. T. Avaliação da viabilidade do pólen como possível indicativo de tolerância a altas temperaturas em genótipos de tomateiro. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 12, p. 156-165, 2000.

SILVA, W. S. D. **Mapeamento de variáveis mercadológicas para a produção de biodiesel a partir da mamona na Região Nordeste do Brasil**. 2006. 114 p. Dissertação (Mestrado Agronomia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SINGH, S.; SAINI, K.; JAIN, E. K. L. Quantitative comparison of lipids in some pollens and their phagostimulatory effects in honeybees. **Journal of Apicultural Research**, Falmer, v. 38, n. 1/2, p. 87-92, 1999.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1209-1217, nov./dez. 2002.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. **Pollen: biology, biochemistry and management**. Berlin: Springer-Verlag, 1974. 307 p.

STROHECKER, R.; HENNING, H. M. **Analises de vitaminas: métodos comprovados**. Madrid: Paz Montalvo, 1967. 428 p.

TÁVORA, F. J. A. F. **A cultura da mamona (*Ricinus communis*)**. Fortaleza: EPACE, 1982. 111 p.

TEIXEIRA, S. P.; BORBA, E. L.; SEMIR, J. Lip anatomy and its implications for the pollination mechanisms *Bulbophyllum* species (Orchidaceae). **Annals of Botany**, London, v. 93, n. 5, p. 499-505, May 2004.

VARGAS, D. P.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, G. F.; CHALFUN-JUNIOR, A.; BOBROWSKI, V. L.; PINTO, M. S. Pollen ontogeny associated with flower bud and anther size of Castor Bean. In: INTERNACIONAL CONGRESS ON SEXUAL PLANT REPRODUCTION, 20., 2008, Brasília. **Anais...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. p. 210-211.

WEISS, E. A. Castor. In: _____. **Oil seed crops**. London: Longman, 1983. p. 31-99.

WEISS, E. A. Castor. In: _____. **Oil seed crops**. 2.ed. Oxford: Blackwell Science, 2000. p. 13-52.

WILLCOX, M. C.; REED, S. M.; BURNS, J. A.; WYNNE, J. C. Microsporogenesis in peanut (*Arachis hypogaea*). **American Journal of Botany**, Ohio, v. 77, n. 10, p. 1257-1259, 1990.

YOUMBI, E.; THE, C.; TEDJACNO, A. Conservation of the germination capacity of pollen grains in three varieties of maize (*Zea mays* L.). **Grana**, Stockholm, v. 44, n. 3, p. 152-159, Sept. 2005.

CAPÍTULO 3

CALOGÊNESE EM ANTERAS DE MAMONA cv. BRS-149 NORDESTINA

1 RESUMO

A mamona (*Ricinus communis* L.) vem se destacando, no cenário brasileiro, por possuir propriedades medicinais e grande potencial para produção de biodiesel. É uma oleaginosa de alto valor econômico por apresentar inúmeras possibilidades de aplicação na área industrial e medicinal. As iniciativas para explorar o potencial dessa espécie ainda são incipientes, sobretudo, para estabelecer cultivares viáveis comercialmente no País. A busca por linhagens duplo-haplóides é valiosa para análises genéticas e pesquisas básicas de seleção. Esse trabalho teve por objetivo estudar a indução de calos haplóides a partir do cultivo de anteras. Para tanto, avaliou-se o efeito de diferentes antioxidantes PVP (0, 100, 200, 400, 800 mg L⁻¹) e ácido ascórbico (0, 50, 100, 200 e 400 mg L⁻¹) na indução dos calos. Para a indução dos calos, utilizaram-se diferentes reguladores de crescimento, 2,4-D (0,0; 2,0; 4,0; 10,0 e 20,0 mg L⁻¹), TDZ, Picloram e ANA nas concentrações de 0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹, separadamente, e avaliou-se ainda a adição do nitrato de prata combinado com 2,4-D ao meio de cultivo. Como análise complementar, foram feitas análises citológicas utilizando Carmim-acético e Azul de Evans. Conclui-se que o ácido ascórbico na concentração de 200 mg L⁻¹ foi efetivo como antioxidante na indução de calos de anteras de *R.communis*. A concentração de 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D adicionada ao meio de cultura MS proporcionou maior massa fresca (g) de calos. Na análise citológica, observou-se células isodiamétricas coradas fortemente com carmim-acético observadas em calos induzidos com a auxina, 2,4-D, evidenciando um potencial embriogênico. Os reguladores de crescimento ANA, TDZ e Picloram induziram a formação de calos. Contudo, a maior matéria fresca pôde ser obtida com a utilização de 3,0 mg L⁻¹ do Picloram. A adição de nitrato de prata no meio de cultura é eficiente na formação de calos não oxidados.

Palavras-chave: duplo-háploide, calos, *Ricinus communis*.

2 ABSTRACT

The castor bean (*Ricinus communis* L.) has gained importance in the Brazilian scenario due to its medicinal properties and potential for production of biodiesel. It is an oleaginous species of high economic value since it presents many possibilities for application in the industry and medical areas. Initiatives to explore the potential of this species are reduced, especially regarding the establishment of viable commercial cultivars. The search for double-haploid lines is valuable for genetic analysis and basic selection research. The objective of this work was study the induction of haploid callus obtained from anthers. Thus, the effect of the antioxidants PVP (0, 100, 200, 400, 800 mg L⁻¹) and ascorbic acid (0, 50, 100, 200 and 400 mg L⁻¹) on the induction of callus was evaluated. For callus induction, the following growth regulators, 2,4-D (0.0, 2.0, 4.0, 10.0 and 20.0 mg L⁻¹), TDZ, NAA and picloran in concentrations of 0.0, 1.0, 2.0, 3.0 and 4.0 mg L⁻¹, separately were also evaluated as well as the addition of silver nitrate combined with 2,4-D on the cultivation medium. Additional cytological analyses were also performed using carmine-acetic and Evans Blue dyes. Results show that the use of 200 mg L⁻¹ ascorbic acid was effective as an antioxidant in the induction of callus from *R. communis* anthers. The concentration of 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D added to the MS culture medium provided higher calli fresh weight (g). Isodiametrical cells strongly stained with carmine-acetic were observed in calli induced with 2,4-D, indicating an embryogenic potential. NAA, picloram and TDZ induced the formation of callus. However, the largest fresh weight could be obtained with the use of 3.0 mg L⁻¹ picloram. The addition of silver nitrate in the culture medium is effective in the formation of non oxidized callus.

Key words: duplo-haploid, callus, *Ricinus communis*.

3 INTRODUÇÃO

A mamoneira pertence à família Euphorbiaceae, na qual o gênero *Ricinus* é monoespecífico, representa atualmente uma importante espécie na indústria bioenergética e medicinal. Na mamona se observa grande variabilidade para caracteres morfológicos e agrônômicos, gerando a possibilidade de seleção por melhoramento genético. Contudo, até o momento poucas cultivares foram liberadas pelos programas de melhoramento. Diante disso, pequenos produtores ainda se utilizam de variedades locais pouco adaptadas (Azevedo & Lima, 2001).

Atualmente o foco do melhoramento tem buscado maior produtividade, precocidade, porte, grau de deiscência, adaptação de colheita mecânica ou manual (Nóbrega, 2008). Nos últimos anos, a cultura da mamona tornou-se importante em muitas regiões do Brasil, como nas regiões de clima seco. No Brasil, para este clima, foi lançado, pela Embrapa Algodão, a cultivar BRS 149 Nordestina, uma cultivar adaptada à região semi-árida e com alto teor de óleo (48,9%) (Pinheiro et al., 2008).

Com a intenção de acelerar drasticamente a obtenção de novas cultivares, a cultura de anteras apresenta-se como uma ferramenta de grande utilidade, principalmente para estudos genéticos e de obtenção de linhagens homozigóticas puras, substituindo as inúmeras gerações de autofecundação necessárias. Para obtenção do indivíduo fértil é necessária a duplicação dos cromossomos, que pode ocorrer de maneira espontânea ou ser induzidos com o uso de colchicina (Bajaj, 1984).

Por meio do cultivo *in vitro* de anteras ou de gametófitos isolados (micrósporos) de algumas espécies vegetais, é possível interromper o desenvolvimento microgametofítico e ativar divisões celulares atípicas, as quais podem originar esporófitos com a mesma constituição genética do gametófito e

com variados níveis de ploidia, caracterizando a ocorrência da androgênese (Rodrigues et al., 2004).

Neste contexto, os duplo-haplóides podem ser obtidos por androgênese direta ou por androgênese indireta. No entanto, é mais freqüente a obtenção destas plantas através da cultura de anteras pelo método indireto, nas etapas: (1) formação de calos a partir de anteras; (2) formação de gemas ou embrióides a partir de calos e (3) obtenção de plantas a partir das gemas ou de embriões somáticos. A primeira etapa é essencial e deve-se considerar alguns fatores como o genótipo, o meio de cultivo e o estágio de desenvolvimento do grão de pólen, que pode ser correlacionado com o tamanho do botão floral em muitas espécies (Bobrowski et al., 1995; Peters et al., 1999). Para mamoneira obtiveram-se informações sobre a biologia floral previamente, conforme descrito no Capítulo 3.

Uma série de fatores químicos, físicos e genéticos interagem de forma complexa, influenciando tanto na indução do embrião haplóide, como na organogênese direta ou indireta. Para as etapas críticas da indução da androgênese, têm-se o genótipo e as condições fisiológicas da planta doadora, o estágio de desenvolvimento dos micrósporos, o tipo de pré-tratamento aplicado aos botões florais e a composição do meio de cultura (Peters et al., 1999).

No Brasil, *R. communis* ainda apresenta poucos progressos com relação à cultura de anteras, com trabalhos preliminares e que não expressam o potencial androgenético dos genótipos existentes, com estudos para a cultivar IAC-80 (Vargas et al., 2006).

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de estudar o efeito da aplicação de antioxidantes e de diferentes concentrações de reguladores de crescimento no processo da calogênese *in vitro* a partir de anteras de *Ricinus communis* L.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material botânico

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Setor de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras.

Sementes de *Ricinus communis* L. cultivar BRS-149 Nordeste fornecidas pela EMBRAPA Algodão- Campina Grande, PB, foram germinadas e mantidas em casa de vegetação até o período de florescimento do primeiro racemo, no Setor de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Minas Gerais.

4.2 Desinfestação dos botões florais

Para o estabelecimento *in vitro* inicialmente os botões florais coletados permaneceram armazenados a 4°C por 24 horas. Posteriormente, o material foi desinfestado em câmara de fluxo laminar. Os botões florais foram imersos em álcool 70% por 30 segundos, e transferidos para hipoclorito de sódio a 1,5 % de cloro ativo, por 15 minutos. Posteriormente, foi realizada a tríplice lavagem em água destilada e autoclavada. Para todos os meios de cultura testados utilizou-se o botão floral com escala determinada de 3,0-3,9 e 4,0-4,9 mm de diâmetro do eixo horizontal, medido com auxílio de um paquímetro digital (marca Vonder®, com precisão de 0,05 mm), para as fases de tétrades e micrósporos estabelecidas no Capítulo 3.

4.3 Efeito de diferentes concentrações de PVP e ácido ascórbico

Após a desinfestação, as anteras provenientes de botões florais foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962), com 3% de sacarose, solidificado com 0,6% de ágar, e suplementado com 1 mg L⁻¹ de 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético), e diferentes concentrações de

polivinilpirrolidona - PVP (100, 200, 400, 800 mg L⁻¹). Para o teste utilizando ácido ascórbico como antioxidante, as anteras foram extraídas e colocadas em placas de petri contendo a solução nas concentrações (50, 100, 200 e 400 mg L⁻¹), permanecendo por cerca de 5 minutos até inoculação em meio de cultura suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D.

Para a análise do PVP e do ácido ascórbico, os experimentos foram instalados segundo um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 10 repetições em que os tratamentos constituíam-se de cinco concentrações de PVP e cinco de ácido ascórbico. Foram medidas as seguintes variáveis: oxidação e formação de calos.

A análise estatística foi realizada de acordo com o delineamento experimental por meio do pacote estatístico R (R Development Core Team, 2008). O modelo estatístico que descreve as observações é dado por:

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij},$$

em que:

y_{ij} é o valor da variável dependente na j-ésima repetição que recebeu o i-ésima concentração de PVP ou ac. ascórbico, com $k = 1, \dots, r$;

μ é uma constante inerente a cada observação;

α_i é o efeito do i-ésima concentração de PVP ou de ac. ascórbico com $i = 1, \dots, 6$;

ε_{ij} é o erro experimental associado à parcela, independente e identicamente distribuído de uma Normal com média zero e variância σ^2 .

Os dados de oxidação e formação de calos caracterizam-se por apresentar distribuição binomial (presença ou ausência da característica) sendo utilizada como preditor linear (η) a função de ligação logística, dada por:

$$\eta = \ln\left(\frac{\mu_i}{m_i - \mu_i}\right).$$

Os preditores lineares foram caracterizados por um modelo de acordo o delineamento experimental, dado por

$$\eta = \nu + \alpha_i,$$

4.4 Efeito do 2,4-D na indução de calos de anteras

As anteras extraídas foram mantidas em placas de Petri com solução de ácido ascórbico 200 mg L⁻¹, sendo, logo em seguida, inoculadas em tubos de ensaio contendo meio MS, com 3% de sacarose, e suplementado com 2,0; 4,0; 10,0 e 20,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, e na ausência do regulador (controle) solidificados com ágar a 0,6%.

O experimento foi instalado segundo um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 10 repetições, em que os tratamentos constituíam-se de cinco concentrações de 2,4-D. Foram medidas as seguintes variáveis: formação de calos e peso fresco (g).

A análise estatística foi realizada de acordo com o delineamento experimental por meio do pacote estatístico R (R Development Core Team, 2008).

Os dados da formação de calos caracterizam-se por apresentar distribuição binomial (presença ou ausência da característica) sendo utilizada como preditor linear (η) a função de ligação logística, dada por:

$$\eta = \ln\left(\frac{\mu_i}{m_i - \mu_i}\right).$$

O preditor linear foi caracterizado por um modelo de acordo o delineamento experimental, dado por

$$\eta = \nu + \alpha_i + \beta_j + \delta_k + \alpha\beta_{ij} + \beta\delta_{jk} + \alpha\delta_{ik} + \alpha\beta\delta_{ijk}$$

4.4.1 Análise citológica dos calos

Para caracterização do potencial embriogênico dos calos formados foi feita uma coleta de cinco tubos de ensaio ao acaso de cada tratamento, considerada amostra composta.

Uma porção de calo foi retirada de cada tubo, submetidas à leve maceração com o auxílio de um bastão de vidro sob vidro de relógio. Após a maceração, foram adicionadas três gotas do corante Azul de Evans 0,1%, no qual permaneceu em reação por 30 segundos. Após esse período, o material foi centrifugado em água destilada para retirar o excesso do corante. Posteriormente, foi adicionado Carmim-acético 2%, no qual permaneceu em reação por três minutos. Por fim, o excesso de corante foi retirado com uma lavagem em água destilada. Logo após, a massa celular foi acomodada sob lâmina e coberta com lamínula. Procedeu-se a visualização em microscópio de luz (Olympus®) e análise pelo método de varredura em aumentos de 10 e 40 vezes.

4.5 Efeito dos reguladores de crescimento: ANA, Picloram e TDZ na indução de calos androgênicos

As anteras extraídas foram mantidas em placas de Petri com solução de ácido ascórbico 200 mg L^{-1} , sendo, logo em seguida, inoculadas em tubos de ensaio contendo MS, com 3% de sacarose, e suplementado com 1,0; 2,0; 3,0 e $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA, Picloram ou TDZ, isoladamente, e na ausência de regulador de crescimento (controle), com pH ajustado para 5,8. Foram solidificados com 0,6% de ágar e autoclavada a 120°C , durante 20 minutos.

O experimento foi instalado segundo um delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições, em que os tratamentos constituíam-se de três reguladores em quatro concentrações, e do controle. Foram avaliadas as seguintes variáveis: formação de calos e peso fresco dos calos.

A análise estatística foi realizada de acordo com o delineamento experimental por meio do pacote estatístico R (R Development Core Team, 2008).

4.6 Efeito de nitrato de prata na indução de calos androgênicos

As anteras extraídas foram mantidas em placas de Petri com solução de ácido ascórbico 200 mg L⁻¹, sendo, logo em seguida, inoculadas em tubos de ensaio contendo B5 (Gamborg et al., 1968), com 30 g L⁻¹ de sacarose, e suplementado com 2,4-D (2,0 mg L⁻¹) e nitrato de prata-AgNO₃, (20 mg L⁻¹), testou-se também a ausência do suplemento. Os meios foram solidificados com 0,6% de ágar, sendo o pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos, totalizando cinco tratamentos.

O experimento foi instalado segundo um delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições, em que os tratamentos constituíam-se de duas concentrações do regulador 2,4D, duas concentrações de nitrato de prata. Foi avaliada a formação de calos, o peso fresco dos calos formados, e o aspecto qualitativo de coloração dos calos, classificados nas seguintes categorias: 0= ausência de calos 1= calo branco; 2= marrom; 3= amarelo; 4=verde.

A análise estatística foi realizada de acordo com o delineamento experimental por meio do pacote estatístico R (R Development Core Team, 2008). O modelo estatístico que descreve as observações é dado por:

$$y_{ijk} = \nu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ijk},$$

em que:

y_{ijk} é o valor da variável dependente na k-ésima repetição que recebeu o i-ésima concentração do regulador 2,4D e j-ésima concentração de nitrato de prata, com $k = 1, \dots, r$;

ν é uma constante inerente a cada observação;

α_i é o efeito do i-ésima concentração do regulador 2,4D, com $i = 1,2$;

β_j é o efeito da j-ésima concentração de nitrato de prata, com $j = 1,2$;

$\alpha\beta_{ij}$ é o efeito da interação entre o i-ésima concentração do regulador 2,4D e a j-ésima concentração de nitrato de prata;

ε_{ijk} é o erro experimental associado à parcela, independente e identicamente distribuído de uma Normal com média zero e variância σ^2 .

Os dados de presença e ausência de calo caracterizam-se por apresentar distribuição binomial (presença ou ausência da característica) sendo utilizada como preditor linear (η) a função de ligação logística, dada por:

$$\eta = \ln\left(\frac{\mu_i}{m_i - \mu_i}\right).$$

Como os dados de cor têm a estrutura categorizada, a análise estatística foi realizada utilizando-se a regressão logística multinomial.

O preditor linear foi caracterizado por um modelo de acordo com o delineamento experimental.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Efeito dos antioxidantes: PVP e ácido ascórbico

Para a análise de Deviance da oxidação dos calos não houve efeito significativo para as diferentes concentrações do antioxidante PVP (Tabela 1). Os resultados para a formação de calos, indicados na Tabela, demonstram que o efeito das concentrações do PVP não foi significativo.

TABELA 1 Análise de Deviance para a oxidação (FO) e formação de calos (FC) segundo as diferentes concentrações de PVP em cultivo *in vitro* de anteras de *R.communis* L.

Fonte de variação	G.L.	Deviance (FO)	Valor-p (FO)	Deviance (FC)	valor-p (FC)
Concentração	4	10,008	0,061	3,7911	0,0740
Erro	45	57,293		13,0033	

Resultados diferentes foram observados para a cultura de anteras de *Coffea arabica* L. Adição de PVP ao meio de cultura aumentou significativamente a indução de calos, atingindo a máxima calogênese na dosagem de 1,8 mM (Pasqual et al., 2002). Para *Inga vera* a concentração mais eficiente foi a de 0,9 mM (Stein et al., 2007).

Segundo Stein et al. (2007), os fenóis podem ser absorvidos pelo PVP por meio de ligações de hidrogênio que previnem a oxidação e a polimerização. No presente trabalho, o uso de PVP não foi eficiente, pois se observou o escurecimento de algumas anteras antes mesmo da indução dos calos, independentemente da concentração utilizada.

Para a análise da oxidação dos calos, houve efeito significativo das concentrações do ác. ascórbico usadas ($p=0,0030$). Os valores médios, observados e estimados, da proporção de calos oxidados, diminuíram

significativamente, evidenciando a influência da concentração deste antioxidante (Figura 1).

Dentre os diversos antioxidantes usados na indução de calos, o ácido ascórbico tem sido o mais eficiente para várias espécies. Resultados semelhantes foram obtidos por Gupta (1986), para *Musa* sp., em que este antioxidante, adicionado ao meio de cultura, foi mais efetivo quando comparado ao uso do ácido cítrico e do carvão ativado, na concentração de 25 mg L⁻¹.

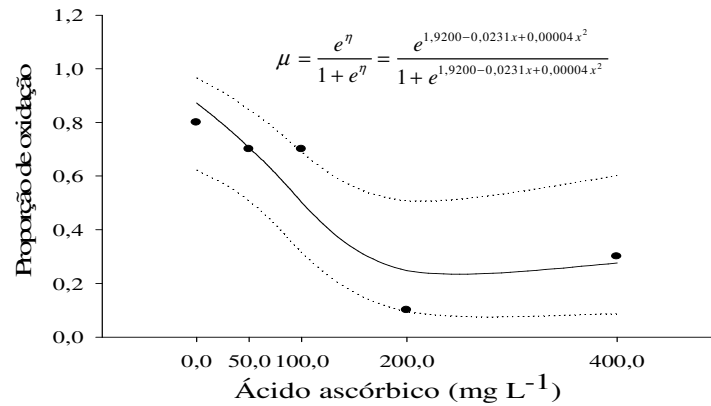


FIGURA 1 Valores médios e estimados da proporção de oxidação em função das concentrações de ácido ascórbico. As linhas pontilhadas são os intervalos de confiança da regressão.

Para a análise da formação dos calos induzidos após imersão das anteras em ácido ascórbico ($p=0,0740$) observou-se que o efeito foi significativo para as concentrações do antioxidante. A formação de calos também foi afetada significativamente pelo uso do ácido ascórbico, indicando a maior proporção de calos induzidos nas maiores concentrações de 200 e 400 mg L⁻¹ (Figura 2).

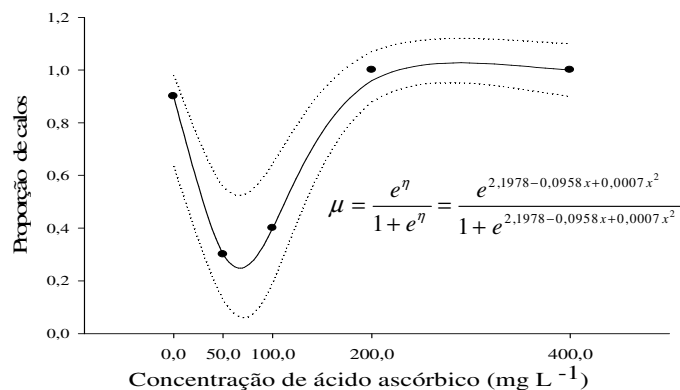


FIGURA 2 Valores médios e estimados da proporção de calos formadas em função das concentrações de ácido ascórbico. As linhas pontilhadas são os intervalos de confiança da regressão.

Corroborando com os resultados obtidos, Ferreira (2003), com as concentrações semelhantes às utilizadas, obteve o menor número de explantes oxidados utilizando a solução de 100 mg L⁻¹ de ácido ascórbico em explantes de *Dedranthema grandiflorum* 'Funny Pynk'. Melo et al. (2001) constataram que esta mesma solução foi a mais eficiente para guarirrobeira (*Syagrus oleraceae*). Foram encontrados altos níveis de oxidação mesmo com a adição de carvão ativado ao meio de cultura de inflorescências de bananeira (*Musa ssp.*) (Alloufa et al., 2002). Segundo Pasqual et al. (2002), as substâncias antioxidantes agem pela remoção do oxigênio de outras moléculas (varredor de peróxido de hidrogênio).

5.2 Efeito do 2,4-D na indução de calos androgênicos

Houve efeito significativo entre as concentrações de 2,4-D utilizadas ($p < 0,0001$). Na análise de regressão da proporção de calogênese verificou-se a completa formação independentemente da concentração do regulador de crescimento (Figura 3).

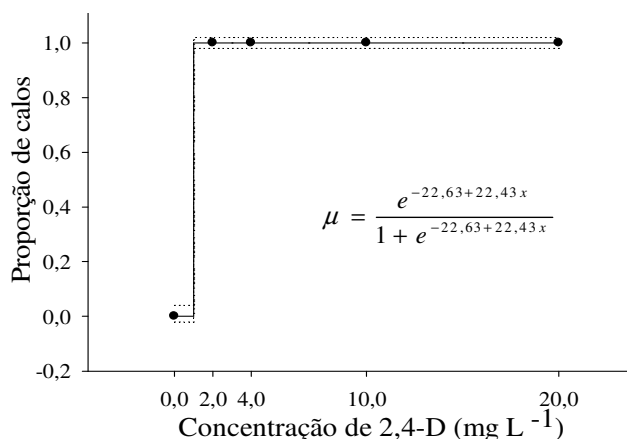


FIGURA 3 Valores médios (pontos) e estimados (linha cheia) da proporção de calos em função das concentrações de 2,4D. As linhas pontilhadas são os intervalos de confiança da regressão.

De acordo com Xu & Bewley (1992), as auxinas, em particular o ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D), são importantes na indução de calos e de células embriogênicas. Grattapaglia & Machado (1990) descreveram, na indução da calogênese, o uso do meio com altas concentrações de auxinas, sendo 2,4-D um dos reguladores de crescimento mais eficazes na indução de calos (Ammirato, 1983).

Segundo Ball et al. (1993), experimentos de calogênese em anteras de *Triticum aestivum* demonstram que o 2,4-D é mais efetivo do que o ácido indol acético (AIA). Anteras de *Cucumis sativus* L. cv. Calypso, inoculadas em meio B5, completado principalmente com 2,5 µM de 2,4-D, desenvolveram calos e embriões globulares em 4 semanas.

Na análise de variância do peso fresco dos calos formados verificou-se que houve efeito significativo para as concentrações de 2,4-D. Porém, a proporção do peso fresco foi influenciada significativamente pelo aumento da concentração do regulador de crescimento, com uma redução que possivelmente indica o efeito negativo da alta concentração deste (Figura 4). Comportamento

semelhante foi observado em calos de candeia (*Eremanthus erythropappus*) em que os autores afirmam o efeito tóxico do 2,4-D quando utilizado em concentrações superiores a 4 mg L⁻¹, com tendência de redução do peso fresco (Bradley et al., 2001).

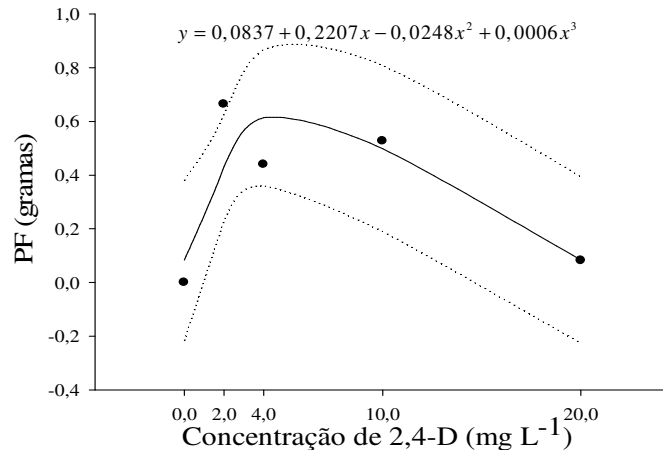


FIGURA 4 Valores médios (pontos) e estimados (linha cheia) da peso fresco (PF) de calos induzidos de anteras de *R.communis* L. em função das concentrações de 2,4D. As linhas pontilhadas são os intervalos de confiança da regressão.

Os calos formados com o uso do 2,4-D a partir das anteras de mamona apresentaram-se, em geral, friáveis e de coloração amarela e branca, que pode ser favorável à produção de calos embriogênicos. No entanto, foi registrada por diversos autores não apenas a formação de calos com o uso deste regulador, como a ocorrência de eventos morfogênicos distintos na cultura de anteras de várias espécies. Destaca-se o cultivo de anteras de algumas espécies, como soja em que foi registrada a formação de calos (Ivers et al., 1974), raízes (Ye et al., 1987), brotações apicais (Yin et al., 1982) e ainda a indução de calos a partir do conectivo (Rodrigues et al., 2005).

5.2.1 Análise das preparações citológicas dos calos

No processo de calogênese, as células com potencial embriogênico apresentam formato isodiamétrico, com características meristemáticas como citoplasma denso e tamanho reduzido (Apezzato-da-Glória & Carmello-Guerreiro, 2003).

A utilização da dupla coloração permite a diferenciação de células com potencial embriogênico. Estas reagem com o corante carmim-acético, resultando em uma coloração avermelhada. Já o corante azul de Evans reage positivamente com as células não embriogênicas por estas serem mais vacuoladas e alongadas (Filonova et al., 2000; Steiner et al., 2005). A reação positiva ao carmim-acético está associada com a competência da célula para o desenvolvimento embriogênico (Durzan, 1988).

Foi observado que o carmim-acético reagiu fortemente em todos os tratamentos, destacando o predomínio de células pequenas e isodiamétricas (Figura 5), indicando características embriogênicas no uso de 2,4-D como indutor dos calos de anteras. Nos calos obtidos a partir da adição de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ foram observadas aglomerações de células alongadas de coloração azul (Figura 1b).

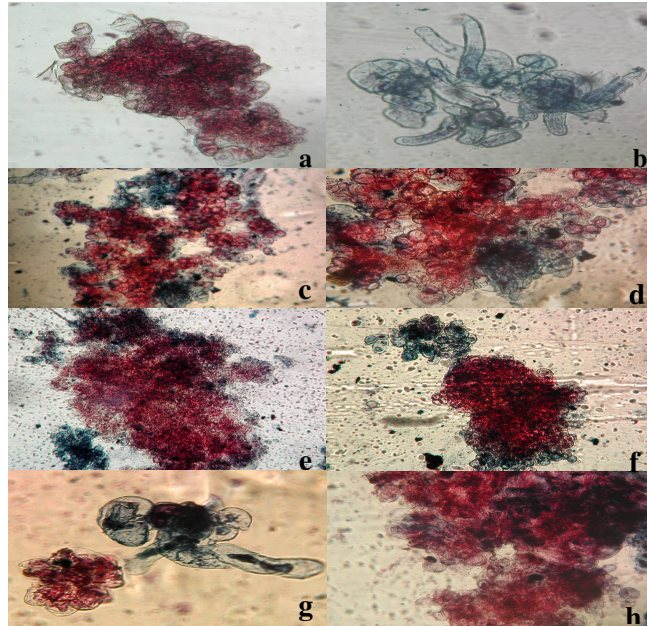


FIGURA 5 Dupla coloração (Azul de Evans + Carmim-acético) de calos induzidos MS em meio a partir de anteras de *Ricinus communis* L. em diferentes concentrações de regulador de crescimento, 2,4-D: 1,0 mg L⁻¹ (a e b); 2,0 mg L⁻¹ (c e d); 4,0 mg L⁻¹ (e e f) 10 mg L⁻¹ (g e h). Objetiva de 10X e escala de 100 µm.

5.3 Efeito dos reguladores de crescimento: ANA, Picloram e TDZ na indução de calos

Para a variável formação de calos, todas as repetições dentro das combinações de reguladores de crescimento testadas apresentaram a formação completa de calos. Na testemunha, em todas as repetições, constatou-se a ausência de calos. Desta forma, foi feita apenas uma análise exploratória.

Para a análise de variância do peso fresco dos calos induzidos nos diferentes reguladores de crescimento, verificou-se o efeito significativo para a interação entre os reguladores e suas concentrações, bem como entre o tratamento adicional e tratamentos em esquema fatorial. O valor médio da massa fresca dos calos obtidos nos diferentes reguladores de crescimento foi

significativamente influenciado pelo aumento da concentração (Tabela 2). Os maiores valores médios foram obtidos como Picloram quando comparado com outros reguladores em todas as concentrações testadas, sendo que não foi observado efeito significativo entre as diferentes concentrações de ANA (Figura 6).

TABELA 2 Valores médios de peso fresco (g) de calos de anteras de *R.communis* L., em função dos reguladores de crescimento e das concentrações.

Concentrações (mg L ⁻¹)	Regulador de crescimento		
	ANA	Picloram	TDZ
1,0	0,0522b	1,6826a	0,4611b
2,0	0,0852b	1,5050a	0,1718b
3,0	0,0775b	2,7960a	0,0772b
4,0	0,0604b	2,6322a	0,0870b

1 Médias seguidas de mesma letra na linha dentro de concentração, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com um nível nominal de significância de 5%.

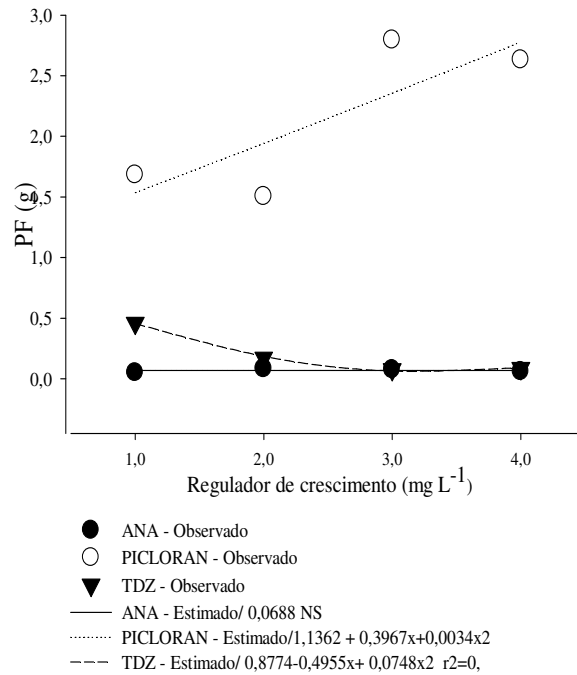


FIGURA 6 Valores médios (pontos) e estimados (linha cheia) de peso fresco (PF) em gramas (g) de calos obtidos a partir de anteras de *R.communis* em função das concentrações dos reguladores de crescimento.

Para o estabelecimento de culturas embriogênicas de estiletos, filetes e anteras de *Feijoa sellowiana* Berg, o Picloram foi considerada uma auxina considerada competente (Stefanello et al., 2005). Onay et al. (2004) relatam que houve uma redução de embriogênese em calos de anteras de *Pistacia vera* como suplementação com TDZ e ANA. Ao contrário, com a adição de BAP obtiveram a indução de até 65% de calos embriogênicos.

5.4 Efeito de nitrato de prata na indução de calos androgênicos

Na análise de Deviance para a formação dos calos houve efeito significativo para a adição de 2,4-D e de Nitrato de prata, isoladamente (respectivamente, $p < 0,0001$ e $p = 0,0231$). Na Tabela 3, são apresentados as proporções médias de calos em que se observa a maior formação de calos com a adição de regulador de crescimento do que com o nitrato de prata, quando avaliados isoladamente.

TABELA 3 Proporções médias dos calos formados a partir de anteras de *R.communis* L. segundo a adição do regulador de crescimento 2,4-D e Nitrato de Prata (AgNO_3).

(A) Regulador crescimento 2,4D (mg L^{-1})	Proporção média	(B) Nitrato de Prata (mg L^{-1})	Proporção média
0	0,00b	0	0,50a
2	0,95a	20	0,45b

1 Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo com um nível nominal de significância de 5%.

A análise de Deviance do peso fresco dos calos formados indica que houve efeito significativo para a interação entre as concentrações de 2,4D e nitrato de prata ($p = 0,0013$). Na Tabela 4, observa-se que o valor médio em gramas de peso fresco foi significativamente maior quando houve a adição do regulador e do inibidor.

TABELA 4 Valores médios de peso fresco (g) para a formação de calos de anteras de *R.communis* L. segundo a adição do regulador de crescimento 2,4-D e Nitrato de Prata (AgNO_3).

Concentração de 2,4D (mg L^{-1})	Concentração de Nitrato de Prata	
	0	20
0	0,00Ab	0,00Ab
2	0,61Bb	1,18Aa

1 Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna dentro de cada combinação, não diferem entre si pelo com um nível nominal de significância de 5%.

Dependendo da concentração do regulador ou do nitrato de prata utilizado foi observada indução de calos com diferentes colorações. Na análise de Deviance das diferentes colorações dos calos formados, verificou-se efeito significativo da adição de 2,4-D e de Nitrato de prata isoladamente ($p < 0,0001$). Na Tabela 5, observou-se que a proporção estimada da cor marrom foi maior no meio de cultura contendo somente o regulador (0,7). No meio em que houve a adição dos dois elementos houve uma proporção maior de calos amarelos (0,6) (Figura 6).

Segundo Nogueira et al. (2007), estudando a formação de calos a partir de segmentos foliares de murici-pequeno, o 2,4-D é a auxina mais frequentemente usada na indução de calogênese para muitas espécies e para diferentes explantes. Em geral, as auxinas são capazes de iniciar a divisão celular e controlar os processos de crescimento e alongação celular. George (1996) comenta que o 2,4-D tem efeito no metabolismo do RNA, induzindo a transcrição de RNAs mensageiros capazes de decodificar proteínas para o crescimento e que podem induzir a proliferação celular desordenada.

TABELA 5 Proporções estimadas de coloração dos calos formados de anteras de *R.communis* L do modelo regulador de crescimento (2,4D) + nitrato de prata (AgNO_3), sem interação.

2,4D (mg L^{-1})	N.Prata (mg L^{-1})	0 (ausência)	1 (branco)	2 (marrom)	3 (amarelo)	4 (verde)
0	0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
0	20	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	0	0,0	0,3	0,7	0,0	0,0
2	20	0,1	0,1	0,1	0,6	0,1

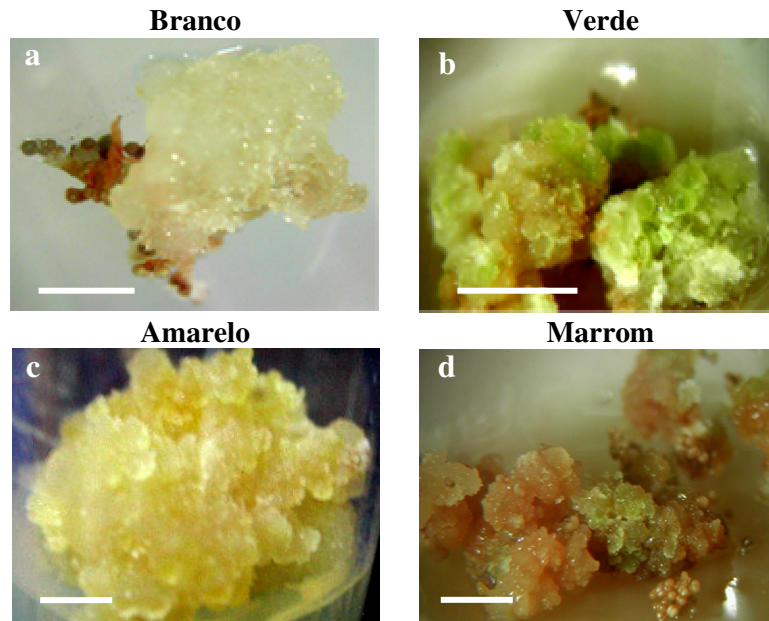


FIGURA 6 Aspecto dos calos formados em anteras de *R.communis* L induzidos em meio MS suplementado com 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D de coloração branca (A e D); com 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D + 20 mg L⁻¹ de nitrato de prata de coloração verde e amarela (B e C). Barra = 5 mm (a, b, c, d).

O indicativo de cor dos calos é uma característica que pode ser usada como forma de seleção para diferentes respostas morfogênicas *in vitro*. De acordo com Figueiredo (2007), calos de coloração amarelo-escuro, marrom e branco, em *Passiflora gibertii*, apresentam características embriogênicas, o que é indicativo de que este parâmetro morfológico pode ser utilizado.

Calos amarelo-claros apresentaram células sem características morfogênicas, semelhante ao relatado para calos translúcidos. Segundo Yin et al. (1982), calos de coloração amarelada e friável de soja (*Glycine max*) inoculados em meio de cultura contendo 181 µM de 2,4-D, não indicam qualquer estrutura embriogênica. Bezerra et al. (2001) caracterizam calos embriogênicos de milho,

cultivar Jatinã C3 Anão, como sendo compactos, amarelados e com nodulações evidentes na superfície.

Muitos fatores afetam a resposta das anteras cultivadas, inclusive o genótipo, o estado fisiológico e as condições de crescimento das plantas doadoras, a etapa desenvolvimento de pólen, o pré-tratamento de anteras e a composição do meio de cultura (Smýkal, 2000).

O etileno, presente muitas vezes em altas concentrações nos recipientes de cultivo, tem influência direta na resposta do explante, sendo muitas vezes indesejável. Diante da ação negativa deste, pesquisadores realizaram estudos sobre os inibidores do etileno, sendo o mais citado o nitrato de prata (AgNO_3) (Smalle & Straeten, 1997).

Dentre os diversos trabalhos com o uso do nitrato, destacam-se: a indução de calos embriogênicos de *Capsicum annuum* L. (Luz, 1995), de calos de seringueira (Auboiron et al., 1990), de calos de *Coffea arabica* L. (Pasqual et al., 2002) em concentrações que variaram entre 5 mg L^{-1} a 20 mg L^{-1} .

6 CONCLUSÕES

O ácido ascórbico, na concentração de 200 mg L^{-1} , é efetivo como antioxidante e o uso de PVP como antioxidante não é eficiente na indução de calos de anteras de *R.communis*.

A concentração de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D ou $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Picloram, adicionada ao meio de cultura, proporciona maior peso fresco de calos.

Na análise citológica, células isodiamétricas coradas fortemente com carmim-acético são observadas em calos induzidos com 2,4-D, evidenciando um potencial embriogênico.

O uso de $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrato de prata no meio de cultura influencia na formação e na coloração dos calos formados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLOUFA, M. A. I.; MACEDO, C. E. C.; BARROSO, P. A. V.; BARBALHO, A. D.; OLIVEIRA, C. H. B. de. Avaliação de dois agentes antioxidantes no estabelecimento *in vitro* de inflorescências de bananeira (*Musa ssp.*). **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 05, p. 1092-1096, 2002.

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, 1983. p. 82-123.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa, MG: UFV, 2003. 438 p.

AUBOIRON, E.; CARRON, M. P.; MICHAUXFERRIÈRE, N. Influence of atmospheric gases, particularly ethylene, on somatic embryogenesis of *Hevea brasiliensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 21, n. 1, p. 31-37, Apr. 1990.

AZEVEDO, D. M. P. de; LIMA, E. F. **O agronegócio da mamona no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2001. 305 p.

BAJAJ, Y. P. S. *In vitro* production of haploids. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. U.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. New York: Mcmillan, 1984. v. 1, cap. 6, p. 150-187.

BALL, S.T.; ZHOU, H.; KONZAK, C. F. Influence of 2,4-D, IAA, and duration of callus induction in anther cultures of spring wheat. **Plant Science**, Limerick, v. 90, n. 2, p. 195-200, 1993.

BEZERRA, J. S.; WILLADINO, L.; CÂMARA, T. R. Crescimento de calos embriogênicos de milho submetidos ao estresse salino. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 2, p. 259-263, abr./jun. 2001.

BOBROWSKI, V. L.; PETERS, J. A.; AUGUSTIN, E.; VIÉGAS, J. Efeitos de meios de cultura na formação de calos a partir de anteras de aspargo (*Asparagus officinalis* L). **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 9, n. 1, p. 115-122, 1995.

BRADLEY, D. E.; BRUNEAU, A. H.; QU, R. Effects of cultivar, explant treatment, and medium supplements on callus induction and plantlet regeneration in perennial ryegrass. **International Turfgrass Society Research Journal**, Blacksburg, v. 9, p. 152-156, 2001.

DURZAN, D. J. Somatic polyembryogenesis for the multiplication of tree crops. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, Newcastle upon Tyne, v. 6, p. 341-378, 1988.

FERRREIRA, I. T. **Propagação *in vitro* de crisântemo ‘Funny Pynk’**. 2003. 40 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

FIGUEIREDO, M. A. **Obtenção, análises morfológicas e ultra-estruturais de calos de *Passiflora* spp.** 2007. 80 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FILONOVA, L. H.; BOZHKOVA, P. V.; BRUKHIN, V. B.; DANIEL, G.; ZHIVOTOVSKY, B.; ARNOLD, S. von. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. **Journal of Cell Science**, London, v. 113, n. 24, p. 4399-4411, 2000.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 50, n. 1, p. 151-158, Apr. 1968.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: part I: the technology**. Edington: Exegetics, 1996. 1574 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABC/CTP/EMBRAPA-CNPQ, 1990. cap. 2, p. 99-169.

GUPTA, P. P. Eradication of mosaic disease and rapid clonal multiplication of bananas and plantains through meristem tip culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 6, p. 33-39, 1986.

IVERS, D. R.; PALMER, R. G.; FEHR, W. R. Anther culture in soybeans. **Crop Science**, Madison, v. 14, n. 6, p. 891-893, Apr. 1974.

LUZ, J. M. Q. **Embriogênese somática *in vitro* em anteras de pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. 1995. 115 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MELO, B.; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da Guabirobeira [*Syagrus oleraceae* (Mart.) Becc.]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 06, p. 1301-1306, 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, Oct. 1962.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M. de; SOARES, G. de A.; SOARES, F. P.; CASTRO, A. H. F.; PAIVA, P. D. de O. Indução de calos em explantes foliares de Murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, mar./abr. 2007.

NÓBREGA, M. B. de M. **Avaliação de genótipos de mamona (*Ricinus communis* L.) em cruzamentos dialélicos parciais**. 2008. 77 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Unidade Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

ONAY, A.; PIRINC, V.; TILKAT, E.; AKTURK, Z.; YILDIRIM, H. Somatic embryogenesis of pistachio from female flowers. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 79, n. 6, p. 960-964, 2004.

PASQUAL, M.; MACIEL, A. L. de R.; CAMPOS, K. P.; CAMPOS, R. J. C. de. Indução de calos em anteras de café (*coffea arabica* l.) cultivadas *in vitro*. **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 1, p. 71-76, jan./fev. 2002.

PETERS, J. A.; BOBROWSKI, V. L.; ROSINHA, G. M. S. Produção de haplóides e duplohaplóides. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1999. v. 1, p. 569-612.

PINHEIRO, H. A.; SILVA, J. V.; ENDRES, L.; FERREIRA, V. M.; CAMARA, C. de A.; CABRAL, F. F.; OLIVEIRA, J. F.; CARVALHO, L. W. T. de; SANTOS, J. M. dos; SANTOS FILHO, B. G. dos. Leaf gas exchange, chloroplastic pigments and dry matter accumulation in castor bean (*Ricinus communis* L) seedlings subjected to salt stress conditions. **Industrial Crops And Products**, Copenhagen, v. 27, n. 3, p. 385-392, 2008.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing reference index version 2.8.0. Vienna, Austria: Foundation for Statistical Computing, 2008. Pacote estatístico R Software livre UFG. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 16 nov. 2008.

RODRIGUES, L. R.; MARIATH, J. E. A.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Cultura de anteras x cultura de micrósporos isolados: dez razões para uma nova abordagem da embriogênese do micrósporo. **Revista Ciência Biotecnologia & Desenvolvimento**, Brasília, v. 33, p. 51-54, jul./dez. 2004.

RODRIGUES, L. R.; OLIVEIRA, J. M. S.; MARIATH, J. E. A.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Histology of embryogenic responses in soybean anther culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 80, n. 2, p. 129-137, 2005.

SMALLE, J.; STRAETEN, D. van der. Ethylene and vegetative development. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 100, n. 3, p. 593-605, 1997.

SMÝKAL, P. Pollen embryogenesis - the stress mediated switch from gametophytic to sporophytic development - current status and future prospects. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 43, n. 4, p. 481-489, Dec. 2000.

STEFANELLO, S.; DAL VESCO, L. L.; DUCROQUET, J. P. H. J.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from floral tissues of feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 105, n. 1, p. 117-126, May 2005.

STEINER, N.; VIEIRA, F. N.; MALDONADO, S.; GUERRA, M. P. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 6, p. 895-903, 2005.

STEIN, V.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; JUSTO, C. F.; NERY, F. C.; NICIOLI, P. M. Viabilidade do grão de pólen e efeito do PVP na calogênese de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 702-704, jul. 2007.

VARGAS, D. P.; BOBROWSKI, V. L.; ANJOS, S. D. e S. dos. Cultivo *in vitro* de anteras de mamona: resultados preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 2., 2006. Aracaju. **Anais...** Aracaju: Embrapa, 2006. 1 CD-ROM.

XU, N.; BEWLEY, J. D. Contracting pattern of somatic and zygotic embryo development in alfafa (*Medicago sativa* L.) as revealed by scanning electron microscopy. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 11, p. 279-284, 1992.

YE, J. M.; KAO, K. N.; HARVEY, B. L.; ROSSANAGEL, B. G. Screening salt-tolerant barley genotypes via F1 anther culture in salt stress media. **Theoretical and Applied Genetics**, Amsterdam, v. 74, n. 4, p. 426-429, 1987.

YIN, G. C.; ZHU, Z. Y.; XU, Z.; CHEN, L.; LI, X. Z.; BI, F. Y. Studies on induction of pollen plant and their androgenesis in *Glycine max* (L.) Merr. **Soybean Science**, Shanhua, v. 1, n. 1, p. 69-76, 1982.

CAPITULO 4

CRIOPRESERVAÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN DE MAMONA

1 RESUMO

A espécie *Ricinus communis* L., mamoneira, é uma Euphorbiaceae de grande importância industrial e medicinal com potencial estratégico para Brasil. O armazenamento através da técnica de criopreservação utilizando-se nitrogênio líquido (-196°C), é uma alternativa para a conservação da diversidade da espécie. Essa técnica oferece potencial para a preservação das cultivares sem limites de tempo, com a redução do metabolismo a níveis baixos que todos os processos bioquímicos são significativamente reduzidos e a deterioração biológica é paralisada. Considerando a importância de se empregar os grãos de pólen como elemento de recurso genético e fonte de variabilidade para o melhoramento genético de *Ricinus communis* L., foi realizado este trabalho com o objetivo de se desenvolver um protocolo eficiente de criopreservação e o monitoramento da estrutura gamética masculina dessa espécie. Foi avaliada a viabilidade citológica dos grãos de pólen com os corantes Reativo de Alexander e Carmim-acético e a germinação *in vitro* do pólen, como controle inicial. Os grãos de pólen foram armazenados em diferentes períodos (1 hora, 15 dias, 30 dias e 6 meses) a em temperaturas inferiores a zero (-20°C, -80°C e -196°C) com 5-7% UR. Os agrupamentos polínicos foram armazenados em criotubos de 2,0 mL. Para a preservação da viabilidade celular foram utilizados crioprotetores químicos, sendo testados dimetilsulfóxido (DMSO) e Glicerol (5%, 10% e 15%) e sua ausência para cada temperatura avaliada (Controle). Avaliou-se também a integridade nuclear dos grãos de pólen armazenados a -196°C nos diferentes crioprotetores e concentrações testadas. Os resultados indicam que a viabilidade polínica inicial foi alta utilizando-se a análise das médias com Carmim-acético (98), R.Alexander (97) e germinação *in vitro* (58). Concluiu-se, portanto, que a viabilidade celular do grão de pólen permanece alta, após a criopreservação, quando este é conservado por até seis meses (-80°C e -196°C). O comportamento dos grãos de pólen de *R. communis* pode ser considerado ortodoxo quanto à tolerância ao congelamento. Os resultados obtidos neste trabalho confirmam a possibilidade de criopreservação como uma alternativa viável para a conservação de grãos de pólen de *Ricinus communis*. Contudo, pela análise por citometria de fluxo, a integridade nuclear é maior quando utiliza-se crioprotetores, preferencialmente, o glicerol a 5% e 15%.

Palavras-chave: criopreservação, pólen, *Ricinus comunnis*.

2 ABSTRACT

The species *Ricinus communis* L., castor bean, is a Euphorbiaceae species of great importance industrial and medicinal, with strategic potential for Brazil. The cryoconservation or storage is an alternative to conserve the diversity of species, using liquid nitrogen (-196 ° C). Offers potential for the preservation of cultivars without time limits, with the reduction of metabolism to levels so low that all biochemical processes are significantly reduced and biological deterioration is paralysis. Considering the importance of using the grains of pollen as part of the genetic resource and source of variability for the genetic improvement of *Ricinus communis* L., was conducted this study aiming to develop an efficient cryopreservation and monitoring protocol of the structure male gamete this species. Were evaluated the cytological viability of pollen grains with the reactive of Alexander and carmine-acetic acid, and *in vitro* pollen germination as initial control. The pollen grains were stored in different periods (1 hour, 15 days, 30 days and 6 months) at the temperatures below zero (-20 ° C, -80 ° C and -196 ° C) with 5-7% RH. The pollen groups were stored in cryotubes of 2.0 mL. For the preservation of cell viability were used cryoprotectants chemical, being tested dimethylsulfoxide (DMSO) and glycerol (5%, 10% and 15%) and its absence for each temperature measured (Control). It also assessed the integrity of nuclear grains of pollen stored at -196 ° C in different cryoprotectants and concentrations tested. The results indicate that the initial viability was high, using the avarege analysis, with carmine-acetic acid (98), R. Alexander (97) and *in vitro* germination (58). It was concluded that pollen grain viability remains high after cryopreservation when maintained up to 6 months (-80° C and -196° C). The behavior of pollen grains of *R. communis* can be considered orthodox tolerance to freezing. The results of this study confirm the possibility of cryopreservation as an alternative for the preservation of pollen grains of *Ricinus communis*. However, the analysis by flow cytometry, nuclear integrity is greater when cryoprotectants is used, preferably, the glycerol to 5% and 15%.

Key words: cryopreservation, pollen, *Ricinus communis*.

3 INTRODUÇÃO

A mamona ou palma-cristi vem se destacando, no cenário nacional, por possuir propriedades medicinais e grande potencial para produção de biodiesel, predominantemente em países de clima tropical (Alonso, 1998). *Ricinus communis* L. é uma espécie de gênero monoespecífico, pertence à família Euphorbiaceae, a qual contém cerca de 290 gêneros e aproximadamente 7.500 espécies (Joly, 1979; Rodrigues et al., 2002).

É uma planta oleaginosa de alto valor econômico por possuir inúmeras possibilidades de aplicação na área industrial e medicinal. Vários subprodutos são fabricados a partir desta espécie como tintas, corantes, desinfetantes, germicidas, óleos lubrificantes de baixa temperatura, colas, náilon e matéria plástica.

Formas de conservação dos genótipos superiores podem auxiliar programas de melhoramento, principalmente aqueles que visem à produção de novos cultivares que atendam a demanda do mercado mundial. De maneira geral, a capacidade de armazenamento está associada às características dos genótipos.

Na busca por métodos que minimizassem a deterioração do material biológico, por décadas indicou-se o uso de -20°C para armazenamento. Contudo, um dos métodos mais eficientes de conservação atualmente é a criopreservação de diversos tipos de material biológico, o que permite o armazenamento por período ilimitado (Kartha, 1985; Gonzalez-Arno et al., 2008).

A técnica da criopreservação, isto é, o armazenamento em nitrogênio líquido (-196 °C), proporciona a redução do metabolismo a níveis tão baixos que todos os processos bioquímicos são significativamente reduzidos e a deterioração biológica é paralisada (Engelmann, 2004).

Pesquisas recentes vêm estabelecendo protocolos para o criopreservação de diversas estruturas para várias espécies de importância

econômica. O armazenamento do pólen, bem como de outras estruturas como embriões zigóticos, protoplastos, a longo prazo, é freqüentemente necessário e vantajoso quando comparado com outras estruturas que ocupariam espaços maiores no armazenamento. Contudo, a adequação das técnicas de congelamento e monitoramento da viabilidade do material biológico é necessária (Johri & Vasil, 1961; Hoekstra & Bruinsma, 1975; Shivanna et al., 1991).

A criopreservação de grãos de pólen, da mesma forma que para sementes, levam em conta o comportamento ortodoxo, tolerando ou não as condições que seriam letais para a semente inteira (Berjak et al., 2000; Santos et al., 2002), além de ocupar o mínimo de espaço (Stushnoff & Seufferhled, 1995; Youngjie et al., 1997; Lopes et al., 2004).

Os programas de melhoramento de mamona enfrentam algumas dificuldades, pois a espécie apresenta floração desigual que ocorre para alguns acessos. Diante disso, o estabelecimento de metodologias de armazenamento de grãos do pólen pode auxiliar os melhoristas nas etapas do cruzamento. A preservação *ex situ* e a utilização de mamona demandam informações conclusivas, entre outros aspectos, quanto ao armazenamento por períodos prolongados (Sousa et al., 2004).

A vitrificação é a solidificação do líquido, sem ocorrer a cristalização, com aumento da viscosidade, sendo esta a forma aplicada de congelamento na criopreservação. A crioconservação pode ocupar um pequeno espaço no banco de germoplasma, e ainda há uma relativa simplicidade de manuseio das condições de armazenamento, além de um baixo custo do processo na preservação desses recursos fitogenéticos (Gonzaga et al., 2003).

No metabolismo, o movimento molecular a baixas temperaturas é super reduzido, não havendo fase líquida na célula. A grande dificuldade do processo é a formação de cristais de gelo no interior das células, que podem causar ruptura

das membranas, resultando em colapso e morte, como consequência da perda da semipermeabilidade e da compartimentação celular (Santos et al., 2002).

A viabilidade do pólen após a criopreservação pode ser determinada através de um grande número de técnicas. Parâmetros para o monitoramento desta viabilidade podem ser feitos com o uso de colorações citológicas, como por exemplo, lugol, carmim-acético, iodeto de potássio, tetrazólio, ou ainda, por métodos diretos, como a germinação *in vitro* (Shivanna & Johri, 1985; Shivanna & Rangaswamy, 1992; Kearns & Inouye, 1993). Contudo, as diferenças estimadas estão na aplicabilidade das técnicas e no baixo custo para a obtenção dos resultados no monitoramento.

A citometria de fluxo pode ser utilizada neste monitoramento. Ela representa uma metodologia refinada, que envolve a análise das propriedades óticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas (células, núcleos, cromossomos, organelas) que fluem em uma suspensão líquida (Dolezel, 1997).

As partículas em suspensão movem-se imersas num fluido (tampão de extração) no interior de um capilar dentro de um aparelho denominado citômetro de fluxo (Dolezel, 1997). Essas partículas atravessam, uma a uma, um feixe de laser, ocorrendo um processo de dispersão da luz e/ou emissão de fluorescência (Dolezel & Bartos, 2005). A intensidade de dispersão da luz ou da emissão de fluorescência está relacionada com as propriedades das partículas que estão sendo analisadas (Dolezel & Bartos, 2005).

A coloração dessa amostra com corantes específicos para o DNA (DAPI, iodeto de propídeo, brometo de etídeo) permite ao aparelho estimar a quantidade de DNA. A citometria de fluxo pode ainda ser utilizada na avaliação de quantidade de DNA em grãos de pólen ou em células meióticas, permitindo a análise de comportamento meiótico e a detecção de grãos de pólen anormais, auxiliando no estudo de estabilidade meiótica e permitindo a seleção de plantas estáveis.

Poucos trabalhos descrevem a avaliação por citometria de fluxo de núcleos isolados a partir de grão de pólen. Em lírio e em milho (Bino et al., 1990) e *Nicotiana sylvestris* (Paepe et al., 1990) os núcleos foram isolados dos grãos de pólen diretamente por maceração direta e o conteúdo de DNA foi determinado por citometria de fluxo. Pan et al. (2004) utilizaram tratamentos ultra-sônicos para a liberação dos núcleos de grãos de pólen de *Brassica napus*.

A diversidade de resposta entre as diferentes espécies, ou mesmo entre diferentes tecidos de uma mesma espécie dificultam a generalização de protocolos e o desenvolvimento de uma metodologia padrão quanto à criopreservação de material vegetal. Dessa maneira, fazem-se necessárias as variadas abordagens técnicas que permitam maior eficiência e aplicabilidade das técnicas de criopreservação em diversas espécies (Sant et al., 2008).

Neste contexto, este trabalho teve por objetivo determinar o método mais eficiente para a criopreservação de grãos de pólen de *Ricinus communis* L. do tipo ruderal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material botânico

O material vegetal foi coletado de inflorescências de *Ricinus communis* L. do tipo silvestre (ruderal), de aproximadamente, 800 arbustos matrizes, localizados próximos ao campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA), na época da dispersão, entre os meses de agosto e outubro de 2007. A região se localiza no município de Lavras, sul do estado de Minas Gerais, nas coordenadas geográficas 21°13'17''S e 44°57'47''W.

As plantas foram identificadas e as excicatas foram depositadas no herbário UFLA, do Departamento Biologia da UFLA, com número de registro 25.041.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Setor de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA).

4.2 Viabilidade polínica em mamoneira

Para o teste de fertilidade *in vitro*, os grãos de pólen foram germinados em meio de cultura contendo sacarose a 10%, ácido bórico 0,01%, cloreto de cálcio diidratado 0,02% , solidificado com 0,8% de ágar, segundo indicado por Brewbaker & Kwack (1963), anteriormente determinado como o meio de cultivo indicado para germinação do pólen (Capítulo 2). Foram considerados grãos de pólen germinados aqueles que, após 24h a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, emitiram o tubo polínico com, no mínimo, o mesmo diâmetro do pólen.

Para a análise citológica do material, os botões florais foram fixados em Carnoy (3 álcool etílico; 1 ácido acético) por um período de 24h. Posteriormente, os grãos de pólen foram lavados em água destilada, colocados em lâminas e cobertos com corantes. Em seguida, o material recoberto foi com lamínula para análise em microscópio. Para cada corante, os grãos de pólen corados permaneceram por 24 horas em geladeira, em câmara úmida. Após este período, as lâminas foram avaliadas em microscópio óptico em amplitude de 40x. Foram avaliados com os corantes: carmim-acético 2% e Reativo de Alexander 1% (composto de: 20 mL álcool etílico, 20 mg de verde malaquita, 50 mL de água destilada, 40 mL de glicerol, 100 mg de fucsina ácida, 5 g de fenol e 2 mL de ácido láctico) .

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, considerando-se quatro repetições, sendo cada repetição constituída por uma lâmina, totalizando a contagem de 100 grãos de pólen classificados como viáveis e inviáveis (Figura 1).

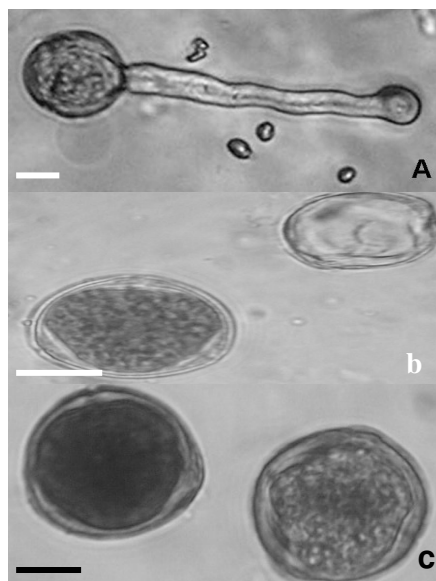


FIGURA 1 Aspecto do grão de pólen germinado *in vitro* (A); Pólen viável corado com carmin-acético (vermelho) e inviável (sem coloração); (B) Pólen viável corado com Reativo de Alexander (roxo) e inviável (verde) (C). (a, Barra= 12 μ m; b e c barra=20 μ m).

4.3 Criopreservação dos grãos de pólen

Posteriormente à coleta, foi determinado o teor de umidade dos grãos de pólen, pesando-se três repetições de aproximadamente 0,2 g de material em placas previamente secas e taradas. O material foi seco em estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ até o peso constante, e os dados foram expressos em porcentagem, conforme método descrito pela Association of Official Analytical Chemists – AOAC (1990).

Para a criopreservação, os grãos de pólen foram colocados em criotubos (2,0 mL) submetidos aos seguintes tratamentos: nitrogênio líquido (-196°C); ultrafreezer (-80°) e freezer (-20°C) durante 1h, 15 e 30 dias e por 6 meses nas temperaturas de -80°C e -20°C . Para a crioproteção utilizou-se DMSO e Glicerol

em diferentes concentrações (0%; 5,0%; 10,0%; e 15,0%), totalizando 32 tratamentos.

Para análise estatística, após 1 hora, 15 dias e 30 dias de armazenamento foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições, em que os tratamentos constituíam-se de três temperaturas (-196, -80 e -20°C), dois crioprotetores (DMSO e Glicerol) e quatro diferentes concentrações (0%, 5%, 10%, e 15%), o mesmo para a análise de 6 meses com temperaturas de -80°C e -196°C. Foram avaliados dois tipos de corantes citológicos, o Reativo de Alexander a 1% e o Carmim-acético a 2%, analisando-se as seguintes variáveis: proporção de células viáveis (corados em vermelho pelo carmim e corados em roxo pelo R. Alexander), inviáveis (não coradas pelo carmim e corados de verde pelo R. Alexander) e rompidas (extravasamento do citoplasma em ambos os corantes) totalizando a contagem de 100 células (Figura 2).

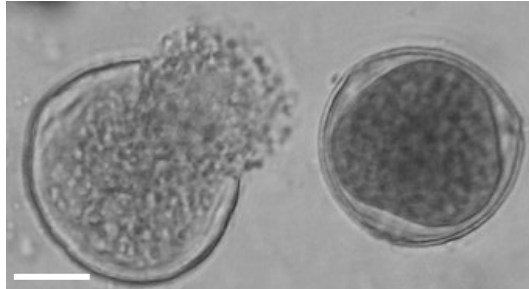


FIGURA 2 Aspecto do grão de pólen rompido em carmim-acético 2% de *R.communis* L. Barra=10µm.

Posteriormente ao período de armazenamento, o material foi analisado pelo método de viabilidade indireta por coloração citológica, conforme descrito na metodologia no item 4.2, para a coloração do material com os corantes, carmim-acético e Reativo de Alexander.

A análise estatística foi realizada de acordo com o delineamento experimental por meio do pacote estatístico R (R Development Core Team, 2008). O modelo estatístico que descreve as observações é dado por:

$$y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \delta_k + \alpha\beta_{ij} + \beta\delta_{jk} + \alpha\delta_{ik} + \alpha\beta\delta_{ijk} + \varepsilon_{ijkl},$$

em que:

y_{ijkl} é o valor da variável dependente na l-ésima repetição que recebeu o i-ésima temperatura, no j-ésimo crioprotetor e na k-ésima concentração, com $l = 1, \dots, r$;

μ é uma constante inerente a cada observação;

α_i é o efeito da i-ésima temperatura, com $i = 1, 2, 3$;

β_j é o efeito do j-ésimo crioprotetor, com $j = 1, 2$;

δ_k é o efeito da k-ésima concentração, com $k=1,2,3$;

$\alpha\beta_{ij}$ é o efeito da interação entre a i-ésima temperatura e o j-ésimo crioprotetor;

$\beta\delta_{jk}$ é o efeito da interação entre o j-ésimo crioprotetor e a k-ésima concentração;

$\alpha\delta_{ik}$ é o efeito da interação entre a i-ésima temperatura e a k-ésima concentração.

$\alpha\beta\delta_{ijk}$ é o efeito da interação entre a i-ésima temperatura, o j-ésimo crioprotetor e a k-ésima concentração.

ε_{ijkl} é o erro experimental associado à parcela, independente e identicamente distribuído de uma Normal com média zero e variância σ^2 .

4.4 Integridade do DNA nuclear

A quantificação de DNA nuclear foi realizada em grãos de pólen armazenados em nitrogênio líquido (-196°C). Foram avaliados grãos de pólen armazenados sem o uso de substâncias crioprotetoras (testemunha, ausência de

do crioprotetor) e criopreservados com a utilização de crioprotetores químicos, DMSO e glicerol, ambos nas concentrações de 5%, 10% e 15%. A avaliação foi feita dos grãos de pólen congelados por 30 dias, nessas condições.

O preparo das amostras e as análises por citometria de fluxo foram conduzidos no Laboratório de Genética e Imunologia, na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

Para cada tratamento, três amostras foram avaliadas, com o objetivo de estimar a quantidade de DNA nuclear. De 20 mg a 30 mg de grãos de pólen, juntamente com a mesma quantidade de tecido foliar jovem de *Pisum sativum* (2C = 9,09 pg) (padrão interno de referência), foram triturados em placa de Petri contendo 1,0 mL de tampão LB01 gelado para lise celular e liberação dos núcleos em suspensão (Dolezel, 1997). A suspensão foi aspirada por meio de duas camadas de gaze e a suspensão nuclear foi posteriormente filtrada em uma malha de 50 µm. Os núcleos foram corados, adicionando-se 25 µL de iodeto de propídio e 5,0 µL de RNase. As amostras foram armazenadas no escuro e analisadas até 1 hora após o preparo. Para cada amostra, foram analisados, pelo menos, 10 mil núcleos.

A análise foi realizada no citômetro Facscalibur (Becton Dickinson) e o conteúdo de DNA nuclear (pg) do pólen foi estimado por comparação com a posição em relação ao pico G1 do padrão interno de referência (*Pisum sativum*). A análise estatística foi realizada por meio do software WinMDI 2.8 (disponível em <http://facs.scripps.edu/software.html>). O conteúdo de DNA em (pg) para os tratamentos foi estimado como mostrado a seguir:

$$\frac{\text{Amostra (grãos de pólen)}}{\text{DNA 2C (pg)}} = \frac{\text{Canal de pico G1 da amostra}}{\text{Canal do pico G1 do padrão}} \times \text{Conteúdo de DNA padrão}$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise da viabilidade polínica em mamoneira

Pela análise de variância dos dados, observou-se diferença significativa nos valores de germinação e viabilidade por meio da coloração. A análise da germinação *in vitro* dos grãos de pólen como método indireto da capacidade de fertilização apresentou-se satisfatório na espécie diferindo significativamente dos outros métodos de viabilidade com o uso do carmim-acético e Reativo de Alexander, respectivamente, 97,7 e 98,0 (Figura 3).

De acordo com Scorza & Sherman (1995), considera-se como pólen de qualidade aquele que tem o percentual de germinação entre 50% a 80% . A alta viabilidade observada nos diferentes métodos para a mamona indica a capacidade indireta da fecundação e da formação de sementes viáveis. Segundo Souza et al. (2004), esses resultados de altos índices de viabilidade sugerem que o genótipo tem potencial de utilização como genitor masculino.

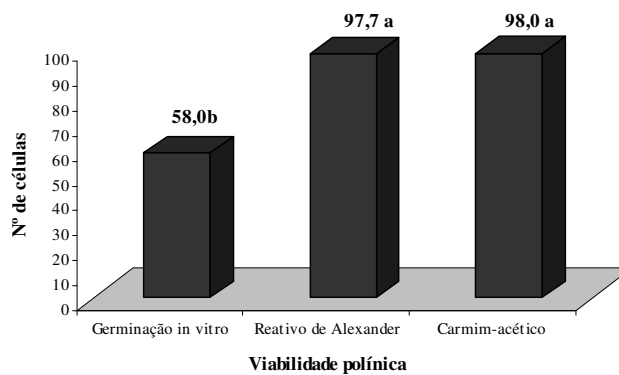


FIGURA 3 Médias da viabilidade polínica de *Ricinus communis* L. tipo silvestre em diferentes métodos: na germinação *in vitro*, no uso de coloração citológica, Reativo de Alexander e Carmim-acético. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Em relação aos métodos de avaliação da qualidade do pólen, houve diferenças entre o método de coloração do pólen com carmin-acético e o método de germinação *in vitro* de pólen. Contudo, o método do carmin é amplamente utilizado, dada a sua praticidade e facilidade de aplicação.

Segundo Guerra (1988), o curso normal da meiose garante a viabilidade gamética. Os eventos citológicos da gametogênese são controlados por um grande número de genes que atuam desde as mitoses pré-meióticas até as pós-meióticas e as mutações que ocorrem nesses genes causam anomalias que podem afetar a fertilidade da planta. Segundo Silva et al. (2000), o estudo da viabilidade permite realizar a avaliação prévia do genótipo quanto a sua capacidade de produzir frutos e sementes.

De acordo com Loguercio & Battistin (2004), o parâmetro viabilidade do pólen é reflexo das condições de desenvolvimento da parte reprodutiva masculina da planta, uma vez que o pólen viável é um conjunto de gametas masculinos normais, aptos para fertilização.

Os valores observados na viabilidade polínica em mamona concordam com os estudos de outros autores, já que muitas plantas angiospermas produzem elevado percentual de pólen viável, embora nem todo o pólen seja utilizado na fertilização (Battistin, 1983; Senff et al., 1992; Loguercio & Battistin, 2004).

A determinação da viabilidade do pólen é fundamental na investigação das causas de infertilidade em algumas espécies, bem como no conhecimento do potencial de reprodução de uma espécie e dos problemas de fertilidade que possam ocorrer (Peñaloza, 1995).

Segundo Techio (2002), as técnicas de coloração são simples, de baixo custo e rápidas, considerando que existe uma correlação viabilidade-coloração, em que a estimativa é dada pela contagem dos pólenes corados e não corados. De acordo com a autora, na literatura não se encontra a descrição de um teste de viabilidade universal com a utilização de um corante específico, sendo que a

maioria dos trabalhos relatam o uso dos corantes nucleares para vários grupos vegetais.

5.2 Criopreservação dos grãos de pólen

O grau de umidade dos grãos de pólen de *R.communis* para o estabelecimento inicial foi, em média, de 5 a 7 %. Segundo Connor & Towill (1993), embora indiquem um teor de água dos grãos de pólen abaixo de 20% para que sejam criopreservados com êxito, não há ainda estudos que definam uma umidade mínima que mantenha a viabilidade. De modo geral, planta que possui sementes ortodoxas possui grãos de pólen sensíveis. Em alguns casos, a criopreservação pode aumentar a germinação de sementes. Esse efeito se deve principalmente pela superação da dormência (Towill, 2002). Contudo, esta mesma afirmação não foi experimentada para o comportamento do grão de pólen após o congelamento de várias espécies. Em desacordo com esta possibilidade, o pólen de mamona neste trabalho indicou uma queda na viabilidade após o período de criopreservação em todos os períodos de armazenamento.

Diante do fato de que o corante carmim-acético é comumente utilizado na análise do potencial de fertilidade masculina de muitas espécies, contudo tem função limitada por corar apenas o núcleo, optou-se então por utilizar em conjunto a análise com o corante proposto por Alexander (1980) em que a função é de contraste diferencial com dupla coloração, com caráter complementar e esclarecedor, trazendo a possibilidade de visualização de possíveis diferenças entre os tratamentos.

5.2.1 Análise polínica após 1 (uma) hora de congelamento

a) Viabilidade polínica

Os valores médios de proporção de grãos de pólen viáveis criopreservados por uma hora, analisados na Tabela 1, em que se utilizou o método de coloração citológica com Reativo de Alexander a 1%, armazenadas em temperaturas inferiores a zero, apresentou diferenças significativas entre os tratamentos testados.

Na análise de variância da proporção dos grãos de pólen corados com R. Alexander houve diferença significativa no armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C) na ausência do uso de crioprotetores (controle), e em freezer (-20°C) na concentração de 10% e 15% dos crioprotetores utilizados.

TABELA 1 Valores médios proporção de grãos de pólen viáveis corados com Reativo de Alexander a 1%, em função do crioprotetor, concentrações (%) e temperaturas (°C) armazenados em 1 hora.

Temperatura (°C)	Concentração (%)	Crioprotetor ¹	
		DMSO	Glicerol
-196	0	0,9700a	0,9225b
	5	0,9475a	0,9625a
	10	0,9400a	0,9575a
	15	0,9750a	0,9575a
-80	0	0,9450a	0,9825a
	5	0,9625a	0,9475a
	10	0,9325a	0,8950a
	15	0,9200a	0,8875a
-20	0	0,9450a	0,9850a
	5	0,9200a	0,9575a
	10	0,8700b	0,9650a
	15	0,8350b	0,9450a

¹Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha dentro de cada combinação (Temperatura-Concentração), não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com um nível nominal de significância de 5%.

Nas Figuras 4 e 5, pode-se visualizar as regressões para corante R.Alexander nas concentrações dos crioprotetores dentro de cada temperatura em função do tipo de crioprotetor, DMSO e Glicerol, respectivamente. Observou-se um decréscimo significativo da viabilidade polínica com o aumento da concentração do crioprotetor DMSO, tendo maior viabilidade sem o uso deste crioprotetor em -80°C , sendo considerado, neste caso, não indicado para a criopreservação em nitrogênio líquido (-196°C) (Figura 4).

Para o uso do glicerol, a análise de regressão com o crioprotetor demonstrou um decréscimo significativo da viabilidade com o aumento da concentração quando estes foram armazenados a -80°C , com maior proporção de viáveis sem o uso do crioprotetor, no período de uma hora de congelamento (Figura 5).

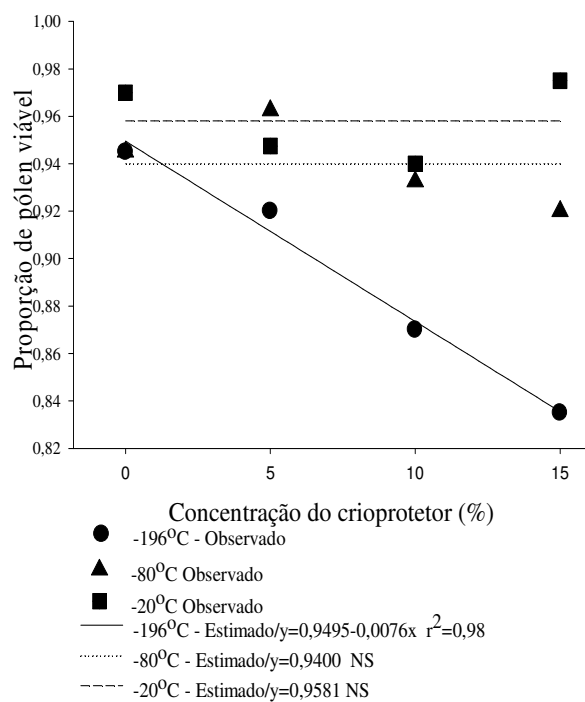


FIGURA 4 Valores médios e estimados da proporção de grãos de pólen viáveis, corados com Reativo de Alexander 1%, para armazenamento em temperatura baixas (-196°C, -80°C e -20°C) por 1 hora em função das concentrações no crioprotetor DMSO (dimetilsufóxido) em 0%, 5%, 10% e 15%.

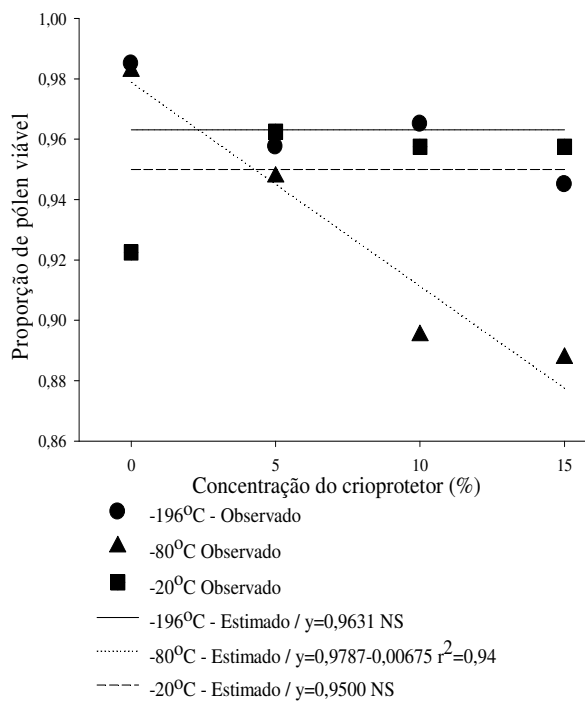


FIGURA 5 Valores médios e estimados da proporção de grãos de pólen viáveis, corados com Reativo de Alexander a 1%, armazenados em temperaturas abaixo de zero (-196°C, -80°C e -20°C) por 1 hora em função das concentrações (%) do crioprotetor glicerol.

Quando se utilizou o carmim-acético para verificar a viabilidade polínica, neste mesmo período de armazenamento, houve diferença significativa quando se avaliou a interação tripla entre temperatura, crioprotetor e concentração.

Os valores médios de proporção de grãos de pólen viáveis, em função do crioprotetor, concentrações (%) e temperaturas (°C), apresentaram-se significativos para os diferentes descritos na Tabela 2. Neste período de congelamento, as análises da regressão dos viáveis, para este corante, no uso de DMSO e de glicerol não apresentaram efeito significativo em relação às diferentes concentrações.

TABELA 2 Valores médios proporção de grãos de pólen viáveis analisados com Carmim-acético 1%, armazenados por uma hora em função do crioprotetor (Glicerol e DMSO), concentrações (%) e temperaturas (°C) analisados.

Temperatura	Concentração	Crioprotetor	
		DMSO	Glicerol
-196	0	0,9575a	0,8350b
	5	0,9925a	0,9550a
	10	0,9025a	0,9475a
	15	0,9650a	0,9400a
-80	0	0,9625a	0,9575a
	5	0,9625a	0,8675b
	10	0,9375a	0,9125a
	15	0,9375a	0,9450a
-20	0	0,9550a	0,9000b
	5	0,9700a	0,9625a
	10	0,9250a	0,9500a
	15	0,8200b	0,9475a

¹Médias seguidas de mesma letra na linha dentro de cada combinação (Temperatura-Concentração), não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com um nível nominal de significância de 5%.

b) Inviabilidade polínica

Para análise da variância da proporção dos grãos de pólen inviáveis corados com R.Alexander, observados neste trabalho para a proporção de grãos de pólen inviáveis em uma hora de congelamento indicou que apenas o fator temperatura foi significativo ($p < 0,05$).

Na Figura 6 verificou-se que os valores médios e estimados de proporção de grãos de pólen inviáveis, em função das temperaturas (°C) indicaram a necessidade do armazenamento em temperaturas menores do que -20°C já que a maior proporção significativa de grãos de pólen inviáveis pode ser observada nesta temperatura.

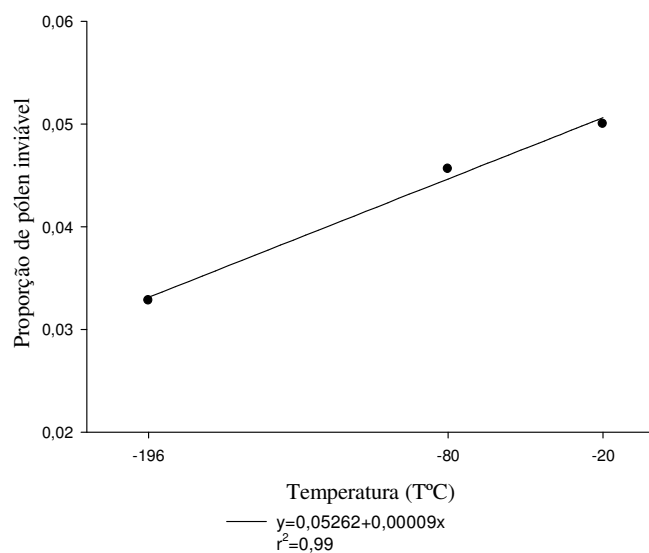


FIGURA 6 Valores médios e estimados da proporção de grãos de pólen nviáveis em função das temperaturas (-196°C, -80°C e -20°C) por 1 hora e analisados em corante citológico, Reativo de Alexander a 1%.

Quando se avaliou os grãos de pólen inviáveis corados com carmim dos fatores temperatura de armazenamento, concentração e tipo de crioprotetores, indicaram que apenas a interação entre os fatores crioprotetor (glicerol e DMSO) e concentração são significativas. Os valores médios de proporção de grãos de pólen inviáveis, em função dos crioprotetores e das concentrações, apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos testados (Tabela 3).

TABELA 3 Valores médios proporção de grãos de pólen inviáveis analisados com Carmim-acético 1%, armazenados por 1 (uma) hora em função do crioprotetor (%) e das concentrações analisados.

Concentrações (%)	Crioprotetor ¹	
	DMSO	Glicerol
0	0,0150a	0,0233a
5	0,0058a	0,0225b
10	0,0383a	0,0217b
15	0,0283a	0,0100b

¹Médias seguidas de mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com um nível nominal de significância de 5%.

O menor número de pólenes inviáveis quando criopreservados com glicerol deve-se, entre outros fatores, às propriedades atóxicas deste poliálcool, reconhecidas desde 1959, sendo por isso permitido como aditivo em alimentos. É considerado como um agente crioprotetor, pois não permite a formação de cristais de gelo na célula, mantendo a estabilidade da parede celular e vitalidade da mesma durante o processo de congelamento para sua conservação (Arruda et al., 2007).

Outra característica do glicerol é seu papel como osmorregulador, importante mecanismo que naturalmente ocorre nas células como reação a fatores ambientais como, por exemplo, o aumento da pressão osmótica. Assim, em resposta a estas alterações e como forma de manutenção da estabilidade celular, esta responde através de mecanismos de osmorregulação como no caso a produção de glicerol pela célula, o que acarreta em diminuição da permeabilidade da membrana e restabelecimento da atividade celular (Brisson et al., 2001).

c) Grãos de pólen rompidos

Na análise de variância dos grãos de pólen rompidos utilizando-se o corante Alexander observou-se que a interação tripla entre temperatura, crioprotetor e concentração foi significativa ($p < 0,05$).

Na Tabela 4 verificou-se que o maior número de grãos de pólen rompidos foi obtido nas temperaturas de -80°C e -20°C , diferindo significativamente nas diferentes concentrações de crioprotetores DMSO e Glicerol utilizados, sendo a maior proporção de grãos de pólen rompidos encontrados no crioprotetor DMSO sugerindo o potencial tóxico da substância com o aumento da temperatura de armazenamento neste período de congelamento (Chen et al., 1984; Gonzalez-Arno et al., 2008).

Na Figura 7, verificou-se a proporção de grãos de pólen rompidos no período de 1(uma) hora de armazenamento nas regressões para as concentrações dentro de cada temperatura para os crioprotetores. Para o uso do DMSO na análise de regressão do crioprotetor, observou-se um maior efeito na concentração de 15% a -20°C (Figura 7). No entanto, a utilização de glicerol não apresentou diferença significativa entre as diferentes temperaturas de armazenamento e as diferentes concentrações do crioprotetor glicerol.

TABELA 4 Valores médios da proporção de grãos de pólen rompidos, em função do crioprotetor, concentrações (%) e temperaturas (° C) analisados em corante citológico, Reativo de Alexander 1% por 1 hora de armazenamento.

Temperatura	Concentração	Crioprotetor ¹	
		DMSO	Glicerol
-196	0	0,0175b	0,0725a
	5	0,0275a	0,0325a
	10	0,0375a	0,0325a
	15	0,0100a	0,0325a
-80	0	0,0325a	0,0000b
	5	0,0250a	0,0300a
	10	0,0450b	0,1000a
	15	0,0575a	0,0750a
-20	0	0,0325a	0,0050a
	5	0,0575a	0,0100b
	10	0,1000a	0,0075b
	15	0,1400a	0,0475b

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha dentro de cada combinação (Temperatura-Concentração), não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com um nível nominal de significância de 5%.

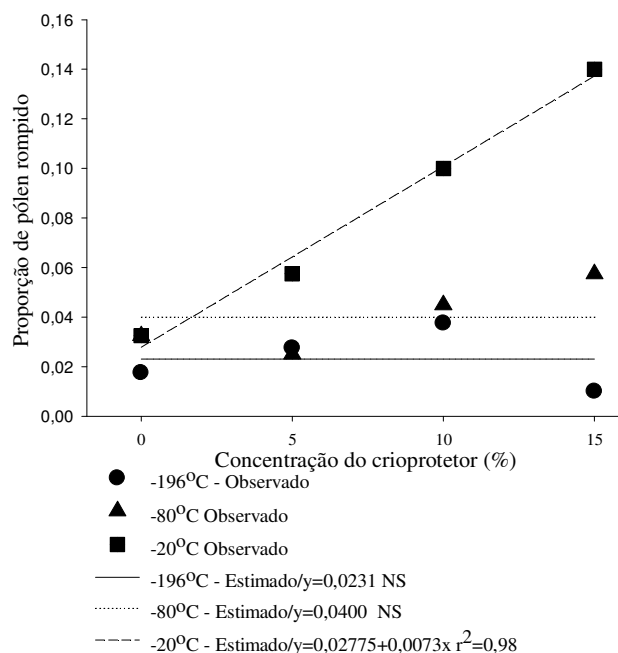


FIGURA 7 Valores médios e estimados da proporção de grãos de pólen rompidos observados em corante citológico, Reativo de Alexander 1%, para cada temperatura em função das concentrações no crioprotetor DMSO armazenados por 1 hora.

Para análise da variância da proporção dos grãos de pólen rompidos com a utilização do corante carmim verificou-se que a interação tripla entre temperatura, crioprotetor e concentração do crioprotetor foi significativa após uma hora de congelamento.

Os valores médios de proporção de grãos de pólen rompidos apresentam diferenças significativas, em função do crioprotetor, concentrações (%) e temperaturas (°C) (Tabela 5) apresentando diferença significativa entre os controles. Na análise de regressão para proporção de grãos de pólen rompidos não foram observados efeitos significativos do uso de crioprotetor, DMSO e glicerol, para cada concentração nas diferentes temperaturas de congelamento.

TABELA 5 Valores médios proporção de grãos de pólen rompidos analisados com Carmim-acético 1%, armazenadas por uma hora, em função do crioprotetor, concentrações (%) e temperaturas (°C) analisados.

Temperatura	Concentração	Crioprotetor ¹	
		DMSO	Glicerol
-196	0	0,0275b	0,1475a
	5	0,0025a	0,0375a
	10	0,0475a	0,0300a
	15	0,0275a	0,0525a
-80	0	0,0300a	0,0200a
	5	0,0300b	0,0925a
	10	0,0225b	0,0725a
	15	0,0200a	0,0425a
-20	0	0,0225b	0,0700a
	5	0,0250a	0,0175a
	10	0,0750a	0,0225b
	15	0,1450a	0,0425b

¹ Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha dentro de cada combinação (Temperatura-Concentração), não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com um nível nominal de significância de 5%.

5.2.2 Análise após o período de 15 dias de congelamento

a) Viabilidade polínica

A análise da variância dos resultados de proporção de viabilidade após 15 dias de congelamento demonstra que há interação tripla entre temperatura, crioprotetor e concentração foi significativa. Os valores médios de proporção de grãos de pólen viáveis, em função do crioprotetor, concentrações (%) e temperaturas (°C) observados na Tabela 6 demonstraram a diferença significativa entre os diferentes tratamentos, sendo em geral as maiores proporções observadas em concentrações de glicerol.

Na Figura 8 observou-se que nas regressões para as concentrações dentro de cada temperatura para os crioprotetores, a viabilidade polínica

descrece significativamente com o aumento da concentração de DMSO nas temperaturas de -196°C e -80°C durante 15 dias de armazenamento. Na análise de regressão para o uso do glicerol, não houve diferença significativa na utilização do crioprotetor nas diferentes concentrações testadas.

TABELA 6 Valores médios proporção de grãos de pólen viáveis, em função do crioprotetor, concentrações (%) e temperaturas (°C) analisados em corante citológico, Reativo de Alexander 1% por 15 dias de armazenamento.

Temperatura	Concentração	Crioprotetor ¹	
		DMSO	Glicerol
-196	0	0,8750a	0,6550b
	5	0,6575a	0,6275a
	10	0,6250b	0,7775a
	15	0,4975b	0,6375a
-80	0	0,7600b	0,8825a
	5	0,6925a	0,4325b
	10	0,5050a	0,5625a
	15	0,4350a	0,5100a
-20	0	0,5925b	0,7650a
	5	0,6450b	0,7950a
	10	0,6475a	0,6575a
	15	0,3400b	0,6725a

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha dentro de cada combinação (Temperatura-Concentração), não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com um nível nominal de significância de 5%.

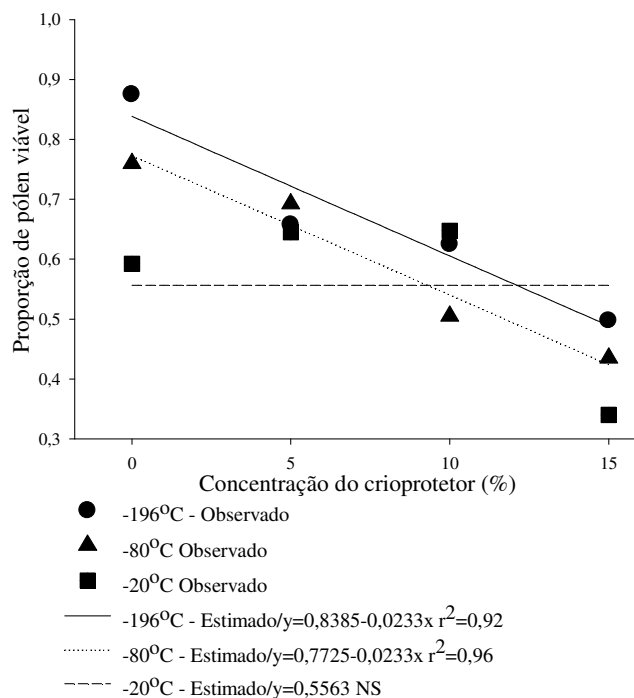


FIGURA 8 Valores médios e estimados da proporção de grãos de pólen viáveis criopreservados por 15 dias e corados com R. Alexander, para cada temperatura (-196°C, -80°C e -20°C) em função das concentrações (0% 5%, 10% e 15%) no crioprotetor DMSO.

Na análise de variância para a proporção de grãos de pólen viáveis criopreservados por até 15 dias e analisados com o corante carmim-acético indica que a interação tripla entre temperatura, crioprotetor e concentração foi significativa.

Verificou-se que os valores médios de proporção de grãos de pólen viáveis apresentaram diferenças significativas, em função do crioprotetor, das concentrações (%) e das temperaturas (°C) (Tabela 7). Nas análises de regressão dos grãos de pólen viáveis corados com carmim-acético após o período de 15 dias de armazenamento observou-se que não houve efeito significativo dentre as

diferentes concentrações de crioprotetor utilizados, tanto para o uso do DMSO como no uso de glicerol, nas diferentes concentrações testadas.

TABELA 7 Valores médios proporção de grãos de viáveis armazenadas por 15 dias e analisados com carmim-acético a 1%, em função do crioprotetor, concentrações (%) e temperaturas (°C) analisados.

Temperatura	Concentração	Crioprotetor ¹	
		DMSO	Glicerol
-196	0	0,4250b	0,6875a
	5	0,5250b	0,8750a
	10	0,4725b	0,7225a
	15	0,4075b	0,5200a
-80	0	0,4250b	0,8250a
	5	0,7700a	0,4275b
	10	0,5500a	0,6300a
	15	0,4800a	0,5350a
-20	0	0,7000a	0,7450a
	5	0,6725a	0,5950a
	10	0,5825b	0,7300a
	15	0,6075b	0,7050a

¹ Médias seguidas de mesma letra na linha dentro de cada combinação (Temperatura-Concentração), não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com um nível nominal de significância de 5%.

b) Inviabilidade polínica

Os resultados de grãos de pólen inviáveis com o corante R.Alexander, após 15 dias de congelamento analisados demonstraram que a interação entre temperatura e crioprotetor e a interação entre crioprotetor e concentração foram singnificativas ($p < 0,05$).

Os valores médios para a proporção desses grãos de pólen inviáveis, em função do crioprotetor e das temperaturas (°C) indicam que houve diferença significativa entre o uso dos crioprotetores DMSO e Glicerol quando os grãos

de pólen foram armazenados em nitrogênio líquido a -196°C (Tabela 8). Para os valores médios entre as concentrações dos crioprotetores utilizados, apenas o uso em 10% e 15% apresentaram diferença significativas entre os crioprotetores (Tabela 9).

TABELA 8 Valores médios proporção de grãos de pólen inviáveis corados com R.Alexander a 1%, criopreservados por 15 dias em função do crioprotetor (%) e temperaturas (°C) analisados.

Temperatura	Crioprotetor ¹	
	DMSO	Glicerol
-196	0,0231a	0,0131b
-80	0,0113a	0,0150a
-20	0,0100a	0,0181a

¹Médias seguidas de mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com um nível nominal de significância de 5%.

TABELA 9 Valores médios proporção de grãos de pólen inviáveis corados com R.Alexander a 1%, criopreservados por 15 dias em função do crioprotetor e das concentrações (%) analisados.

Concentração (v/v) (%)	Crioprotetor	
	DMSO	Glicerol
0	0,0142a	0,0133a
5	0,0117b	0,0217a
10	0,0200a	0,0083b
15	0,0133a	0,0183a

Médias seguidas de mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com um nível nominal de significância de 5%.

Com a utilização do carmim, após 15 dias de congelamento, verificou-se, na análise de variância para grãos de pólen inviáveis, que nenhum fator nem as interações foram significativos.

c) Grãos de pólen rompidos

Verificou-se que nos grãos de pólen rompidos após 15 dias de armazenamento, a interação tripla entre temperatura, crioprotetor e concentração foram significativas ($p < 0,05$). Pelos valores médios de proporção de grãos de pólen rompidos, em função do crioprotetor, concentrações (%) e temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) analisados em 15 dias de armazenamento, verificou-se que a maior proporção de grãos de pólen rompidos foi obtida nas temperaturas de -80°C e -20°C (Tabela 10).

TABELA 10 Valores médios proporção de grãos de pólen rompidos corados com R. Alexander a 1%, em função do crioprotetor, concentrações (%) e temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) analisados.

Temperatura	Concentração	Crioprotetor	
		DMSO	Glicerol
-196	0	0,3875a	0,2225b
	5	0,3425a	0,1850b
	10	0,3175a	0,3300a
	15	0,6375a	0,3200b
-80	0	0,2300a	0,1050b
	5	0,2975b	0,5450a
	10	0,4825a	0,4275a
	15	0,5525a	0,4750a
-20	0	0,1125b	0,3300a
	5	0,3300a	0,3500a
	10	0,3650a	0,2200b
	15	0,4975a	0,3300b

¹Médias seguidas de mesma letra na linha dentro de cada combinação (Temperatura-Concentração), não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com um nível nominal de significância de 5%.

Para análise da regressão descrita na Figura 9, observou-se o efeito crescente sobre a proporção de grãos de pólen rompidos com o aumento da concentração de crioprotetor DMSO quando armazenadas a -80°C e -20°C. No entanto, o mesmo não foi observado na análise de regressão para os grãos de pólen criopreservados quando se utilizou como crioprotetor o glicerol, neste corante.

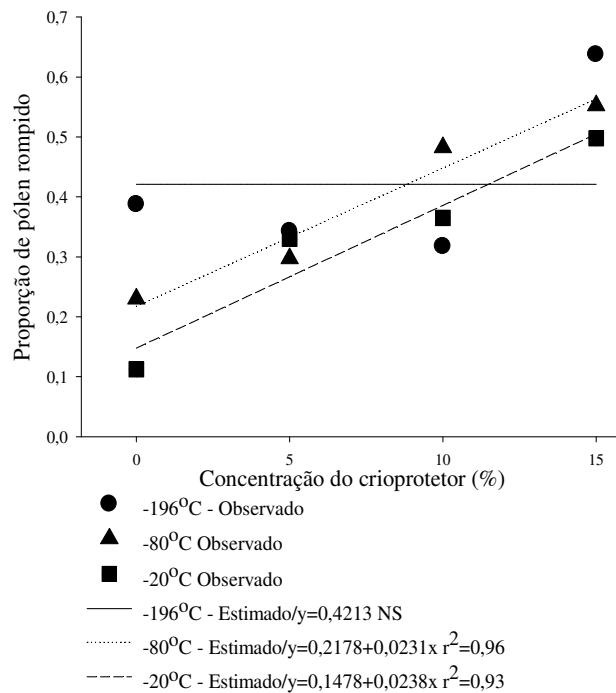


FIGURA 9 Valores médios e estimados da proporção de grãos de pólen rompidos corados com R.Alexander criopreservados para cada temperatura em função das concentrações no crioprotetor DMSO por 15 dias.

Para a análise da variância com o carmim-acético da proporção de grãos de pólen rompidos, neste mesmo período de armazenamento, observou-se que a interação tripla entre temperatura, crioprotetor e concentração foi significativa ($p<0,05$). Os valores médios de proporção de grãos de pólen rompidos, em

função do crioprotetor, concentrações (%) e temperaturas (°C) apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos analisados (Tabela 11). A análise de regressão para os crioprotetores, DMSO e Glicerol, não apresentou efeito significativo entre as diferentes temperaturas em função das diferentes concentrações utilizadas.

TABELA 11 Valores médios proporção de grãos de pólen rompidos criopreservados por até 15 dias e analisados com carmim-acético, em função do crioprotetor, concentrações (%) e temperaturas (°C) analisados.

Temperatura	Concentração	Crioprotetor	
		DMSO	Glicerol
-196	0	0,5625a	0,3000b
	5	0,4575a	0,1200b
	10	0,5250a	0,2750b
	15	0,5650a	0,4725b
-80	0	0,5625a	0,1675b
	5	0,2250b	0,5500a
	10	0,4350a	0,3625a
	15	0,5050a	0,4525a
-20	0	0,2925a	0,2525a
	5	0,3200a	0,3975a
	10	0,4150a	0,2675b
	15	0,3825a	0,2850b

¹ Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha dentro de cada combinação (Temperatura-Concentração), não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com um nível nominal de significância de 5%.

5.2.3 Análise após 30 dias de congelamento

a) Viabilidade polínica

Na análise da variância da viabilidade polínica verificada com o Reativo de Alexandre apresentou diferença significativa quando se avaliou a proporção de

grãos de pólen viáveis armazenados em 30 dias, observou-se a interação tripla entre temperatura, crioprotetor e concentração significativa.

Na avaliação dos valores médios da proporção de grãos de pólen viáveis, em função do crioprotetor, concentrações (%) e temperaturas (°C) verificou-se uma diferença significativa entre os crioprotetores glicerol e DMSO (Tabela 12).

Verificou-se que não houve interação significativa para a proporção de grãos de pólen viáveis quando criopreservados com DMSO em diferentes concentrações. Todavia, houve diferença significativa com a utilização de glicerol na viabilidade dos grãos de pólen armazenados a -20°C (Figura 10).

TABELA 12 Valores médios proporção de grãos de pólen viáveis corados com R. Alexander criopreservados por 30 dias, em função do crioprotetor, concentrações (%) e temperaturas (°C) analisados.

Temperatura	Concentração	Crioprotetor ¹	
		DMSO	Glicerol
-196	0	0,9100a	0,9325a
	5	0,4500b	0,6675a
	10	0,5275b	0,8700a
	15	0,4625b	0,8250a
-80	0	0,9550a	0,8950a
	5	0,3925b	0,8025a
	10	0,4150b	0,8775a
	15	0,3250a	0,8450b
-20	0	0,9475a	0,9800a
	5	0,5525b	0,8200a
	10	0,6125a	0,6525a
	15	0,3625b	0,5675a

¹ Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha dentro de cada combinação (Temperatura-Concentração), não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com um nível nominal de significância de 5%.

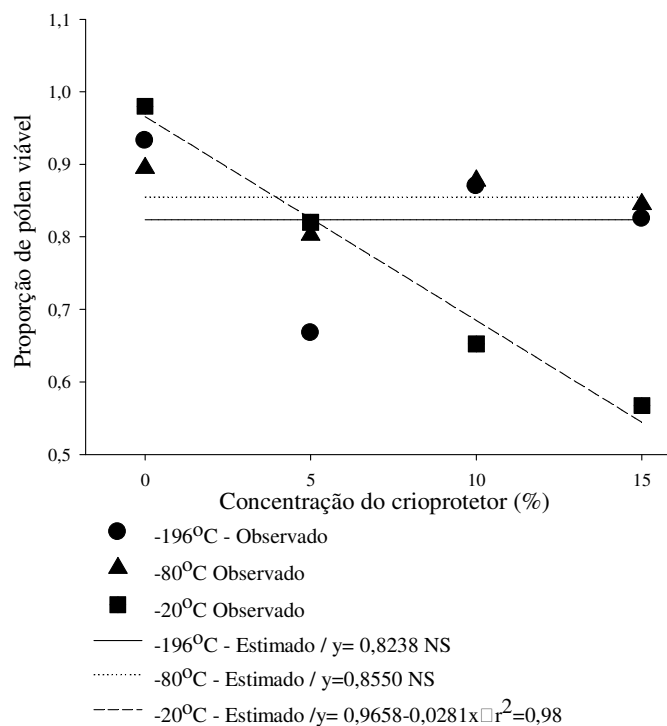


FIGURA 10 Valores médios e estimados da proporção de grãos de pólen viáveis criopreservados e analisados com Reativo de Alexander em 30 dias de armazenamento, para cada temperatura em função da concentrações no crioprotetor Glicerol.

Para a análise da variância da proporção de grãos de pólen viáveis com carmin-acético após 30 dias de congelamento, observou-se que a interação tripla entre temperatura, crioprotetor e concentração foi significativa ($p < 0,05$).

Os valores médios de proporção de grãos de pólen viáveis, em função do crioprotetor, concentrações (%) e temperaturas (°C) apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 13). Na análise da regressão para os crioprotetores, DMSO e Glicerol, não apresentam efeitos significativos em função das diferentes concentrações e temperaturas de armazenamento.

TABELA 13 Valores médios proporção de grãos de pólen criopreservados por 30 dias e analisados com carmim-acético a 2%, em função do crioprotetor, concentrações (%) e temperaturas (°C) analisados.

Temperatura	Concentração	Crioprotetor	
		DMSO	Glicerol
-196	0	0,9600a	0,9925a
	5	0,6125b	0,8500a
	10	0,7325a	0,7025a
	15	0,3850b	0,7025a
-80	0	0,9550a	0,9150a
	5	0,4775b	0,7925a
	10	0,4200b	0,8550a
	15	0,3800b	0,8450a
-20	0	0,9425a	0,9650a
	5	0,6125a	0,6750a
	10	0,6875b	0,8650a
	15	0,5525b	0,8150a

1 Médias seguidas de mesma letra na linha dentro de cada combinação (Temperatura-Concentração), não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com um nível nominal de significância de 5%.

b) Inviabilidade polínica

No que diz respeito à análise da variância para os grãos de pólen inviáveis utilizando-se o R.Alexander, no período de 30 dias de criopreservação verificou-se que os fatores temperatura, crioprotetor e concentração e a interação entre eles não foram significativos ($p > 0,05$).

Na análise de variância da proporção de grãos de pólen inviáveis com o carmim-acético, a interação entre temperatura e crioprotetor e a interação entre crioprotetor e concentração foram singnificativas ($p < 0,05$).

Os valores médios de proporção de grãos de pólen inviáveis, em função do crioprotetor e das temperaturas (°C) apresentam diferenças significativas entre o uso de DMSO e Glicerol a -80°C (Tabela 14). Para a proporção de grãos

de pólen inviáveis observou-se diferença significativa entre a do DMSO e Glicerol na concentração de 5%, entretanto, o controle apresentou menor número de grãos de pólen inviáveis (Tabela 15).

TABELA 14 Valores médios de proporção de grãos de pólen inviáveis criopreservados por 30 dias e analisados com carmim-acético a 2%, em função do crioprotetor (%) e temperaturas (°C) analisados.

Temperatura	Crioprotetor ¹	
	DMSO	Glicerol
-196	0,0106a	0,0125a
-80	0,0088b	0,0256a
-20	0,0175a	0,0113a

¹Médias seguidas de mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com um nível nominal de significância de 5%.

TABELA 15 Valores médios de proporção de grãos de pólen inviáveis criopreservados por 30 dias e analisados com carmim-acético a 2%, em função do crioprotetor (%) e das concentrações analisados.

Temperatura	Crioprotetor ¹	
	DMSO	Glicerol
0	0,0083a	0,0067a
5	0,0083b	0,0217a
10	0,0117a	0,0100a
15	0,0208a	0,0275a

¹Médias seguidas de mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com um nível nominal de significância de 5%.

c) Rompimento dos grãos de pólen

Contudo, para a análise da variância dos grãos de pólen rompidos após 30 dias de congelamento, verificou-se que a interação tripla entre temperatura, crioprotetor e concentração, foram significativas ($p < 0,05$). Na análise dos

valores médios de proporção de grãos de pólen rompidos em função do crioprotetor, concentrações (%) e temperaturas (°C) (Tabela 16).

Para análise da regressão dos grãos de pólen rompidos, observou-se que não houve efeito significativo do DMSO sobre o rompimento dos grãos de pólen, porém com a utilização do glicerol verificou-se o efeito significativo quando os grãos de pólen foram submetidos a temperatura de freezer a -20°C. (Figura 11).

TABELA 16 Valores médios de proporção de grãos de pólen rompidos corados com R.Alexander a 1% crioprescadas por até 30 dias, em função do crioprotetor, concentrações (%) e temperaturas (°C) analisados.

Temperatura	Concentração	Crioprotetor ¹	
		DMSO	Glicerol
-196	0	0,0675a	0,0650a
	5	0,5450a	0,3200b
	10	0,4525a	0,1150b
	15	0,5225a	0,1650b
-80	0	0,0350a	0,0975a
	5	0,6050a	0,1850b
	10	0,5700a	0,1200b
	15	0,6625a	0,1100b
-20	0	0,0500a	0,0100a
	5	0,4425a	0,1700b
	10	0,3800a	0,3350a
	15	0,6325a	0,4200b

¹ Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha dentro de cada combinação (Temperatura-Concentração), não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com um nível nominal de significância de 5%.

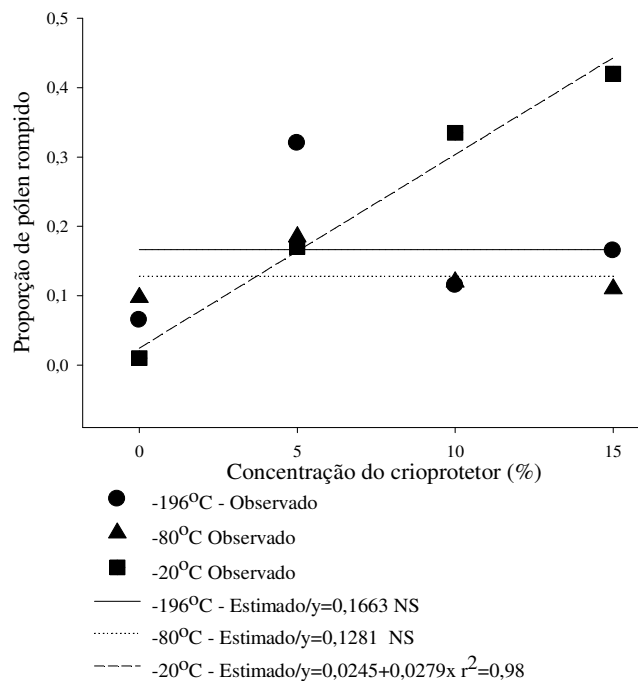


FIGURA 11 Valores médios e estimados da proporção de grãos de pólen rompidos e corados com R. Alexander, criopreservados e analisados após 30 dias de armazenamento para cada temperatura em função das concentrações no crioprotetor glicerol.

Para a análise de variância do rompimento com carmim-acético após 30 dias de congelamento verificou-se que a interação tripla entre temperatura, crioprotetor e concentração foi significativa ($p < 0,05$). Houve diferenças significativas entre os valores médios de proporção de grãos de pólen rompidos, em função do crioprotetor, concentrações (%) e temperaturas (°C), no entanto o maior número de grãos de pólen rompidos foi em média quando utiliza-se o DMSO como o crioprotetor (Tabela 17).

A análise da regressão para os crioprotetores utilizados não apresentou efeito significativo para as concentrações dentro de cada temperatura, tanto para o DMSO como para o Glicerol.

TABELA 17 Valores médios de proporção de grãos de pólen rompidos criopreservados por 30 dias e analisados com carmim-acético a 2%, em função do crioprotetor, concentrações (%) e temperaturas (°C) analisados.

Temperatura	Concentração	Crioprotetor	
		DMSO	Glicerol
-196	0	0,0350a	0,0025a
	5	0,3725a	0,1325b
	10	0,2600a	0,2900a
	15	0,6000a	0,2775b
-80	0	0,0350a	0,0725a
	5	0,5150a	0,1700b
	10	0,5800a	0,0875b
	15	0,6025a	0,1100b
-20	0	0,0475a	0,0325a
	5	0,3850a	0,3150b
	10	0,2850a	0,1200b
	15	0,4175a	0,1675b

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha dentro de cada combinação (Temperatura-Concentração), não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com um nível nominal de significância de 5%.

5.2.4 Análise após 6 (seis) meses de congelamento

a) Viabilidade polínica

Na análise da variância para a viabilidade, após seis meses verificou-se que a interação tripla entre temperatura, crioprotetor e concentração foi significativa ($p < 0,05$). Os valores médios de proporção de grãos de pólen viáveis, em função do crioprotetor, concentrações (%) e temperaturas (°C) indicadas na Tabela 18, apresentam diferenças significativas entre o DMSO e o Glicerol nas diferentes concentrações utilizadas.

Para a análise da regressão observou-se que não houve efeito significativo nos dois crioprotetores utilizados para as concentrações.

TABELA 18 Valores médios proporção de grãos de pólen viáveis, criopreservados por 6 meses e corados com R.Alexander a 1% em função do crioprotetor, concentrações (%) e temperaturas (°C) analisados.

Temperatura	Concentração	Crioprotetor	
		DMSO	Glicerol
-196	0	0,6775b	0,8175a
	5	0,5175b	0,6100a
	10	0,6775b	0,7875a
	15	0,6100b	0,7700a
-80	0	0,7300a	0,7325a
	5	0,5200b	0,7325a
	10	0,7925a	0,5300b
	15	0,5250a	0,5400a

¹ Médias seguidas de mesma letra na linha dentro de cada combinação (Temperatura-Concentração), não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com um nível nominal de significância de 5%.

Na análise da variância verificou-se que a interação tripla entre temperatura, crioprotetor e concentração foi significativa ($p < 0,05$) para as grãos de pólen viáveis por 6 meses corados com carmim-acético. Os valores médios de proporção de grãos de pólen viáveis, em função do crioprotetor, concentrações (%) e temperaturas (°C) apresentaram diferenças significativas (Tabela 19). Para a análise da regressão dos crioprotetores no período de 6 meses de congelamento neste corante, não se observou efeito significativo entre as diferentes concentrações utilizadas e as temperaturas (-196°C e -80°C) de armazenamento para grãos de pólen viáveis.

TABELA 19 Valores médios de proporção de grãos de pólen viáveis criopreservados por 6 meses e analisados com carmim-acético a 2%, em função do crioprotetor, concentrações (%) e temperaturas (°C) analisados.

Temperatura	Concentração do crioprotetor	Crioprotetor	
		DMSO	Glicerol
-196	0	0,7425a	0,7925a
	5	0,6050b	0,6900a
	10	0,6225b	0,7800a
	15	0,6450 ^a	0,6075a
-80	0	0,7875 ^a	0,6875b
	5	0,5225b	0,6875a
	10	0,7250 ^a	0,5575b
	15	0,5250 ^a	0,5775a

¹Médias seguidas de mesma letra na linha dentro de cada combinação (Temperatura-Concentração), não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com um nível nominal de significância de 5%.

b) Inviabilidade polínica

Na análise da variância para grãos de pólen inviáveis corados com R.Alexander criopreservados por 6 meses observou-se que a interação tripla entre temperatura, crioprotetor e concentração foi significativa ($p < 0,05$). Os valores médios de proporção de grãos de pólen inviáveis, em função do crioprotetor, concentrações (%) e temperaturas (°C) apresentam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos (Tabela 20).

Nas regressões para as concentrações dos crioprotetores dentro de cada temperatura, verificou-se que não houve efeito significativo nas diferentes concentrações do DMSO. Contudo, observou-se o efeito significativo para o aumento dos grãos de pólen inviáveis com o aumento da concentração do Glicerol (Figura 12).

TABELA 20 Valores médios de proporção de grãos de pólen inviáveis criopreservados por até 6 meses e analisados com Reativo de Alexander, em função do crioprotetor, concentrações (%) e temperaturas (°C) analisados.

Temperatura	Concentração	Crioprotetor ¹	
		DMSO	Glicerol
-196	0	0,0225a	0,0100a
	5	0,0025a	0,0200a
	10	0,0225a	0,0125a
	15	0,0125a	0,0075a
-80	0	0,0000a	0,0050a
	5	0,0075a	0,0050a
	10	0,0075a	0,0075a
	15	0,0025a	0,0050a

¹ Médias seguidas de mesma letra na linha dentro de cada combinação (Temperatura-Concentração), não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com um nível nominal de significância de 5%.

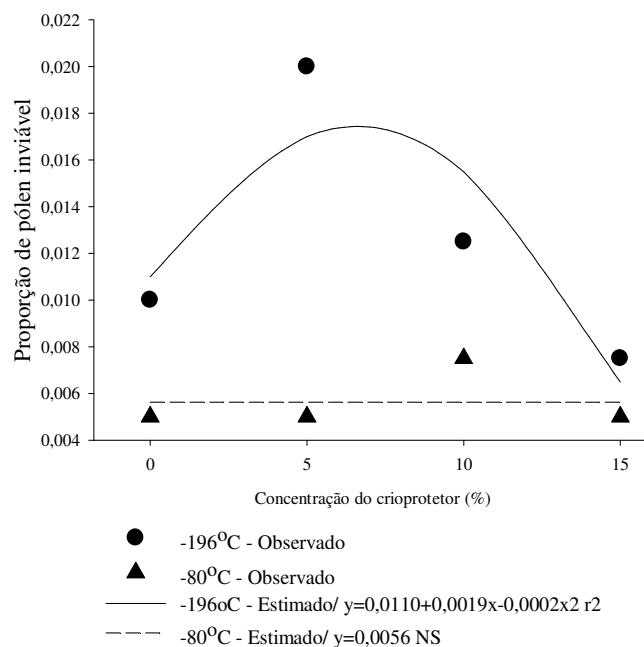


FIGURA 12 Valores médios e estimados da proporção de grãos de pólen inviáveis criopreservadas por até 6 meses e analisados com Reativo de Alexander para cada temperatura em função das concentrações no crioprotetor glicérol.

Na análise da variância para a proporção de células inviáveis coradas com carmim, no período de 6 meses de congelamento, não foram observadas diferenças significativas nos fatores (temperatura, crioprotetor e concentração do crioprotetor) e nem nas interações entre eles ($p > 0,05$).

c) Grãos de pólen rompidos

Verificou-se na análise de variância que a interação tripla entre temperatura, crioprotetor e concentração foi significativa para a análise da proporção de grãos de pólen inviáveis no período de 6 meses de congelamento ($p < 0,05$).

Na análise da variância dos grãos de pólen rompidos com R. Alexander, para o armazenamento por até 6 meses observou-se que a interação tripla entre

temperatura, crioprotetor e concentração foi significativa ($p < 0,05$). Para os valores médios de proporção de grãos de pólen rompidos, em função do crioprotetor, concentrações (%) e temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) observou-se diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 21).

Na análise de regressão dos crioprotetores com R. Alexander não se observou efeito significativo, tanto com o uso do DMSO, como no uso do glicerol.

TABELA 21 Valores médios de proporção de grãos de pólen rompidos criopreservados por até 6 meses e analisados com Reativo de Alexander, em função do crioprotetor, concentrações (%) e temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) analisados.

Temperatura	Concentração	Crioprotetor ¹	
		DMSO	Glicerol
-196	0	0,3000a	0,1725b
	5	0,4800a	0,3700b
	10	0,3000a	0,2000b
	15	0,3775a	0,2225b
-80	0	0,2700a	0,2625a
	5	0,4725a	0,2625b
	10	0,2000b	0,4625 ^a
	15	0,4725a	0,4550 ^a

¹ Médias seguidas de mesma letra na linha dentro de cada combinação (Temperatura-Concentração), não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com um nível nominal de significância de 5%.

Os valores médios de proporção de grãos de pólen rompidos corados com carmim, em função do crioprotetor, concentrações (%) e temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) foram significativas nos diferentes concentrações dos crioprotetores analisados (Tabela 22). Na análise de regressão para os crioprotetores DMSO e Glicerol, respectivamente, verificou-se que não há efeito significativo para as concentrações dentro de cada temperatura.

TABELA 22 Valores médios de proporção de grãos de pólen viáveis criopreservados por 6 meses e analisados com carmim-acético a 2%, em função do crioprotetor, concentrações (%) e temperaturas (°C) analisados.

Temperatura	Concentração	Crioprotetor	
		DMSO	Glicerol
-196	0	0,2525a	0,2000a
	5	0,3900a	0,3000b
	10	0,3600a	0,2150b
	15	0,3475a	0,3825a
-80	0	0,2050b	0,3000a
	5	0,4725a	0,3000b
	10	0,2675b	0,4200a
	15	0,4550a	0,4150a

¹ Médias seguidas de mesma letra na linha dentro de cada combinação (Temperatura-Concentração), não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com um nível nominal de significância de 5%.

O baixo teor de lipídeos dos grãos de pólen de *R. communis* (Capítulo 3) pode ter propiciado a menor deterioração. Para sementes, segundo Harrington (1972), a auto-oxidação de lipídios produz radicais livres, mesmo em sementes com baixo teor de água, que podem combinar com proteínas e nucleotídeos, destruindo enzimas, lipoproteínas, DNA e a capacidade reprodutiva das células. Contendo baixo teor de lipídeo, é provável que os grãos de pólen da espécie mantenham sua qualidade fisiológica por um período mais prolongado que o estudado neste trabalho. No entanto, o teor elevado de proteínas pode contribuir para a redução do potencial de armazenamento, devido à elevada afinidade dessa substância com a água (descrito no Capítulo 3).

De acordo com os resultados apresentados, não se notou o efeito negativo considerável do congelamento sobre a viabilidade do pólen da espécie estudada nas diferentes temperaturas de armazenamento.

Segundo Sousa (1990) a menor umidade do grão de pólen do eucalipto propicia maior viabilidade polínica em comparação ao recém-colhido. Para Kartha (1985), durante o processo de descongelamento pode haver a liberação de alguns nutrientes necessários à germinação do pólen. Para o pólen de *Juglans regia* a umidade ideal para o congelamento era entre 3,2 e 7,0% (Luza & Polito, 1988). De acordo com Copes (1987), o pólen de *Pseudotsuga menziesii* pode ser armazenado com umidade entre 4 e 7%. Existem, também, espécies cujos grãos de pólen perdem a viabilidade com a secagem drástica, como *Simmondria chinensis* e *Zea mays*.

Geralmente, o teor de umidade máximo do grão de pólen, anteriormente ao seu congelamento, para diversas espécies, está entre 20 e 40%. A umidade elevada é prejudicial para a viabilidade do material criopreservado, pois concorre para a formação de gelo intracelular. Por outro lado, o limite inferior estimado entre 1% e 5% pode igualmente propiciar a redução da viabilidade (Kartha, 1985). No caso da mamona, neste trabalho o teor de umidade corrobora com as sugestões dos autores citados para tolerância ao congelamento.

Pesquisas sobre viabilidade de pólen estocado para ser utilizado em cruzamento estão sendo realizadas em diversas espécies de clima subtropical e tropical, no entanto, estes estudos têm sido em menor escala, sendo estes realizados com principalmente com abacateiro, citros e coqueiro (Gonçalves, 2005).

A viabilidade do pólen *in vitro* e *in vivo* do maracujazeiro-amarelo estudada por Buckner et al. (2000) após o armazenamento em diferentes condições de temperatura foi possível somente por 24 horas a temperatura ambiente (27°C).

A capacidade de armazenamento dos grãos de pólen entre as espécies estudadas varia muito. Contudo, os grãos de pólen de mamona demonstram a possibilidade de estocagem ao longo prazo, contribuindo suficientemente para as

pesquisas de melhoramento genético da espécie num período de até 6 meses de armazenamento com boas perspectivas de armazenamento em condições controladas.

5.3 Integridade do DNA nuclear

Pela análise por citometria de fluxo do conteúdo de DNA nuclear em células em interfase de grãos de pólen, verificou-se que houve diferença entre os grãos de pólen armazenados em nitrogênio líquido (-196°C) nas diferentes concentrações de crioprotetores (DMSO e glicerol) (Tabela 22). Pelos resultados, verificou-se que os valores de *sub-G1* são relativamente altos, o que evidencia, de certo modo, que o material não foi perfeitamente criopreservado, pois esta fração é um indicativo de fragmentos de núcleos ou núcleos com tamanho inferior ao do padrão utilizado. No entanto, detectou-se a existência de núcleos intactos em todos os tratamentos, representada pelos valores em percentuais G1.

Grãos de pólen mantidos em nitrogênio líquido sem a utilização de crioprotetor apresentaram valor de *sub-G1* igual a 88%, ou seja, apenas 12% dos núcleos permaneceram intactos a -196°C (controle). Nota-se que o crioarmazenamento em nitrogênio líquido (-196°C) favoreceu a integridade do DNA nuclear dos grãos de pólen crioprotetidos, demonstrando a necessidade de utilização, principalmente com relação ao glicerol pela integridade nuclear proporcionada. Destaca-se, ainda, que haveria diferença significativa para o efeito da concentração do crioprotetor com o aumento significativo do percentual de núcleos intactos dos grãos de pólen (Tabela 22).

TABELA 23 Análise de quantidade de núcleos intactos (% G1) e fragmentos (% sub-G1) de grãos de pólen, armazenados em nitrogênio líquido a -196°C, por 30 dias, em diferentes concentrações de crioprotetores (DMSO e glicerol) e a média da viabilidade (T. Tukey a p> 0,05) polínica.

<i>Tratamentos</i>	<i>Sub x</i>	<i>x</i>	<i>Viabilidade polínica</i>
Controle	88	12	99,25a
DMSO 5%	76	24	61,25c
DMSO 10%	73	27	73,25bc
DMSO 15%	66	34	38,50d
GLICEROL 5%	63	37	85,00 b
GLICEROL 10%	68	32	70,25c
GLICEROL 15%	63	37	70,25c

Lezcano et al. (2004) também verificaram, pelo uso de citometria de fluxo, a toxicidade dos crioprotetores, DMSO e glicerol, sobre células espermáticas de peixes. Esses agentes, em concentrações de 5% a 30%, reduziram significativamente a viabilidade celular.

6 CONCLUSÕES

Métodos de coloração citológica com o uso do carmim-acético ou Reativo de Alexander, bem como o método indireto pela germinação *in vitro* do grão de pólen podem ser utilizados para a determinação da viabilidade do pólen de mamona.

A integridade do núcleo de grãos de pólen se submetidos à criopreservação a -196°C é satisfatória quando se utilizou como o crioprotetor o glicerol a 5% ou 15% por 30 dias de criopreservação.

A análise citológica indica que a viabilidade celular permanece alta do grão de pólen quando este é conservado por até seis meses (-80°C e -196°C).

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam a possibilidade de criopreservação, com o uso de crioprotetor glicerol, como uma alternativa viável para a conservação de grãos de pólen de *Ricinus communis*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, M. P. A Versatile stain for polle fungi, yeast and bactéria. **Stain Tecnology**, Baltimore, v. 55, p. 13-18, 1980.

ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina:** bases clínicas e farmacológicas. Buenos Aires: Isis Ediciones SLR, 1998. 947 p.

ARRUDA, P. V. de; RODRIGUES, R. de C. L. B.; FELIPE, M. das G. de A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 26, p. 56-63, dez. 2006/jan. 2007.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS. **Methods of the association of official analitical chemists.** 15. ed. Washington, 1990. 684 p.

BATTISTIN, A. **Morfologia floral e biologia da reprodução de cinco espécies de *Centrosema* (DC.) BENTH. (*Leguminosae – Papilionoideae*).** 1983. 119 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, São Paulo.

BERJAK, P.; WALKER, M.; MYCOCK, D. J.; WESLEYSMITH, J.; WATT, P.; PAMMENTER, N. W. Cryopreservation of recalcitrant zygotic embryos. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Ed.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm.** Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 2000. p. 140-155.

BINO, R. J.; TUYL, J. M. V.; VRIES, J. N. D. Flow cytometric determination of relative nuclear DNA contents in bicellulate and tricellulate pollen. **Annals of Botany**, Wageningen, v. 65, n. 1, p. 3-8, 1990.

BREWBAKER, J. L.; KWACK, B. H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. **American Journal of Botany**, New York, v. 50, p. 859-865, 1963.

BRISSON, D.; VOHL, M. C.; ST-PIERRE, J.; HUDSON, T. J.; GAUDET, D. Glycerol: a neglected variable in metabolic process? **BioEssays**, London, v. 23, n. 6, p. 534-542, May 2001.

BRUCKNER, C. H.; SILVA, M. M. da; FALLEIRO, T. de M.; ANDRADE, B. B. de. Viabilidade do pólen de maracujazeiro sob diferentes condições de armazenamento. **Revista Ceres**, Lavras, v. 47, n. 273, p. 523-531, 2000.

CHEN, T. Y. H. H.; KARTHA, K. K.; CONSTABEL, F.; GUSTA, F. V. Freezing characteristics of cultured *Catharanthus roseus* (L). G. don cells treated with dimethylsulfoxide and sorbitol in relation to cryopreservation. **Plant physiology**, Washington, v. 75, n. 3, p. 720-725, 1984.

CONNOR, K. F.; TOWILL, L. E. Pollen handling protocol and hydration/dehydration characteristics of pollen for application to long-term storage. **Euphytica**, Wageningen, v. 68, p. 77-84, 1993.

COPES, D. L. Long term storage of douglas-fir pollens. **Forest Science**, Washington, v. 33, n. 1, p. 244-46, 1987.

DOLEZEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, Poznań, v. 38, p. 285-302, 1997.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 99-110, Jan. 2005.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In vitro cellular and developmental biology – plant**, Columbia, v. 40, n. 5, p. 427-433, Sept./Oct. 2004.

GONZAGA, T. W. C.; MATA, M. E. R. M. C.; SILVA, H.; DUARTE, M. E. M. Crioconservação de sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* Engl.), e baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 5, n. 2, p. 145-154, 2003.

GONÇALVES, E. C. P. **Técnicas para conservação de grãos de pólen de maracujá**. Portal Toda Fruta, Mar. 2005. Disponível em: <http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=8700>. Acesso em: 10 dez. 2008.

GONZALEZ-ARNAO, M. T.; PANTA, A.; ROCA, W. M.; ESCOBAR, R. H.; ENGELMANN, F. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, n. 1, p. 1-13, 2008.

GUERRA, M. S. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 142 p.

HOEKSTRA, F. A.; BRUINSMA, J. Respiration and vitality of binucleate and trinucleate pollen. **Plant Physiology**, Washington, v. 34, n. 3, p. 221-225, 1975.

JOHRI, B. M.; VASIL, J. K. Physiology of pollen. **Botanical Review**, Bronx, v. 27, n. 3, p. 325-381, 1961.

JOLY, A. B. **Botânica econômica** – as principais culturas brasileiras. São Paulo: Edusp, 1979. 66 p.

KARTHA, K. K. **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton: CRC, 1985. 276 p.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. **Techniques for pollinations biologists**. Niwot, Colorado: University of Colorado, 1993. 579 p.

LEZCANO, M.; GRANJA, C.; SALAZAR, M. The use of flow cytometry in the evaluation of cell viability of cryopreserved sperm of the marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Cryobiology**, San Diego, v. 48, n. 3, p. 349-356, 2004.

LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A. Microsporogênese de nove acessos de *Syzygium cumini* (L.). **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 11, n. 1, p. 95-106, 2004.

LOPES, K. P.; ALMEIDA, F. de A. C.; CARVALHO, M. J. F. C.; BRUNO, R. de L. A. Protocolo para crioconservação de mamona (*Ricinus communis* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, ENERGIA SUSTENTABILIDADE, 2004, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: Embrapa–CNPA, 2004. 1 CD-ROM.

LUZA, J. G.; POLITO, V. S. Cryopreservation of english walnut (*Juglans regia* L.) pollen. **Euphytica**, Wageningen, n. 37, p. 141-48, 1988.

PAEPE, R. D.; KOULOU, A.; PHAM, J. L.; BROWN, S. C. Nuclear DNA content and separation of *Nicotiana sylvestris* vegetative and generative nuclei at various stages of male gametogenesis. **Plant Science**, Limerick, v. 70, p. 255-265, 1990.

PAN, G.; ZHOU, Y.; FOWKE, L. C.; WANG, H. An efficient method for flow cytometric analysis of pollen and detection of 2n nuclei in *Brassica napus* pollen. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, n. 4, p. 196-202, 2004.

PEÑALOZA, A. P. S. **Caracterização de componentes biológicos da produção de sementes de *Arachis pintoi* (Leguminosae)**. 1995. 82 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Tecnologia. Universidade de Brasília, Brasília.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing reference index version 2.8.0. Vienna, Austria: Foundation for Statistical Computing, 2008. Pacote estatístico R Software livre UFG. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 16 nov. 2008.

RODRIGUES, R. F. 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.

SANTOS, I. R. I.; SALOMÃO, A. N.; MUNDIM, R. C.; RIBEIRO, F. N. S. **Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de café (*Coffea arabica* L.)**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. 4 p. (Embrapa. Comunicado Técnico, 69).

SANT, R.; PANIS, B.; TAYLOR, M.; TYAGI, A. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, p. 107-111, 2008.

SCORZA, R.; SHERMAN, W. B. Peaches. In: JANIK J.; MOORE, J. N. (Ed.). **Fruit breeding**. Nova York: J. Wiley, 1995. p. 325-440.

SENF, M. I.; HICKENBICK, M. C. M.; PAIM, N. R. Cytogenetic studies in species of the genus *Vigna* Savi (Leguminosae – Papilionoideae). **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 15, n. 2, p. 407-418, 1992.

SHIVANNA, K. R.; JOHRI, B. M. **The angiosperm pollen structure and function**. New Delhi: Wiley Eastern, 1985. 337 p.

SHIVANNA, K. R.; LINSKENS, H. F.; CRESTI, M. Pollen viability and vigor. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 81, n. 1, p. 38-42, 1991.

SHIVANNA, K. R.; RANGASWAMY, N. S. **Pollen biology: a laboratory manual**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. 119 p.

SILVA, A. C. T. F.; LEITE, I. C.; BRAZ, L. T. Avaliação da viabilidade do pólen como possível indicativo de tolerância a altas temperaturas em genótipos de tomateiro. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 12, p. 156-165, 2000.

SOUSA, V. A. **Criopreservação de pólen de *Eucalyptus* spp.** Colombo: Embrapa, 1990. 5 p. (Boletim de Pesquisa Florestal Embrapa, v. 21).

SOUSA, D. M. M.; SOUZA, E. B. M.; LIMA, L. H. G. M.; AMORIM, T. M. L.; SANTOS, T. S.; SANTOS, J. W. Estabelecimento de condições para a germinação de grãos de pólen da cultivar de mamona BRS 149 (Nordestina). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, ENERGIA SUSTENTABILIDADE, 2004, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. p. 1-5.

SOUZA, V. Q.; PEREIRA, A. da S.; FRITSCH NETO, R.; SILVA, G. O.; OLIVEIRA, A. C. Potential of selection among and within potato clonal families. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 5, p. 47-54, 2004.

STUSHNOFF, C.; SEUFFERHELD, M. Cryopreservation of apple (*Malus* species) genetic resources. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry: cryopreservation of plant germplasm I**. New York: Heidelberg, 1995. v. 32, p. 87-101.

TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V.; BEARZOTI, E. Cytotaxonomy of some species and interspecific hybrids of *Pennisetum* (Poaceae, Poales). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 2, p. 203-209, 2002.

TOWILL, L. E. Cryopreservation of plant germplasm. In: TOWILL, L. E.; BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Cryopreservation of plant germplasm II: biotechnology in agriculture and forestry**. Berlin: Springer, 2002. v. 2, p. 04-21.

YONGJIE, W.; ENGELMANN, F.; FRATTARELLI, A.; DAMIANO, C.;
WITHERS, L. A. Cryopreservation of strawberry cell suspension cultures.
Cryo-Letters, Cambridge, v. 18, p. 317-324, 1997.

CAPÍTULO 5

CULTIVO *IN VITRO* DE MAMONEIRA

1 RESUMO

A mamona (*Ricinus communis* L.) vem se destacando, no cenário nacional, por possuir propriedades medicinais e grande potencial para produção de biodiesel. A alta taxa de fecundação cruzada em sua propagação pela via sexuada resulta num elevado grau de variabilidade genética da espécie, o que tem dificultado a obtenção e manutenção de genótipos a campo. Além disso, a espécie tem comportamento recalcitrante *in vitro*, o que tem dificultado o estabelecimento de protocolos eficientes de micropropagação de mamona. Visando a otimização dos protocolos no cultivo *in vitro*, o objetivo deste trabalho foi estudar aspectos da micropropagação de mamoneiro. Portanto, foram avaliados os efeitos de diferentes reguladores de crescimento e composição química dos meios de cultivo em relação à germinação *in vitro*, a indução de brotações, e o enraizamento. Para a germinação avaliaram-se os ajustes de pH (4,8; 5,8 e 6,8), variações da concentração salina do meio MS (0%; 25%, 50%, 75%), e a adição de GA₃ (0; 1,0; 5,0; 10,0 e 20 mg L⁻¹). Para multiplicação *in vitro* gemas apicais foram inoculadas em meio MS e diferentes combinações de BAP (0; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹) e ANA (0; 0,01; 0,1 e 1,0 mg L⁻¹); e diferentes concentrações (0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) de Cinetina e Zeatina, isoladamente. No enraizamento dos explantes foram avaliadas diferentes concentrações de ANA (0; 1,5; 3,0; 6,0; 9,0 e 12,0 mg L⁻¹). O uso de GA₃ demonstrou efeito negativo na germinação. A concentração completa do meio MS e o ajuste do pH para 5,8 foram satisfatórios. A suplementação do meio de cultura com a utilização de ANA na concentração de 1,0 mg L⁻¹ foi determinante para a formação de plântulas não vitrificadas. Para o número de folhas o uso de altas concentrações de BAP e ANA, 2,0 mg L⁻¹ e 1,0 mg L⁻¹, respectivamente, favoreceu a maior formação. A utilização de Cinetina ou Zeatina favoreceu formação de calos e plântulas vitrificadas, sendo não indicadas para a indução de brotos *in vitro*. A adição de ANA foi eficiente para a formação de raízes sendo que o maior número e o maior comprimento foram verificados em concentração de 3,0 mg L⁻¹.

Palavras-chave: micropropagação, 6-benzilaminopurina, *Ricinus communis*.

2 ABSTRACT

The castor bean (*Ricinus communis* L.) has gained importance in the national scenario based on its medicinal properties and high potential for biodiesel production. The elevated rate of cross-fertilization through sexual reproduction results in high degree of genetic variability which difficulties the production and maintenance of field genotypes. Moreover, the species presents *in vitro* recalcitrant behavior which has diffculted the establishment of protocols for efficient micropropagation of castor beans. I order to optimize the *in vitro* protocols; the objective of this work was to study aspects of the micropropagation of castor bean plants. Therefore, the effect of different plant growth regulators and chemical composition of culture media on *in vitro* germination and induction of shoots and roots were evaluated. pH adjustment of (4.8, 5.8 and 6.8), salt concentration of MS medium (0%, 25%, 50% and 75%), addition of GA₃ (0, 1.0, 5.0, 10.0 and 20 mg L⁻¹) were evaluated for their effect on germination. *In vitro* apical buds were inoculated on MS medium with different combinations of BAP (0, 1.0, 1.5 and 2.0 mg L⁻¹) and NAA (0, 0.01, 0.1 and 1, 0 mg L⁻¹) and different concentrations (0, 0.5, 1.0 and 2.0 mg L⁻¹) of isolated kinetin and zeatin were evaluated for multiplication. For rooting, different concentrations of NAA (0, 1.5, 3.0, 6.0, 9.0 and 12.0 mg L⁻¹) were tested. The use of GA₃ showed negative effect on germination. The use of complete MS medium and pH adjusted to 5.8 were satisfactory. Supplementation of culture medium with 1.0 mg L⁻¹ NAA was essential for the formation of non-vitrified plantlets. The use of high concentrations of BAP and NAA (2.0 and 1.0 mg L⁻¹, respectively) promoted the formation of leaves. The use of kinetin or zeatin promoted the formation of callus and vitrified plantlets, and thus is not indicated for the induction of shoots *in vitro*. The addition of NAA was effective for the formation of roots with high number and length obtained using 3.0 mg L⁻¹.

Key words: micropropagation, 6-benzilaminopurine, *Ricinus communis*.

3 INTRODUÇÃO

A família Euphorbiaceae é uma das maiores famílias dentro das Angiospermas, com cerca de 290 gêneros e aproximadamente 7.500 espécies, distribuídas em todo o mundo, muito bem representadas na flora brasileira. (Joly, 2002). Dentre as espécies da família destacam-se as plantas oleaginosas, entre elas a mamoneira (*Ricinus communis* L.) com diversas aplicações industriais e, atualmente, para produção de biocombustível (Freire, 2008).

Dentre as diversas cultivares de mamoneira, atualmente produzidas no Brasil, destaca-se a cultivar AL-Gurarany 2002, lançada pela Coordenadoria de Assistência Técnica Integral – CATI (2009). Esta cultivar apresenta alto teor de óleo (47 a 48%), frutos indeiscentes, capacidade de produção média entre 1.000 e 2.000kg/ha de grãos (bagas ou frutos descascados) em condições de sequeiro, e com maior abrangência com relação à adaptação às diferentes regiões de cultivo no País (CATI, 2009).

Referências sobre métodos de propagação vegetativa de mamona são escassas, principalmente quando comparada a outras plantas da mesma família, como a mandioca, o pinhão-manso e a seringueira (Macedo et al., 2006). Além disso, por apresentar uma alta taxa de alogamia, sua propagação pela via sexuada resulta em elevado grau de variabilidade de características de importância econômica.

Um dos principais interesses dos bancos de germoplasma é a conservação dos acessos existentes e, uma das alternativas para garantir a manutenção dos genótipos é por meio da propagação vegetativa (Milani et al., 2006). Ainda segundo Nass et al. (2001), a propagação vegetativa em plantas pode ser feita através da micropropagação.

A cultura de tecidos de plantas tem sido uma técnica alternativa para a propagação de muitas espécies com bastante eficácia. A técnica refere-se ao

cultivo *in vitro* de explantes em meio de cultura com composição química determinada, em condições assépticas, sob condições controladas de luminosidade e temperatura (Torres et al., 2000).

A cultura de tecidos pode ser realizada por organogênese ou embriogênese somática. Na organogênese ocorre a diferenciação de brotações e raízes durante o desenvolvimento vegetal. Segundo George (1996), a maioria das plantas micropropagadas é obtida pela multiplicação de brotações axilares.

Segundo Carvalho (2005), o embrião de mamona apresenta dormência que pode ser superada pelo cultivo *in vitro*. Por isso, a necessidade do estabelecimento de protocolos mais eficientes de regeneração *in vitro* torna-se fundamental (Ah net al., 2007).

Múltiplos brotos *in vitro* podem ser obtidos pelo controle, principalmente, de diversos fatores que induzem a morfogênese *in vitro*, destacando-se os reguladores de crescimento. Dentre eles destacam-se dois grupos: as citocininas, sendo as mais utilizadas BAP, CIN, Zea e TDZ, juntamente com as auxinas, das quais 2,4-D, 2iP, AIA, AIB e ANA, são as classes mais utilizadas (George, 1996; Torres et al., 2000).

A solidificação do meio de cultura depende da qualidade e concentração do ágar, do pH, do tipo de explante, da concentração de sais e da presença de outras substâncias como o carvão ativado, os quais interferem na consistência. (Caldas et al., 1998). Entretanto, indica-se minimizá-lo ou otimizá-lo no preparo do meio de cultura, pelo fato do ágar ser considerado o componente de maior custo do meio de cultura (George, 1993; Peixoto & Pasqual, 1995).

Poucos são os trabalhos que têm demonstrado o potencial e a viabilidade de regeneração *in vitro* da mamoneira (Sujatha & Reddy, 1998). Mesmo com alguns avanços, ainda há limitações ao processo de micropropagação da espécie.

Portanto, com a realização deste trabalho, objetivou-se avaliar os aspectos da germinação, multiplicação de brotos e indução do enraizamento *in vitro* de *Ricinus communis* L. cv. AL-Guarany 2002.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Setor de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA).

4.1 Material botânico

Sementes de *Ricinus communis* L cv. AL-Guarany 2002 foram fornecidas pela Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (São Paulo, CATI) e armazenadas na temperatura de 4°C até a sua utilização.

4.2 Germinação *in vitro*

As sementes passaram por um processo de assepsia em câmara de fluxo laminar. Foram imersas em álcool 70% por 30 segundos e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 1% de cloro ativo por 20 minutos. Ao final deste tempo, as sementes foram lavadas por três vezes em água destilada e autoclavada, removendo-se os tegumentos para inoculação.

4.2.1 Efeito de concentração dos sais e do GA₃

Foram avaliadas diferentes concentrações salinas do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) (25%; 50%; 75%; e 100%) suplementados com diferentes concentrações de GA₃ (0; 1; 5; 10; e 20 mg L⁻¹), acrescidos de sacarose 3%, ágar 0,6% e 0,1% de carvão ativado. O pH foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos.

Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento sob irradiância de $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. A avaliação foi realizada aos 7 e 14 dias após a inoculação.

Os experimentos foram instalados segundo um delineamento inteiramente (DIC) casualizado com 10 repetições em que os tratamentos constituíam-se de quatro concentrações de sais do MS e cinco diferentes concentrações de GA_3 , fatorial 4×5 . Foram medidas as seguintes variáveis: comprimento da raiz pivotante (cm), comprimento da parte aérea (cm), número de folhas, germinação das sementes, plântulas normais e anormais, peso fresco e seco (g) do sistema radicular e da parte aérea.

A análise estatística foi realizada de acordo com o delineamento experimental por meio do pacote estatístico R (R Development Core Team, 2008). O modelo estatístico que descreve as observações é dado por:

$$y_{ijk} = \nu + m_i + c_j + mc_{ij} + \varepsilon_{ijk},$$

em que:

y_{ijk} é o valor da variável dependente na k -ésima repetição que recebeu o i -ésimo meio de cultura e j -ésima concentração de GA_3 , com $k = 1, \dots, r$;

ν é uma constante inerente a cada observação;

m_i é o efeito do i -ésima concentração de sais minerais, com $i = 1, \dots, 4$;

c_j é o efeito da j -ésima concentração de GA_3 , com $j = 1, \dots, 5$;

mc_{ij} é o efeito da interação entre o i -ésima concentração de sais minerais e a j -ésima concentração de GA_3 ;

ε_{ijk} é o erro experimental associado à parcela, independente e identicamente distribuído de uma Normal com média zero e variância σ^2 .

Para as variáveis, número de folhas, germinação, plântulas normais e anormais foi utilizada a metodologia de modelos lineares generalizados.

Os dados de número de folhas caracterizam-se por apresentar distribuição de Poisson (contagem) sendo utilizada como preditor linear (η) a função de ligação logarítmica, dada por:

$$\eta = \ln(\mu_i).$$

Os dados de germinação e tipo de plântula (normal e anormal) caracterizam-se por apresentar distribuição binomial (presença ou ausência da característica) sendo utilizada como preditor linear (η) a função de ligação logística, dada por:

$$\eta = \ln\left(\frac{\mu_i}{m_i - \mu_i}\right).$$

Os preditores lineares foram caracterizados por um modelo de acordo com o delineamento experimental, dado por:

$$\eta = \nu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij}$$

Para a análise do peso fresco e peso seco utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições em que os tratamentos constituíam-se de quatro concentrações de sais do meio MS e cinco diferentes concentrações de GA₃. Foram medidas as seguintes variáveis: peso fresco e seco da raiz, peso fresco e seco da parte aérea.

Como os níveis de concentração de sais minerais e de GA₃ são fatores quantitativos, quando estes foram significativos foi realizada uma análise de regressão.

4.2.2 Influência do pH

Foram avaliados três ajustes de pH (4,8; 5,8 e 6,8) no meio de cultura MS, suplementado com 3% de sacarose, e solidificado com ágar 0,6%.

Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento sob irradiância de fótons de 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e

temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Foi considerada germinada a semente que apresentava a radícula protruída.

O experimento foi instalado segundo um delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições em que os tratamentos constituíam-se de diferentes ajustes do pH e avaliação em dois períodos (7 e 14 dias), fatorial 3x2. Foram medidas as seguintes variáveis: comprimento da parte aérea (cm), comprimento da raiz (cm), sementes germinadas, formação de plântulas normais.

A análise estatística foi realizada de acordo com o delineamento experimental por meio do pacote estatístico R (R Development Core Team, 2008). O modelo estatístico que descreve as observações é dado por:

$$y_{ijk} = \nu + \alpha_i + \beta_j + \delta_k + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ijk},$$

em que:

y_{ijk} é o valor da variável dependente na k-ésima repetição que recebeu o i-ésimo pH, no j-ésimo tempo, com $l = 1, \dots, r$;

ν é uma constante inerente a cada observação;

α_i é o efeito da i-ésimo pH, com $i = 1, \dots, 3$;

β_j é o efeito do j-ésimo tempo, com $j = 1, 2$;

$\alpha\beta_{ij}$ é o efeito da interação entre o i-ésimo pH e o j-ésimo tempo;

ε_{ijk} é o erro experimental associado à parcela, independente e identicamente distribuído de uma Normal com média zero e variância σ^2 .

Os dados para a germinação e tipo de plântula (normal e anormal) caracterizam-se por apresentar distribuição binomial (presença ou ausência da característica) sendo utilizada como preditor linear (η) a função de ligação logística, dada por:

$$\eta = \ln \left(\frac{\mu_i}{m_i - \mu_i} \right).$$

Os preditores lineares foram caracterizados por um modelo de acordo com o delineamento experimental, dado por

$$\eta = \nu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij}$$

4.3 Multiplicação *in vitro*

Segmentos de gemas apicais oriundos de plântulas de mamoneira originadas de sementes germinadas *in vitro*, em meio de cultura MS foram utilizadas como fonte de explantes.

4.3.1 Efeito da interação BAP e ANA na indução de brotações

Os explantes foram inoculados em meio de cultura MS, suplementados com diferentes concentrações de BAP (0, 1,0; 1,5; 2,0 mg L⁻¹) e ANA (0; 0,01; 0,1 e 1,0 mg L⁻¹) com 3% de sacarose. O meio foi solidificado com 0,6% de ágar e seu pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos.

Após a inoculação, os segmentos foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de 43 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25±2°C.

O experimento foi instalado segundo um delineamento inteiramente casualizado (DIC), em que os tratamentos constituíam-se de combinações de concentrações de BAP e ANA. Foram medidas as seguintes variáveis: número de folhas, número de gemas, número de brotos, formação de raízes, formação de calo, aspecto de vitrificação dos explantes, período de avaliação (15 e 30 dias).

A análise estatística foi realizada de acordo com o delineamento experimental por meio do pacote estatístico R (R Development Core Team, 2008). O modelo estatístico que descreve as observações é dado por:

$$y_{ijkl} = \nu + \alpha_i + \beta_j + \delta_k + \alpha\beta_{ij} + \beta\delta_{jk} + \alpha\delta_{ik} + \alpha\beta\delta_{ijk} + \varepsilon_{ijkl},$$

em que:

y_{ijkl} é o valor da variável dependente na l-ésima repetição que recebeu o i-ésima temperatura, no j-ésimo crioprotetor e na k-ésima concentração, com $l = 1, \dots, r$;

ν é uma constante inerente a cada observação;

α_i é o efeito da i-ésima concentração de BAP, com $i = 1, \dots, 4$;

β_j é o efeito do j-ésima concentração de ANA, com $j = 1, \dots, 4$;

δ_k é o efeito da k-ésimo tempo, com $k=1,2$;

$\alpha\beta_{ij}$ é o efeito da interação entre o i-ésima concentração de BAP e a j-ésima concentração de ANA;

$\beta\delta_{jk}$ é o efeito da interação entre a j-ésima concentração de ANA e o k-ésimo tempo;

$\alpha\delta_{ik}$ é o efeito da interação entre o i-ésima concentração de BAP e o k-ésimo tempo.

$\alpha\beta\delta_{ijk}$ é o efeito da interação entre o i-ésima concentração de BAP, a j-ésima concentração de ANA e o k-ésimo tempo.

ε_{ijkl} é o erro experimental associado à parcela, independente e identicamente distribuído de uma Normal com média zero e variância σ^2 .

Os dados de número de folhas, número de gemas e número de brotos caracterizam-se por apresentar distribuição de Poisson (contagem) sendo utilizada como preditor linear (η) a função de ligação logarítmica, dada por:

$$\eta = \ln(\mu_i).$$

Os dados de presença e ausência de raiz, calo e vitrificação caracterizam-se por apresentar distribuição binomial (presença ou ausência da característica) sendo utilizada como preditor linear (η) a função de ligação logística, dada por:

$$\eta = \ln \left(\frac{\mu_i}{m_i - \mu_i} \right).$$

Os preditores lineares foram caracterizados por um modelo de acordo o delineamento experimental, dado por

$$\eta = \nu + \alpha_i$$

4.3.2 Efeitos das citocininas na indução de brotos

Explantes foram inoculados em meio de cultura MS suplementados com diferentes concentrações (0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) de Cinetina e Zeatina, isoladamente, 3% de sacarose e 0,6% de ágar. O pH foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos.

Após a inoculação, os segmentos foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de fótons 43 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C.

O experimento foi instalado segundo um delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições, em que os tratamentos constituíam-se de dois reguladores (Cinetina e Zeatina), com quatro concentrações e dois períodos de avaliação (15 e 30 dias), fatorial 2x4x2. Foram medidas as seguintes variáveis: número de folhas, de gemas e de brotos, formação de raízes, formação de calo na base do explante e vitrificação dos explantes.

A análise estatística foi realizada de acordo com o delineamento experimental por meio do pacote estatístico R (R Development Core Team, 2008). O modelo estatístico que descreve as observações é dado por:

$$y_{ijkl} = \nu + \alpha_i + \beta_j + \delta_k + \alpha\beta_{ij} + \beta\delta_{jk} + \alpha\delta_{ik} + \alpha\beta\delta_{ijk} + \varepsilon_{ijkl},$$

em que:

y_{ijkl} é o valor da variável dependente na l-ésima repetição que recebeu o i-ésima temperatura, no j-ésimo crioprotetor e na k-ésima concentração, com $l = 1, \dots, r$;
 v é uma constante inerente a cada observação;

α_i é o efeito da i-ésimo regulador, com $i = 1, 2$;

β_j é o efeito do j-ésima concentração, com $j = 1, \dots, 4$;

δ_k é o efeito da k-ésimo tempo, com $k=1,2$;

$\alpha\beta_{ij}$ é o efeito da interação entre o i-ésimo regulador e a j-ésima concentração;

$\beta\delta_{jk}$ é o efeito da interação entre a j-ésima concentração e o k-ésimo tempo;

$\alpha\delta_{ik}$ é o efeito da interação entre o i-ésimo regulador e o k-ésimo tempo.

$\alpha\beta\delta_{ijk}$ é o efeito da interação entre o i-ésimo regulador, a j-ésima concentração e o k-ésimo tempo.

ε_{ijkl} é o erro experimental associado à parcela, independente e identicamente distribuído de uma Normal com média zero e variância σ^2 .

Os dados de número de folhas, de gemas e de brotos caracterizam-se por apresentar distribuição de Poisson (contagem) sendo utilizada como preditor linear (η) a função de ligação logarítmica, dada por:

$$\eta = \ln(\mu_i).$$

Os dados de formação de raiz, calo e vitrificação do explante caracterizam-se por apresentar distribuição binomial (presença ou ausência da característica) sendo utilizada como preditor linear (η) a função de ligação logística, dada por:

$$\eta = \ln\left(\frac{\mu_i}{m_i - \mu_i}\right).$$

Os preditores lineares foram caracterizados por um modelo de acordo com o delineamento experimental, dado por

$$\eta = \nu + \alpha_i$$

4.4 Influência do ANA no enraizamento *in vitro*

Brotações mantidas em MS na ausência de reguladores de crescimento por 15 dias foram transferidas para meio de cultura MS, contendo diferentes concentrações de ANA (0,0; 1,5; 3,0; 6,0; 9,0 e 12,0 mg L⁻¹), 3% de sacarose, 0,1% de carvão ativado mantidas por duas semanas. Após este período, os explantes foram transferidos para o meio de cultura MS sem a adição do regulador de crescimento. O meio foi solidificado com 0,6% de ágar e o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento a 25±2°C de temperatura, sob irradiância de fótons 43 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25±2°C. Trinta dias depois, a formação de raízes nos diferentes tratamentos foi avaliada.

O experimento foi instalado segundo um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 10 repetições em que os tratamentos constituíam-se de concentrações de ANA. Foram medidas as seguintes variáveis: número de folhas, número de raízes, comprimento da raiz (cm), comprimento da parte aérea (cm), peso fresco e seco da raiz (g), peso fresco e seco da parte aérea (g).

A análise estatística foi realizada de acordo com o delineamento experimental por meio do pacote estatístico R (R Development Core Team, 2008). O modelo estatístico que descreve as observações é dado por:

$$y_{ij} = \nu + \alpha_i + \epsilon_{ij},$$

em que:

y_{ij} é o valor da variável dependente na j-ésima repetição que recebeu o i-ésima concentração de ANA, com $k = 1, \dots, r$;

ν é uma constante inerente a cada observação;

m_i é o efeito do i-ésima concentração de ANA, com $i = 1, \dots, 6$;

ε_{ij} é o erro experimental associado à parcela, independente e identicamente distribuído de uma Normal com média zero e variância σ^2 .

Para as variáveis número de folhas, germinação, anormalidades nas plântulas (normal e anormal), foi utilizada a metodologia de modelos lineares generalizados.

Os dados de número de folhas e número de raízes caracterizam-se por apresentar distribuição de Poisson (contagem) sendo utilizada como preditor linear (η) a função de ligação logarítmica, dada por:

$$\eta = \ln(\mu_i).$$

Os preditores lineares foram caracterizados por um modelo de acordo com o delineamento experimental, dado por

$$\eta = \nu + \alpha_i$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Germinação *in vitro*

5.1.1 Efeito de concentração dos sais e do GA₃

Na avaliação de comprimento de raízes aos 7 dias de inoculação, verificou-se efeito significativo para a proporção de sais do meio MS e concentração de GA₃, isoladamente ($p < 0,05$). A interação entre meio de cultura e concentração de GA₃ não foi significativa. Para a característica comprimento da raiz principal das plântulas obtidas *in vitro* (Figura 1), realizou-se análise de

regressão para as diferentes concentrações de GA_3 , cujos dados indicam uma ação negativa com o aumento da concentração do regulador (Figura 2).

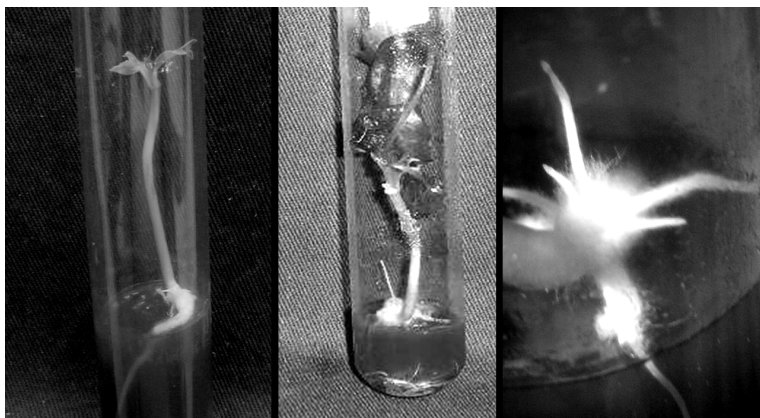


FIGURA 1 Aspecto visual de plântulas germinadas *in vitro* em meio MS suplementado com $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de GA_3 após 30 dias de cultivo.

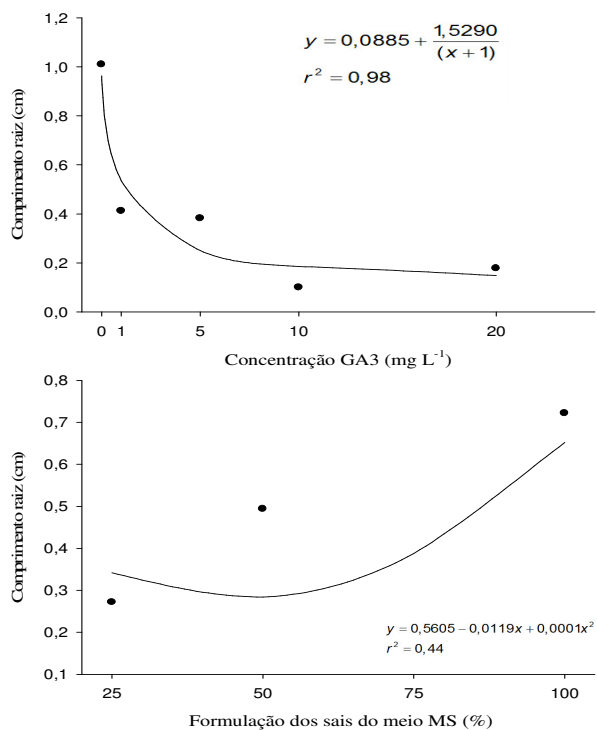


FIGURA 2 Valores médios e estimados do comprimento das raízes em função das concentrações de GA₃ (mg L⁻¹) e da proporção de sais minerais do meio MS (%), no cultivo *in vitro* de *Ricinus communis* L. após sete dias de inoculação.

Observou-se aumento do comprimento da raiz com a redução da concentração salina do meio de cultura, porém o mesmo não ocorreu para as maiores concentrações de GA₃ (Figura 2). Conceição (2000), testando diferentes concentrações do meio MS na germinação de sementes de Timbó (*Derris urucu*), não encontrou efeito. Segundo Stein et al. (2007), não foi necessária a adição de GA₃ na germinação *in vitro* de ingazeiro, corroborando com os dados encontrados neste trabalho.

Na análise de Deviance para a germinação das sementes, observou-se o efeito significativo apenas para o fator concentração de GA3 ($p < 0,05$), isoladamente. A interação entre a concentração do meio de cultura e do regulador de crescimento não foi significativa ($p = 0,8560$).

Os valores médios, observados e estimados, de proporção de germinação, em função das concentrações, demonstraram que houve influência negativa na presença de alta concentração de GA₃ (Figura 3). Para a formação de plântulas normais não houve efeito significativo dos fatores concentração de sais ($p = 0,1324$) e concentração de GA₃ ($p = 0,4350$), isoladamente, nem da interação entre eles após sete dias de cultivo ($p = 0,9999$).

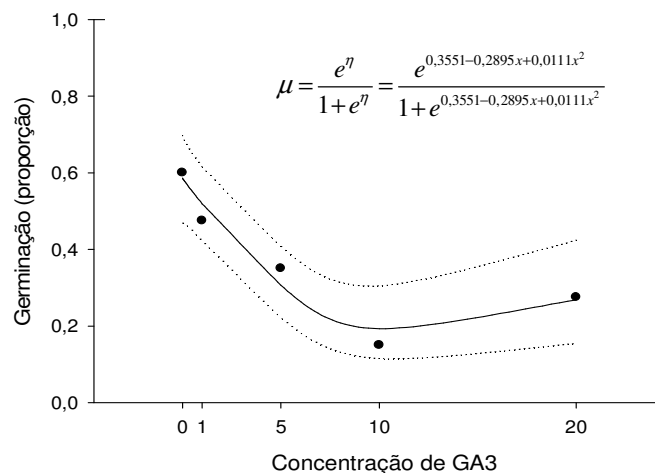


FIGURA 3 Valores médios e estimados da proporção de germinação *in vitro* em função das concentrações de GA₃ após sete dias de inoculação. As linhas pontilhadas são os intervalos de confiança da regressão.

Para análise de variância no 14º dia de cultivo, o comprimento das raízes formadas demonstra o efeito significativo apenas para o fator concentração do regulador, isoladamente. A interação entre meio de cultura e concentração de

GA₃ não foi significativa. Os valores observados do comprimento da raiz em função da concentração de GA₃ apresentados indicam o efeito negativo do uso de GA₃ para o comprimento das raízes (Figura 4).

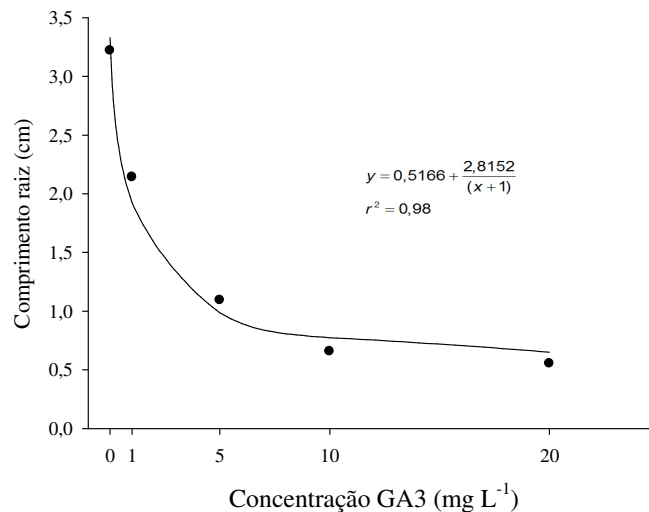


FIGURA 4 Valores médios e estimados do comprimento da raiz de plântulas obtidas *in vitro* de *Ricinus communis* L. em função das concentrações de GA₃, no 14^o dia de cultivo.

Na análise de variância do comprimento da parte aérea após 14 dias de cultivo, verificou-se o efeito significativo dos fatores meio de cultura e concentração de GA₃ ($p < 0,05$), isoladamente. A interação entre meio de cultura e concentração de GA₃ não foi significativa. Os valores observados de comprimento da parte aérea em função da concentração de GA₃ demonstram que houve um decréscimo do comprimento com o aumento da concentração do regulador. Com relação às concentrações dos sais minerais houve um aumento significativo do comprimento com o aumento destes (Figura 5).

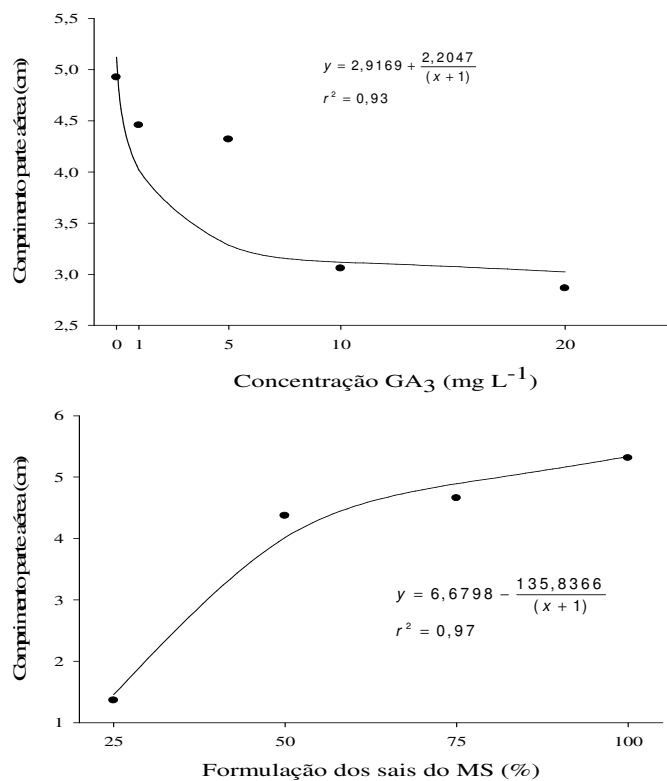


FIGURA 5 Valores médios e estimados do comprimento da parte aérea em função das concentrações de GA₃ (A) e das concentrações de sais minerais (B), no 14º dia de cultivo.

Para a análise de Deviance do número de folhas no 14º dia de cultivo verificou-se que o efeito foi significativo para os fatores concentração dos sais do meio MS e concentração de GA₃, isoladamente (p<0,05). No entanto, a interação entre meio de cultura e concentração não foi significativa (p=0,1550). Os valores médios, observados e estimados, de número de folhas diminuiram

significativamente em função das concentrações de GA₃ e aumentaram com as concentrações de sais do MS (Figura 6).

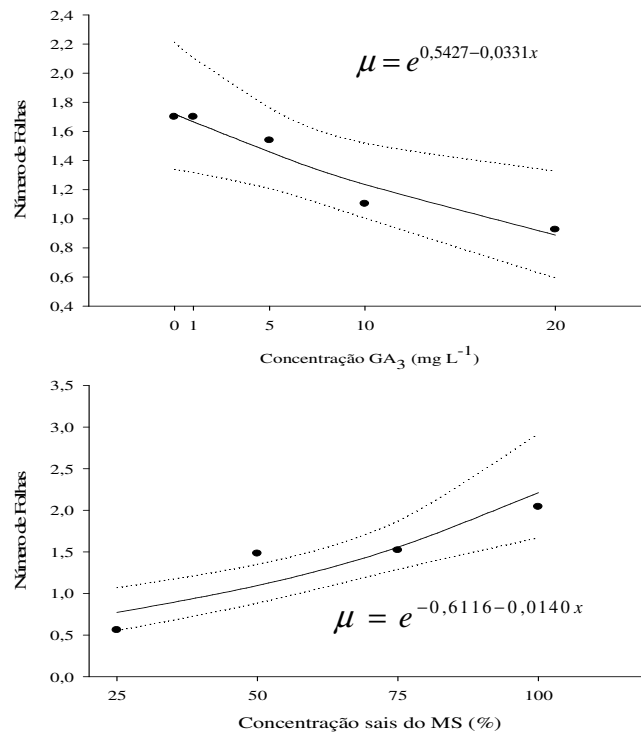


FIGURA 6 Valores médios e estimados do número de folhas, em função das concentrações de GA₃ e em função da concentração de sais minerais, no 14º dia de cultivo. As linhas pontilhadas são os intervalos de confiança da regressão.

Para análise da Deviance da germinação *in vitro* no 14º dia de inoculação, observou-se que o efeito foi significativo apenas para o fator concentração de GA₃, isoladamente, (p=0,1550). A interação entre meio de cultura e concentração de GA₃ não foi significativa (p=0,8470).

Os valores médios, observados e estimados, de proporção de germinação ao 14º dia de cultivo, em função das concentrações de GA₃ apresentaram-se decrescentes com o aumento da concentração do regulador (Figura 7).

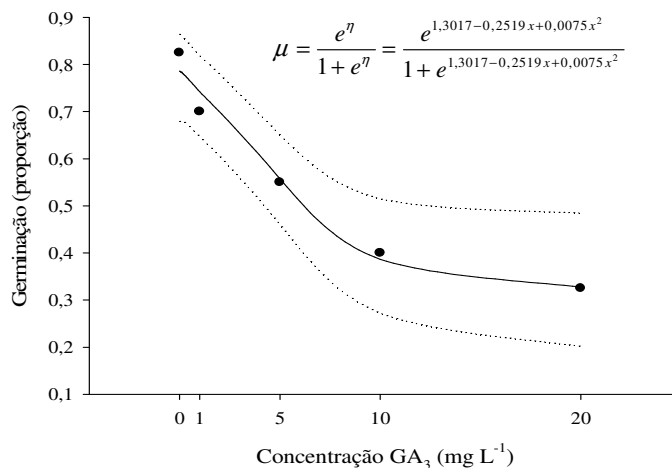


FIGURA 7 Valores médios e estimados da proporção de germinação em função das concentrações de GA₃ para sementes de *Ricinus communis* L. inoculadas *in vitro* após 14 dias de inoculação. As linhas pontilhadas são os intervalos de confiança da regressão.

Na análise de Deviance da formação de plântulas normais após 14 dias de cultivo, não houve efeito significativo dos fatores concentração dos sais e da concentração do regulador, isoladamente, nem da interação entre eles ($p=0,3210$).

Para a análise de variância do peso fresco das raízes, verificou-se efeito significativo dos fatores, proporção de sais do meio MS e concentração de GA₃, isoladamente, ao 14º dia de cultivo. Porém, a interação entre meio de cultura e concentração de GA₃ não foi significativa. Os valores observados de peso fresco da raiz em função da concentração de GA₃ e em função das concentrações dos sais minerais estão apresentados na Figura 8.

A análise de variância para o peso seco da raiz demonstrou efeito significativo dos fatores meio MS e concentração de GA₃, isoladamente. A interação entre meio de cultura e concentração de GA₃ não foi significativa. Os

valores observados indicam um decréscimo de peso seco da raiz em função da concentração de GA₃, e em função das concentrações de sais do meio MS indica que 50% dos sais apresentaram maior peso seco da raiz. Para o peso fresco da raiz a melhor concentração dos sais foi de 71,2% e peso seco da raiz foi de 68,6% (Figura 9).

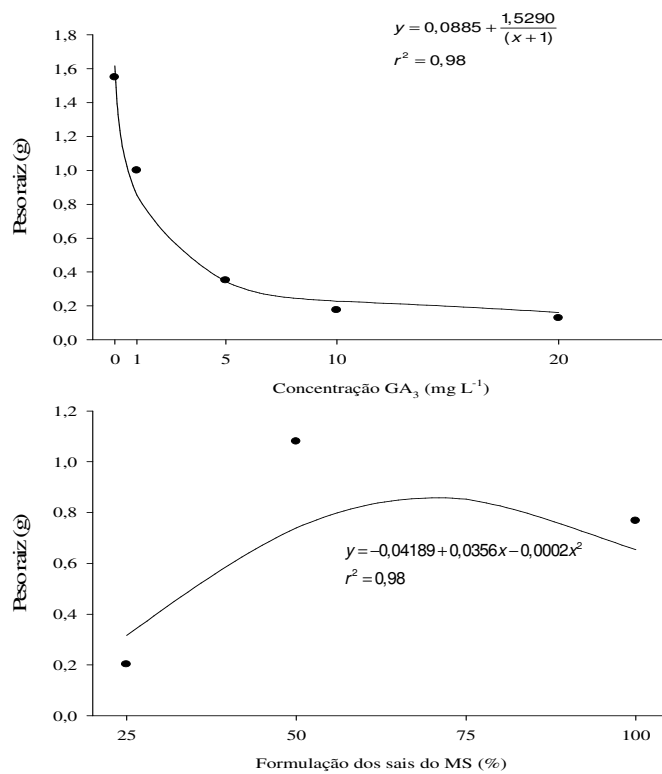


FIGURA 8 Valores médios e estimados do peso fresco da raiz de *Ricinus communis* L., em função das concentrações de GA₃ e da concentração de sais minerais do meio MS, no 14º dia de cultivo.

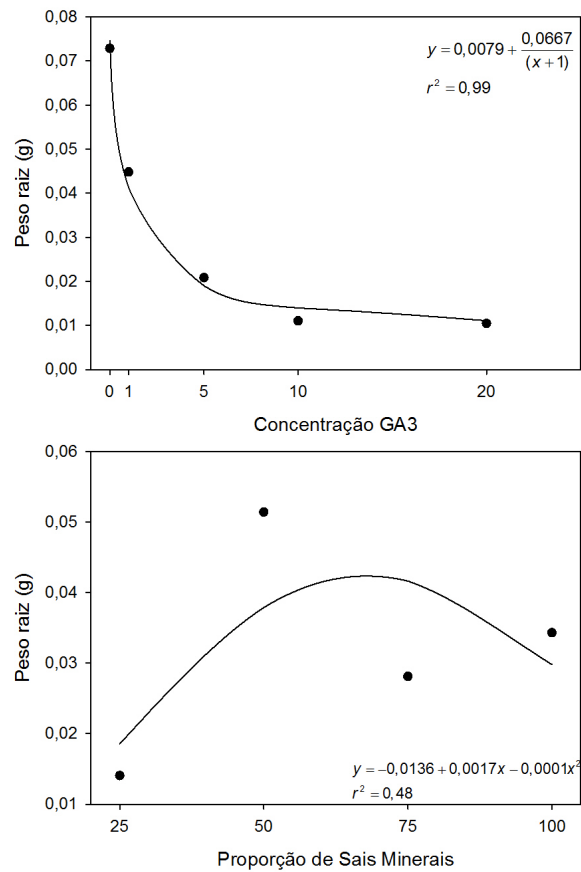


FIGURA 9 Valores médios e estimados do peso seco da raiz em de *Ricinus communis* L. em função das concentrações de GA₃ e das concentrações de sais minerais do meio MS, no 14º dia de cultivo.

A análise de variância para o peso fresco da parte aérea demonstra efeito significativo dos fatores meio MS e concentração de GA₃, isoladamente. A interação entre meio MS e concentração de GA₃ não foi significativa. Os valores observados de peso fresco da parte aérea em função da concentração de GA₃ diminuiram significativamente com o aumento deste regulador, já em função das concentrações de sais minerais, houve um aumento significativo do peso com o aumento dos sais do meio MS, sendo o ponto máximo na concentração de 100% dos sais (Figura 10).

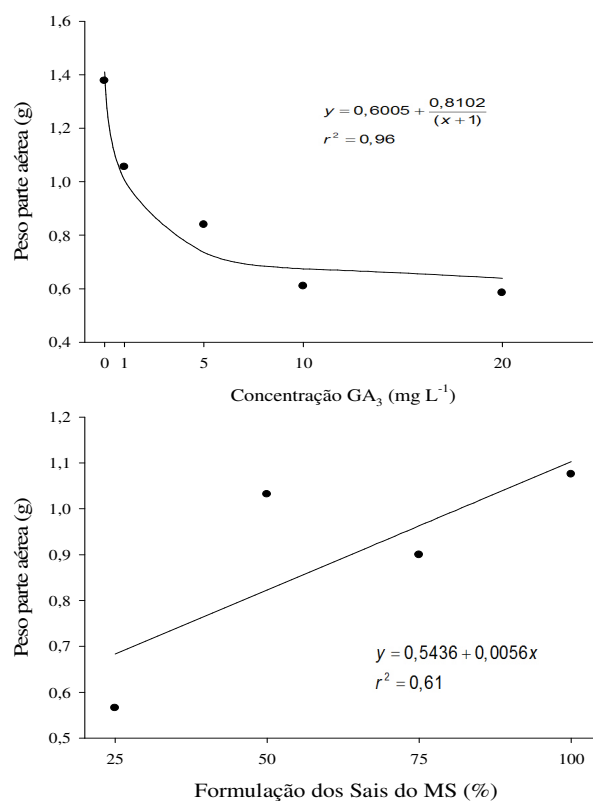


FIGURA 10 Valores médios e estimados do peso fresco da parte aérea em função das concentrações de GA₃ e em função da concentração de sais, no 14º dia de cultivo.

Os resultados na análise de variância demonstram efeito significativo do fator concentração de GA₃, isoladamente. A interação entre meio de cultura e concentração de GA₃ não foi significativa. Os valores observados para peso seco da parte aérea em função da concentração de GA₃ indicam que o maior valor foi observado na ausência do regulador (Figura 11).

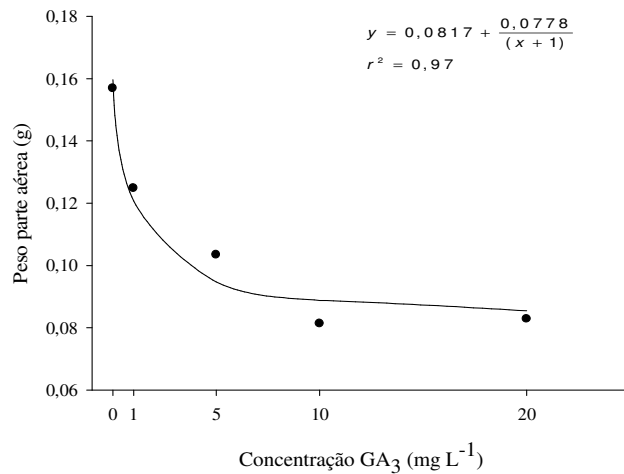


FIGURA 11 Valores médios e estimados do peso seco da parte aérea em função das concentrações de GA₃, 14º dia de cultivo.

Para a germinação, comprimento de parte aérea, número de folhas, peso fresco da parte aérea, o melhor meio de cultura utilizado foi com a concentração completa dos sais (100%). Resultados similares foram obtidos por Pompelli (2002), que, trabalhando com *Dyckia distachya*, observou que a totalidade dos sais do meio MS proporcionou melhor germinação, sendo que a redução dos sais teve efeito negativo.

O meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) e suas modificações e diluições tem apresentado resultados satisfatórios para diversas espécies vegetais (Grattapaglia & Machado, 1990). Pasqual et al. (1994) cita que a concentração dos sais no meio de cultura MS foi um dos fatores de maior influência sobre o estabelecimento e desenvolvimento de explantes de samambaia (*Nephrolepis exaltata*).

O uso do GA₃ apresentou um efeito negativo para todas as variáveis estudadas. Resultados semelhantes foram observados para sementes de café

(*Coffea arabica*), em que concentrações de 10, 100 e 1000 mg L⁻¹ de GA₃, por 48 horas, reduziram a germinação, à medida que a concentração foi elevada, concluindo que a giberelina pode causar toxicidade às sementes de café, ocasionando a morte ou inibindo a germinação (Maestri &Vieira, 1961). Isto foi confirmado também por Takaki et al. (1979) que indicaram o efeito negativo do ácido giberélico. Esses autores sugeriram ainda que o fato deveu-se ao aumento na atividade das enzimas como a celulase, proporcionado pelo regulador, que neste caso atuou, degradando a parede celular do embrião.

5.1.2 Influência do pH

Observou-se, na análise de variância para os comprimentos das raízes formadas *in vitro* que o efeito foi significativo para interação entre o pH e o período de avaliação. Na Figura 12, observou-se que os maiores valores obtidos para o comprimento das raízes foram significantes na avaliação em 14 dias de cultivo e próximo ao ajuste do pH de 5,8.

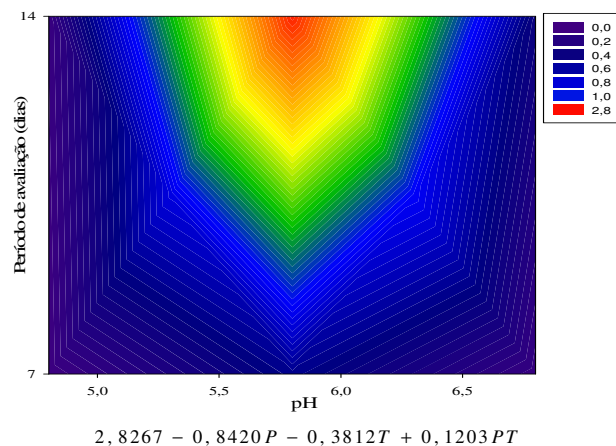


FIGURA 12 Valores estimados do comprimento da raiz a partir de sementes de *R. communis* L. germinadas *in vitro* em meio MS em função do ajuste do pH (4,8; 5,8 e 6,8) e em diferentes períodos de avaliação (7 e 14 dias).

Para o comprimento da parte aérea houve efeito significativo da interação entre o pH e os períodos de avaliação ($p < 0,05$). Na análise de regressão para o comprimento da parte aérea, verificou-se o efeito significativo no período de 14 dias de avaliação (Figura 13).

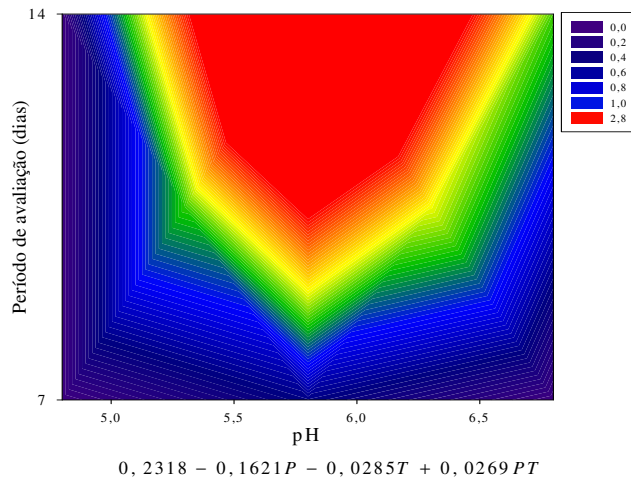


FIGURA 13 Valores estimados do comprimento da parte aérea a partir de sementes de *R. communis* L. germinadas *in vitro* em meio MS em função do ajuste do pH (4,8; 5,8 e 6,8) e do tempo de avaliação.

Na Figura 13, observa-se que o comprimento de parte aérea aos 7 dias obteve valores praticamente idênticos para todas as concentrações de pHs, enquanto que aos 14 dias os valores foram bem distintos, com um maior comprimento de parte aérea entre as concentrações pH de 5,5 a 6,0.

A análise de Deviance da germinação nos períodos de avaliação demonstrou o efeito significativo para cada fator isoladamente ($p < 0,05$). Na análise da proporção média da germinação, verificou-se que o maior valor para a característica foi produzido quando as sementes foram submetidas ao pH de 5,8 (Figura 14).

A análise de Deviance para a formação de plântulas normais e anormais indicou um efeito significativo da interação entre o pH e o período de avaliação

($p < 0,05$). Para a formação de plântulas normais ou anormais nos diferentes níveis de pH testados verificou-se que não houve efeito positivo entre os ajustes testados ($p = 0,1960$). Conforme a Figura 15, a ocorrência de plântulas anormais ocorreu no início do período de avaliação, com pH abaixo de 5,5 e ao final da avaliação em pH maior que 6,5. Plântulas normais foram encontradas em maior proporção à medida que aumentou o período de avaliação em pH menor do que 5,5. Em pHs superiores a 6,5 apresentou uma tendência de diminuição de plântulas normais ao longo do período de avaliação. Contudo, a faixa de pH próxima a 6,0 apresentou uma tendência linear para a proporção de plântulas normais.

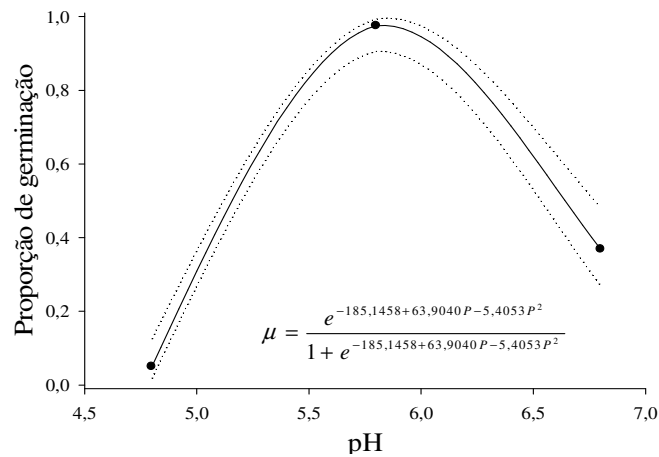
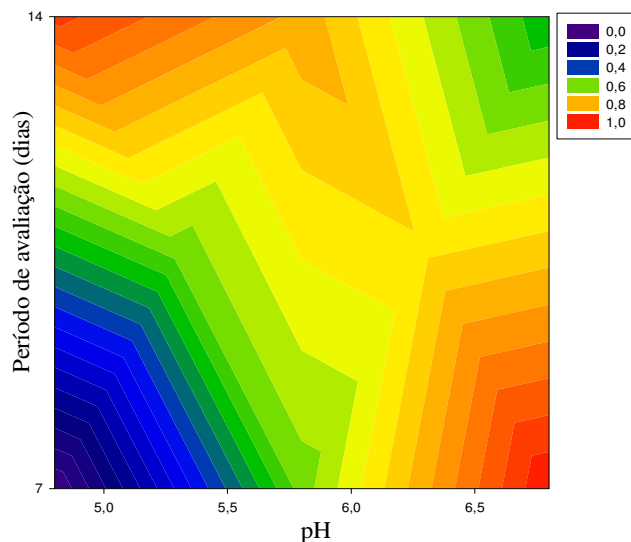


FIGURA 14 Valores médios (pontos) e estimados (linha cheia) da proporção de germinação em função do pH. As linhas pontilhadas são os intervalos de confiança da regressão.



$$\mu = \frac{e^{-208,657+35,859P+15,563T-2,659PT}}{1 + e^{-208,657+35,859P+15,563T-2,659PT}}$$

FIGURA 15 Valores estimados da proporção de plântulas normais formadas em meio MS em função do pH ajustado (4,8; 5,8 e 6,8) e do período de avaliação (7 e 14 dias).

O pH é considerado um ponto crítico para o estabelecimento de uma espécie *in vitro*, pois influencia na disponibilidade de nutrientes, fitorreguladores e na solidificação do ágar. Com a intenção de reduzir custos com reagentes, utiliza-se o ajustamento do pH que pode promover maior e melhor aproveitamento dos nutrientes pelo explante. Os efeitos do pH podem ser diretos ou indiretos, influenciando, por exemplo, na utilização das fontes de nitrogênio. O pH, quando ajustado a valores inferiores, promove a acidificação do meio de cultura, dificultando a utilização do amônio, enquanto valores mais altos de pH diminuem a utilização do nitrato (Leifert et al., 1992).

Para um crescimento adequado da maioria das espécies, a faixa de 5 a 6,5 revela o melhor ajuste de pH. Se os níveis de pH forem inferiores a 4,5 e superiores a 7, poderá ocorrer paralisação do crescimento e do desenvolvimento *in vitro* (Murashige, 1974).

Durante o crescimento das células, o pH do meio de cultura se altera à medida que diferentes íons são absorvidos e os produtos metabólicos são excretados para o meio. Processos como a autoclavagem e o armazenamento do meio de cultura podem acidificar ainda mais este (Skirvin et al., 1986).

Paiva et al. (1999) estudaram a relação entre concentrações de ágar (0,0; 0,35; 0,7 e 1,05%) e pH do meio (4,6; 5,0; 5,4; 5,8; 6,2; 6,6 e 7,0) no desenvolvimento de plantas de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev. cv. Orange Reagen) *in vitro*, e observaram que o número e o tamanho de brotos não foram afetados pelos tratamentos.

5.2 Multiplicação *in vitro*

5.2.1 Efeito da interação de BAP e ANA na indução de brotos

Para a análise de Deviance para número de brotos segundo os tratamentos estudados observou-se que nenhum dos fatores e nem suas interações foram significativos. Não houve influência positiva para a indução de brotos com a utilização dos reguladores de crescimento, diferentemente dos resultados encontrados por Cheema & Sharma (1983) e Ochatt & Caso (1983) para utilização de ANA na multiplicação *in vitro* de macieira, que demonstram que a aplicação de baixas concentrações desta auxina combinada com BAP induziu a proliferação de brotações.

Para a análise de Deviance do número de folhas, observou-se que houve efeito significativo para a interação de BAP e ANA e para os períodos de avaliação, isoladamente ($p < 0,05$).

Na análise de regressão dos valores estimados para as folhas verifica-se que a região em vermelho do gráfico indica o efeito positivo do regulador de crescimento no número de folhas formadas (2,7) (Figura 16).

Para a análise do número de gemas, foi observado o efeito significativo apenas para as concentrações de ANA isoladamente ($p < 0,05$). Na Figura 17

verificou-se que o número de gemas (2,46) foi maior em altas concentrações de ANA.

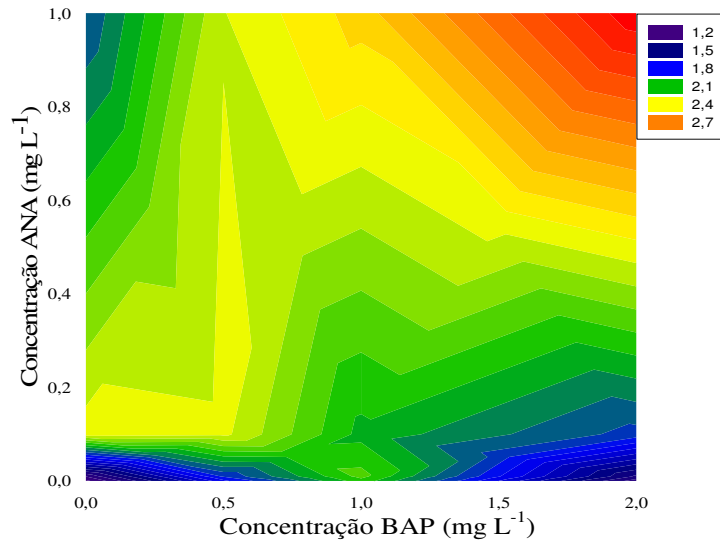


FIGURA 16 Valores estimados do número de folhas em função das concentrações de ANA e BAP induzidos de *Ricinus communis* L *in vitro*.

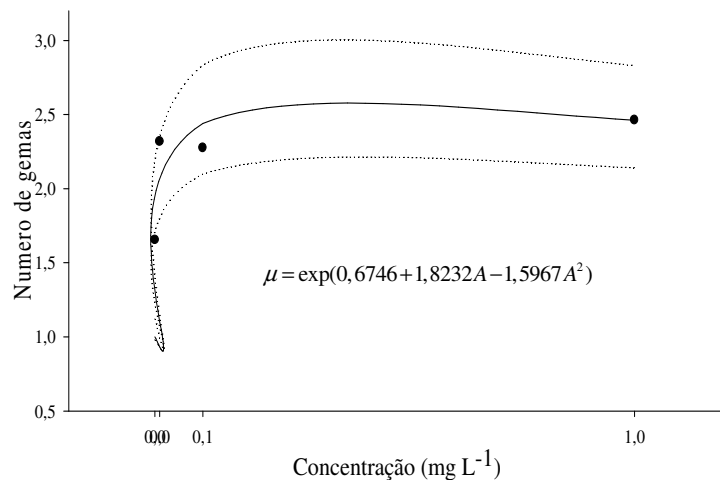
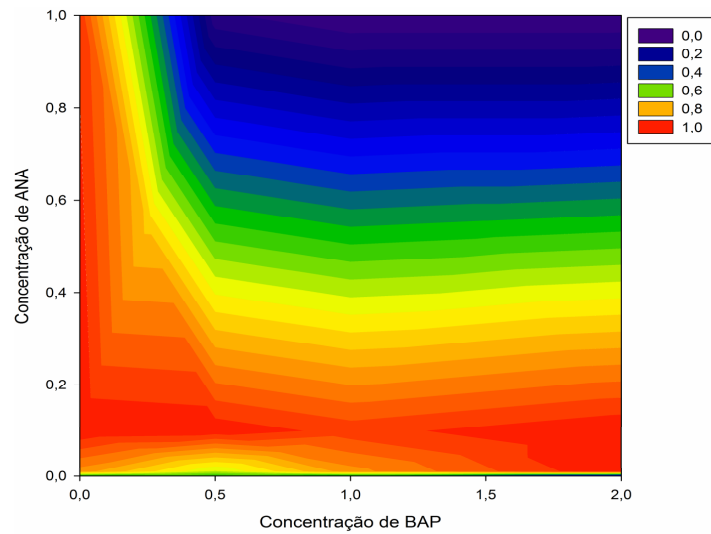


FIGURA 17 Valores médios (pontos) e estimados (linha cheia) do número de gemas, em função das concentrações de ANA de *Ricinus communis* L. As linhas pontilhadas são os intervalos de confiança da regressão.

A análise de Deviance para a formação de raízes demonstrou que houve efeito significativo para a interação entre as concentrações de BAP e ANA, bem como para a interação entre as concentrações de BAP e os períodos de avaliação. Na proporção de raízes formadas na interação BAP e ANA observou-se que em concentrações de BAP baixas houve maior formação de raízes em todas as combinações com ANA. Em todas as concentrações de ANA (próximo a 0,2) houve maior formação de raiz quando estas foram combinadas com baixas concentrações de BAP (próximos a zero) (Figura 18). Na Figura 19 verificou-se que houve a formação de raízes para todas as concentrações de BAP testadas isoladamente. Contudo, a maior formação de raízes foi observada em concentrações baixas de BAP, com aumento para o período de 30 dias.

Para Pierik (1990), um adequado balanço entre auxinas e citocininas estabelece um eficiente controle no crescimento e na diferenciação das culturas *in vitro*. A citocinina BAP em geral induz a uma alta taxa de multiplicação. Em trabalho com macieira, Yui (1993) observou melhores resultados com a aplicação de 5 mg L^{-1} de BAP, independente de ANA, comprovando que o regulador de crescimento, BAP, deve ser incorporado ao meio de cultura para permitir uma taxa de multiplicação de brotos. Estudos com videira, realizados por Peixoto (1995), evidenciaram que o aumento da concentração de ANA reduz o número de brotações.



$$\mu = \frac{e^{259,283 A + 277,449 A^2 - 2,013 B - 2575,723 AB + 27006,337 A^2 B}}{1 + e^{259,283 A + 277,449 A^2 - 2,013 B - 2575,723 AB + 27006,337 A^2 B}}$$

FIGURA 18 Valores estimados para proporção de raízes obtidas a partir de segmentos nodais de *Ricinus communis* L em função das concentrações de ANA e BAP.

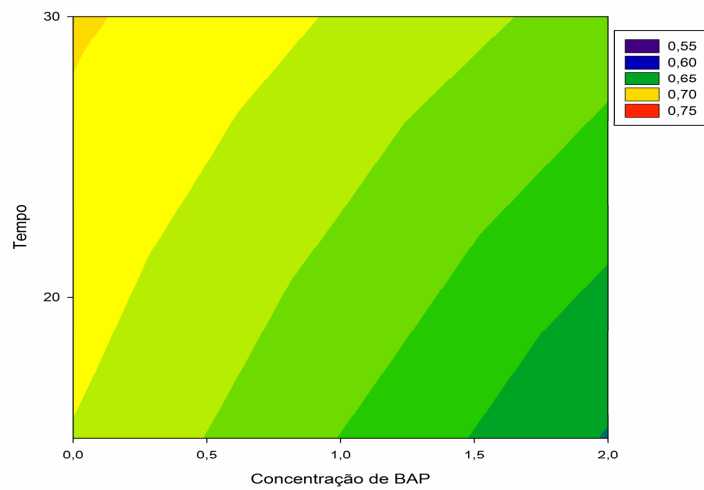


FIGURA 19 Valores estimados para proporção de raízes de segmentos apicais de *R. communis* L. em função das concentrações de BAP (mg L^{-1}) e dos diferentes períodos de avaliação (15 e 30 dias).

Para a formação de calos na base verificou-se que houve efeito significativo para a interação entre as concentrações de BAP e ANA, bem como para o período de avaliação isoladamente ($p < 0,05$).

Para a proporção de calos formados houve um efeito significativo com aumento da concentração de ANA, em que maiores proporções foram observadas nas maiores concentrações deste regulador (Figura 20).

Para Silveira et al. (2001), concentrações altas de auxina determinam um maior percentual de calo na base dos explantes, o que se traduz em efeito indesejável em se tratando de experimento que tem como objetivo a multiplicação de clones de macieira. As citocininas têm ação em diversos processos de desenvolvimento da planta, inclusive divisão celular e diferenciação de culturas celulares, respostas morfogenéticas e desenvolvimento de órgãos (Centeno et al., 1996).

Estudos sobre micropropagação de espécies do gênero *Ananas* têm usado a citocinina BAP na indução de brotações, por apresentar resultados eficientes, principalmente, em *Ananas comosus* (Firoozabady & Gutterson, 2003), e *Ananas lucidus* (Borges et al., 2003). A utilização de BAP em combinação com ANA tem sido relatada em trabalhos para esta espécie (Costa & Zaffari, 2005).

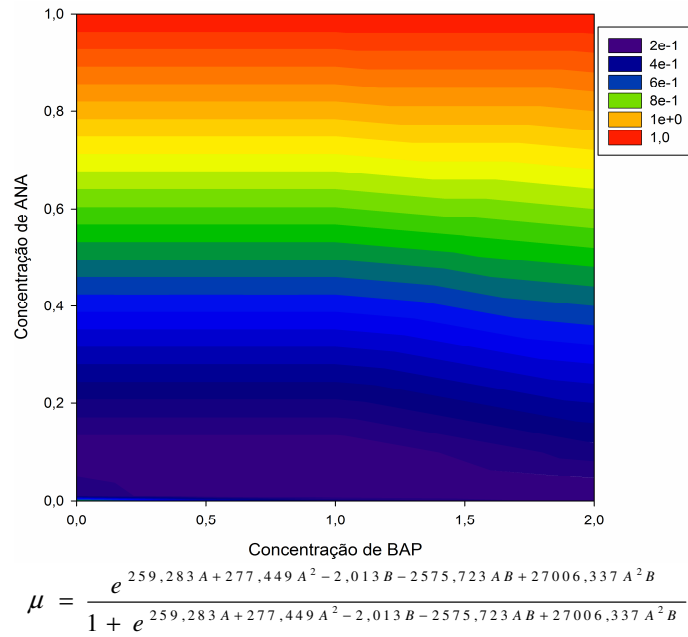


FIGURA 20 Valores estimados para proporção de calos formados em função das concentrações de BAP (mg L^{-1}) e de ANA (mg L^{-1}) induzidos a partir de segmentos apicais de *Ricinus communis* L *in vitro*.

Na análise do aspecto vitrificado dos brotos formados observou-se o efeito significativo para a interação entre as concentrações de BAP e ANA ($p=0,0028$), concentração de ANA e período de avaliação ($p=0,0300$), concentração de BAP e período de avaliação ($p=0,0200$). Altas proporções de brotos vitrificados foram encontradas em baixas concentrações de ANA e de BAP. Com aumento das concentrações de ANA houve efeito positivo na formação de brotos não vitrificados (Figura 21).

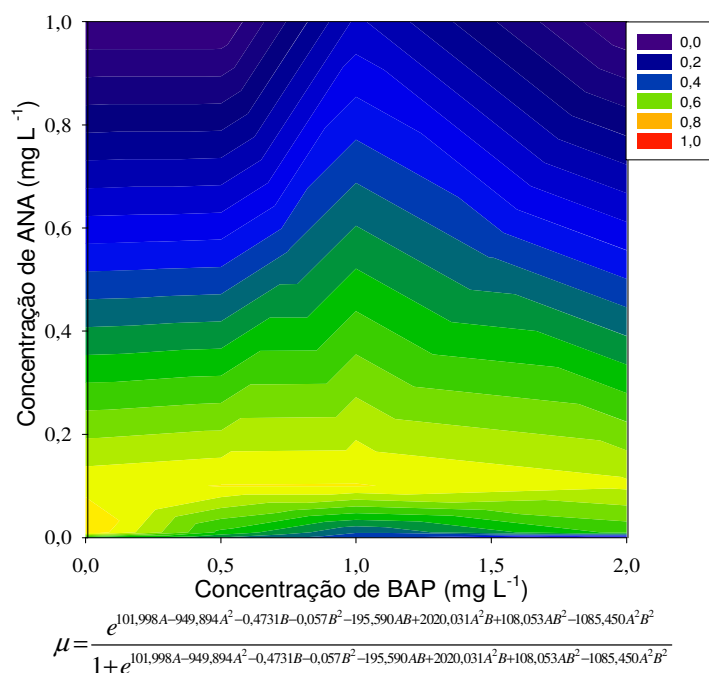


FIGURA 21 Valores estimados para a proporção de vitrificação *in vitro* em função das concentrações de ANA e BAP induzidos a partir de segmentos apicais de *Ricinus communis* L.

A proporção de explantes vitrificados foi significativamente crescente ao longo do tempo de avaliação (de 15 para 30 dias). A característica vitrificada não ocorreu proporcionalmente nas maiores concentrações do ANA, demonstrando o efeito negativo da adição deste regulador em baixas concentrações, isoladamente ($p < 0,05$) (Figura 22). Esta característica quando analisada em relação ao BAP nas concentrações entre 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ favoreceu a maior obtenção de brotos vitrificados no período final de avaliação (Figura 23).

Resultados similares foram obtidos por Debergh et al. (1981), demonstrando que as citocininas têm um efeito estimulante na vitrificação ou hiperhidricidade. O surgimento de plantas vitrificadas e com características

anormais pode ser uma consequência do desbalanço entre auxinas e citocininas (Leshem & Sachs, 1985).

Segundo Paek et al. (1991), a hiperhidricidade de brotações de *Gypsophila paniculata* cultivadas *in vitro* pode ser influenciada por muitos fatores, entre os quais a adição de níveis elevados de citocininas no meio de cultura. A hiperhidricidade também pode ser consequência da exposição a baixas irradiâncias luminosas e/ou altas temperaturas. Outros autores mostraram que a hiperhidricidade é ligada à concentração de ágar nos meios de cultura e à razão nitrato:amônio do meio (Han et al., 1991).

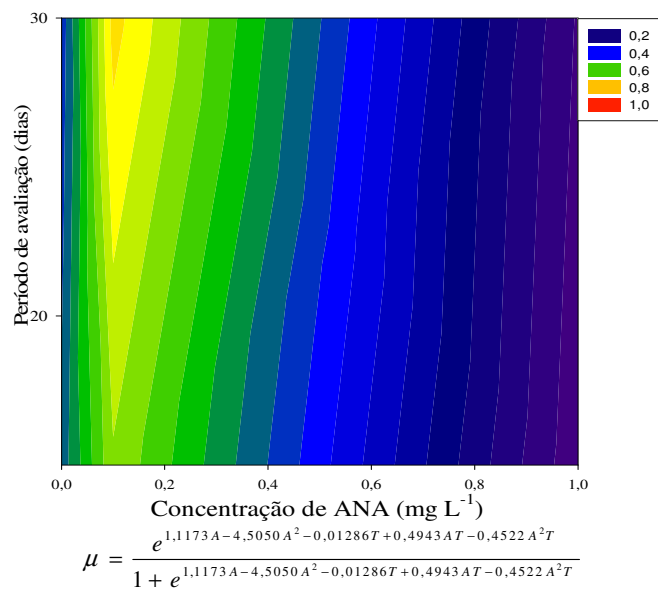
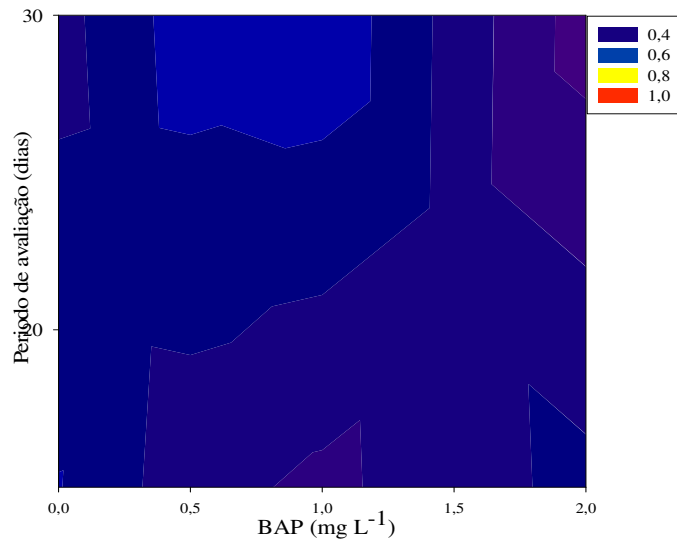


FIGURA 22 Valores estimados para proporção de vitrificação *in vitro* em função das concentrações de ANA e do período de avaliação (15 e 30 dias) induzidos a partir de segmentos apicais de *Ricinus communis* L



$$\mu = \frac{e^{-0,3167 B + 0,0319 T - 0,0007}}{1 + e^{-0,3167 B + 0,0319 T - 0,0007}}$$

FIGURA 23 Valores estimados para proporção de vitrificação *in vitro* em função das concentrações de BAP e do período de avaliação (15 e 30 dias), induzidos a partir de segmentos apicais de *Ricinus communis* L.

5.2.2 Efeito das citocininas na indução de brotos

Para o número de brotos nenhum dos fatores e nem suas interações foram significativos. Na análise de Deviance para o número de folhas formadas, observou-se que apenas o fator período de avaliação foi significativo. Não houve diferença entre os reguladores nem entre as concentrações isoladamente testadas ($p=0,9020$). Na análise do número de gemas apenas o fator período de avaliação foi significativo ($p=0,0200$). Diferentemente do efeito positivo da Zeatina observado para um aumento do número de brotações em comparação com o uso de 2iP, verificado durante o estabelecimento *in vitro* de *Vaccinium ashei*, cv. Delite, por Schuch et al. (2008).

Para Machado et al. (2006), para a multiplicação de videira (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*) diferentes concentrações de cinetina avaliadas apresentaram o efeito semelhante à ausência do regulador. Além disso, a cinetina em concentrações de 20,0 μM não teve efeito na multiplicação. Os resultados encontrados no presente trabalho corroboram com Koruza & Jelaska (1993), que observaram inibição no crescimento das brotações de videira na subcultura repetida em meio de cultura com citocinina.

Para a formação de raízes houve interação significativa entre as citocininas e as concentrações testadas ($p=0,9130$).

Observou-se na análise de regressão que as concentrações de zeatina e cinetina influenciaram negativamente na formação das raízes. Na ausência deste regulador obteve-se a maior proporção de raízes formadas (Figura 24).

Já para a formação de calos na base dos explantes verificou-se que apenas o efeito das concentrações foi significativo ($p<0,0001$). Observou-se que o aumento das concentrações dos reguladores proporcionou maior formação de calos na base dos explantes (Figura 25).

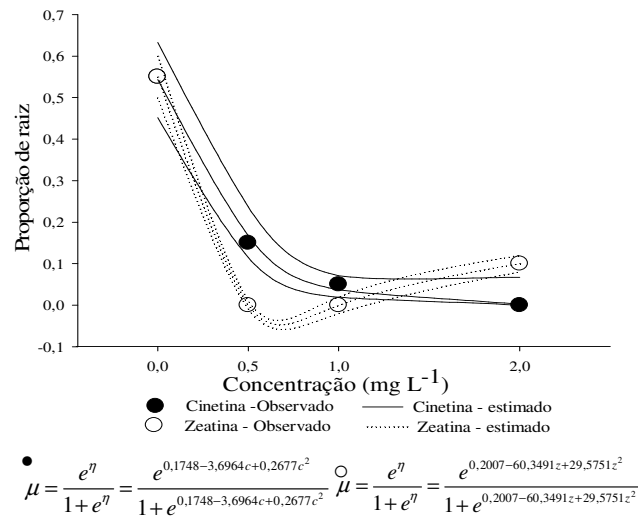


FIGURA 24 Valores médios e estimados da proporção de raízes em função das concentrações e dos reguladores obtidos a partir de segmentos apicais de *R.communis* L. As linhas laterais são os intervalos de confiança da regressão.

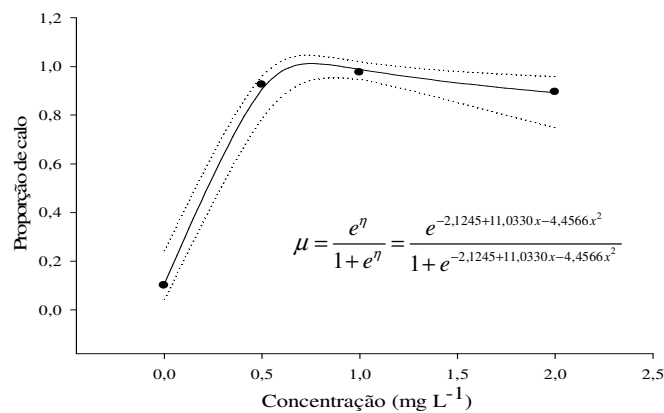


FIGURA 25 Valores médios e estimados da proporção de calo em função das concentrações e dos reguladores. As linhas pontilhadas são os intervalos de confiança da regressão.

Para a avaliação do aspecto vítreo dos explantes, verificou-se que apenas o efeito das concentrações foi significativo ($p < 0,0001$). Na análise de regressão desta característica observou-se que, com o aumento das concentrações dos reguladores de crescimento, houve uma crescente formação de explantes vitrificados (Figura 26).

Em geral, as citocininas utilizadas nestas análises não promoveram efeitos significativos sobre a brotação dos explantes, objetivo principal deste trabalho. Contudo, a vitrificação acentuada (Figura 26) dos explantes pode ter influenciado negativamente no desenvolvimento dos brotos. Pasqual (2001) cita que elevadas concentrações de citocininas podem reduzir o tamanho das brotações e estimular a ocorrência de hiperidricidade e formação de folhas anormais, sendo que estas últimas características não foram observadas nesta pesquisa.

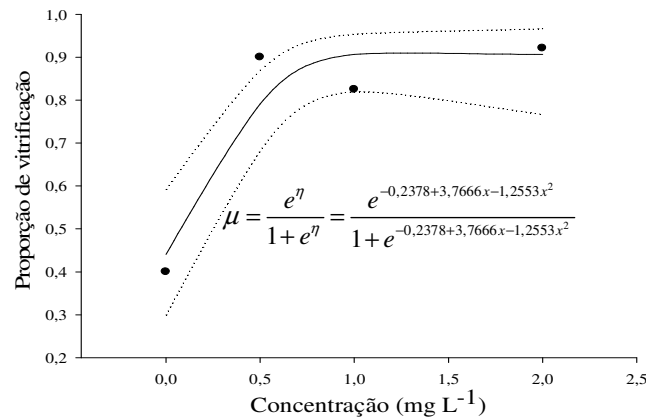


FIGURA 26 Valores médios e estimados da proporção de vitrificação em função das concentrações e dos reguladores. As linhas pontilhadas são os intervalos de confiança da regressão.

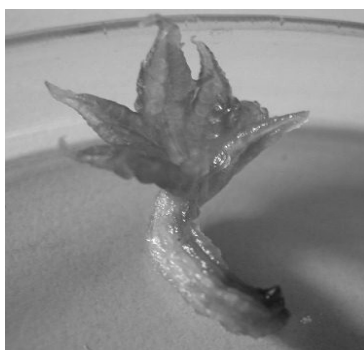


FIGURA 27 Plântula vitrificada cultivada em meio MS suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de cinetina.

5.3 Influência do ANA no enraizamento *in vitro*

No enraizamento dos brotos, verificou-se efeito significativo para as concentrações do regulador ANA para a variável número de folhas ($p=0,048$). Observou-se também efeito das diferentes concentrações do regulador para o desenvolvimento do sistema foliar (Figura 28).

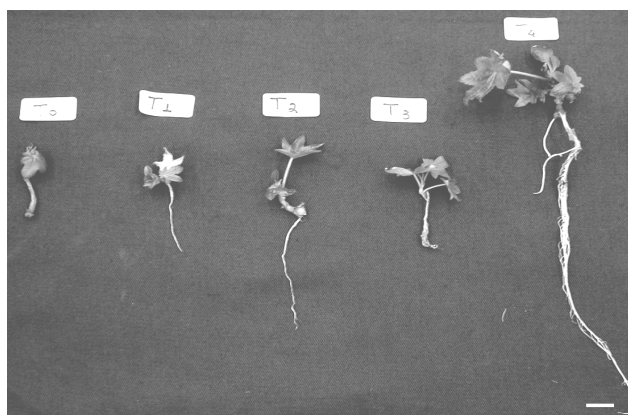


FIGURA 28 Aspecto visual das brotações enraizadas *in vitro* em meio MS e regulador de crescimento ANA ($T_0= 0,0$; $T_1= 1,5$; $T_2= 3,0$; $T_3=6,0$; $T_4=9,0 \text{ mg L}^{-1}$). (Br=1 cm)

Os valores médios, observados e estimados de número de folhas, em função das concentrações, indicaram que os maiores foram obtidos em concentrações mais elevadas do regulador (Figura 29).

Já para a formação de raízes, verificou-se que houve efeito significativo para as concentrações do regulador ($p=0,013$).

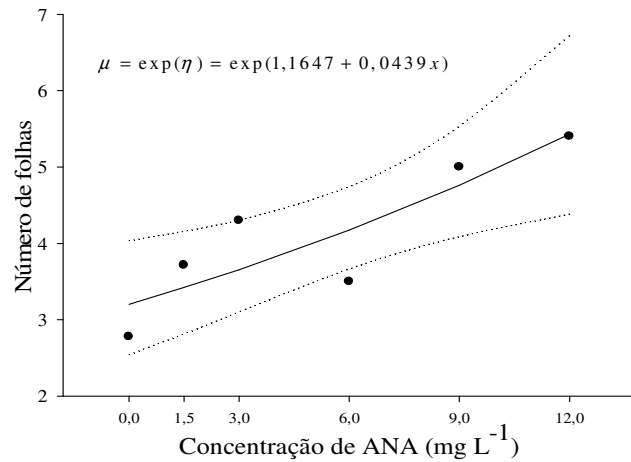


FIGURA 29 Valores médios e estimados do número de folhas em função das concentrações de ANA. As linhas pontilhadas são os intervalos de confiança da regressão.

Os valores médios, observados e estimados de número de raízes, em função das concentrações, indicaram efeito positivo das concentrações de 3,0 e 12,0 mg L⁻¹ (Figura 30).

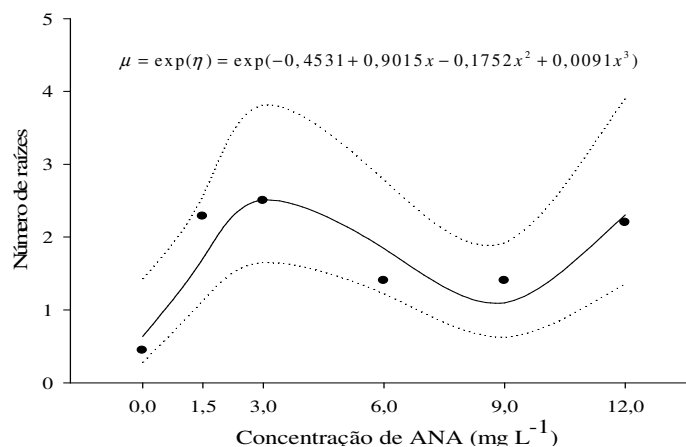


FIGURA 30 Valores médios e estimados do número de raízes em função das concentrações de ANA. As linhas pontilhadas são os intervalos de confiança da regressão.

Para a análise de comprimento das raízes formadas *in vitro*, verificou-se o efeito significativo para as concentrações do regulador ANA ($p=0,0310$). Nos valores médios, observados e estimados, de número de raízes, em função das concentrações, observou-se que as maiores concentrações (9 e 12 mg L⁻¹) utilizadas do regulador resultaram em maiores comprimentos médios de raízes, respectivamente, 11,5 cm e 11,25cm (Figura 31).

Resultados similares foram obtidos por Erig et al. (2004) para o enraizamento de pereira (*Pyrus communis* L.), em que puderam constatar que o número e comprimento médio das raízes desenvolvidas aumentaram com a concentração de ANA. Niciole et al. (2008), estudando o efeito deste regulador no enraizamento de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*), observaram a maior eficiência em meio suplementado com 4,0 mg L⁻¹.

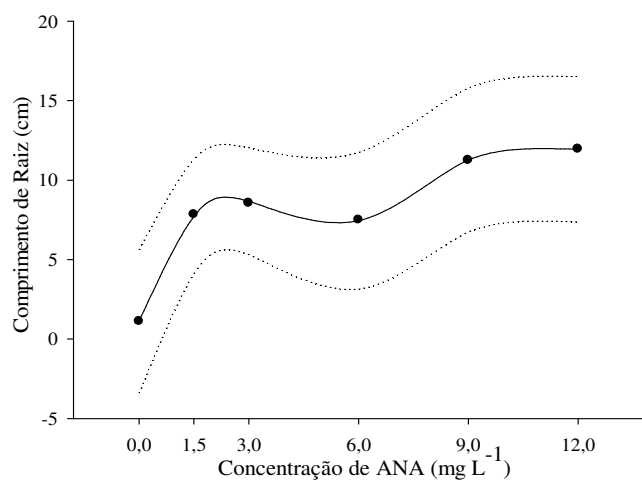


FIGURA 31 Valores médios e estimados do comprimento da raiz em função das concentrações de ANA. As linhas pontilhadas são os intervalos de confiança da regressão.

Para análise de variância do comprimento da parte aérea dos explantes, observou-se que o efeito para as concentrações do regulador ANA não foi significativo ($p=0,2643$).

Na análise do peso fresco e peso seco das raízes formadas, observou-se que os efeitos foram significativos para as concentrações do regulador ANA ($p=0,0004$).

Nos valores médios, observados e estimados, em função das concentrações, o maior peso fresco das raízes foi obtido na concentração de 3,0 mg L⁻¹ do regulador (Figura 32). Resultados semelhantes foram observados para o peso seco das raízes (Figura 33).

Para análise do peso fresco e seco da parte aérea, verificou-se que as concentrações usadas do regulador de crescimento não foram significativas ($p=0,4030$).

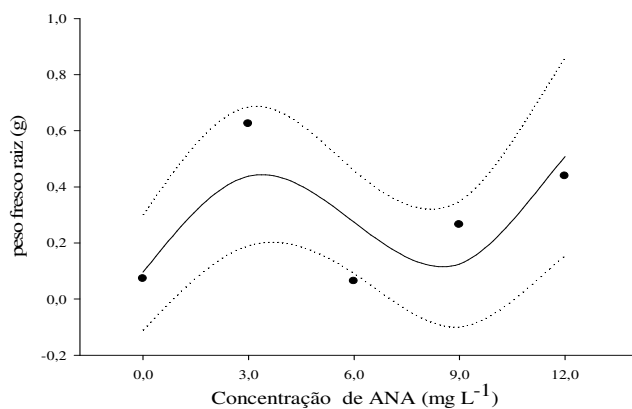


FIGURA 32 Valores médios e estimados do peso fresco das raízes em função das concentrações de ANA. As linhas pontilhadas são os intervalos de confiança da regressão.

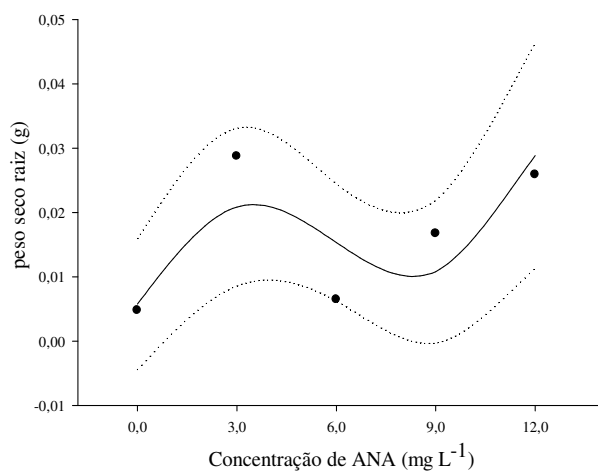


FIGURA 33 Valores médios e estimados do peso seco das raízes em função das concentrações de ANA. As linhas pontilhadas são os intervalos de confiança da regressão.

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), a rizogênese pode ser dividida em três fases: indução, iniciação e alongação. A duração destas fases pode variar de uma a três semanas. Para as duas fases iniciais, a presença da auxina é fundamental, enquanto que, na última, torna-se inibidora. Por isso, no presente trabalho, os explantes foram transferidos para o meio de cultura sem a adição do regulador de crescimento.

O enraizamento da mamoneira foi obtido por Carvalho (2005) com a concentração de $0,125 \text{ g L}^{-1}$ de AIA aplicada *ex vitro* nas brotações produzidas *in vitro*, o que possibilitou o melhor percentual de enraizamento. No entanto, em comparação econômica com outros reguladores de crescimento, a sua utilização é menos desvantajosa do que a aplicação de ANA ou AIB.

Os reguladores de crescimento mais utilizados para o enraizamento em diversas espécies de *Citrus* são ANA e AIB, nas concentrações de 0,25 a 1,0 mg L^{-1} de ANA e 0,25 mg L^{-1} de AIB para *Citrus sinensis* (Bouziid, 1986).

Farias et al. (1995), trabalhando com *Pyrus calleryana*, obtiveram até 50% de enraizamento utilizando $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA. Quando não se utilizou ANA no meio de cultura, a porcentagem de enraizamento foi nula, resultado este que concorda com os obtidos para a mamoneira, mostrando a importância deste regulador de crescimento para o enraizamento nesta espécie.

Foi observada grande quantidade de raízes secundárias e tricomas absorventes (dados não demonstrados).

6 CONCLUSÕES

O uso de GA_3 demonstra efeito negativo na germinação de *Ricinus communis*. A concentração completa do meio MS e o ajuste do pH para 5,8 são satisfatórios.

A suplementação do meio de cultura com a utilização de ANA na concentração de 1,0 mg L⁻¹ é determinante para a formação de plântulas não vitrificadas. O uso de altas concentrações de BAP e ANA, 2,0 mg L⁻¹ e 1,0 mg L⁻¹, respectivamente, favoreceu a maior formação de folhas. O uso de regulador ANA na concentração mínima de 0,01 mg L⁻¹ é determinante para a formação de gemas.

A utilização de Cinetina ou Zeatina favoreceu formação de calos e plântulas vitrificadas, sendo não indicadas para a indução de brotos *in vitro*.

A adição de ANA é eficiente para a formação de raízes, com o maior número e o maior comprimento verificados na concentração de 3,0 mg L⁻¹.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 Cellular and Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 43, n. 1, p. 9-15, Jan. 2007.

BORGES, N. S. S.; CORREIA, D.; ROSSETTI, A. G. Influência do meio bifásico na multiplicação de gemas e no alongamento de brotos *in vitro* de *Ananas lucidus* Miller. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 9, n. 1, p. 37-44, 2003.

BOUZID, S. “*In vitro*” micropropagation of mature *Citrus*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 6., 1986, Saint Paul. **Proceedings...** Saint Paul: Birkhäuser Basel, 1986. p. 35-43.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1998. p. 87-132.

CARVALHO, B. C. L. **Manual do cultivo da mamona**. Salvador: EBDA, 2005. 65 p.

- CENTENO, M. L.; RODRÍGUEZ, A.; FEITO, I.; FERNÁNDEZ, B. Relationship between endogenous auxin and cytokinin levels and the morphogenic responses in *Actinidia deliciosa* tissue cultures. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, n. 1/2, p. 58-62, 1996.
- CHEEMA, G. S.; SHARMA, D. P. *In vitro* propagation of apple rootstocks EMLA 25. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 131, p. 75-89, 1983.
- CONCEIÇÃO, H. E. O. da. **Cultivo *in vitro*, nutrição mineral e quantificação de rotenóides em tímós (*Derris* sp.)**. 2000. 191 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- COORDENADORIA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA INTEGRAL. Governo do Estado. **Biodiesel e mamona**. São Paulo, 2008. Disponível em: <http://www.cati.sp.gov.br/Cati/_principal/index.php>. Acesso em: 10 jan. 2009.
- COSTA, T. da; ZAFFARI, G. R. Micropropagação de *Ananás bracteatus* (Schultz) var. *striatus* Hort. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 11, p. 109-113, 2005.
- DEBERGH, P. C.; HARBAOURI, Y.; LEMEUR, R. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 53, p. 181-187, 1981.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W.; CHAVES, A. C. Enraizamento *in vitro* de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. carrik. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 001, p. 275-277, 2004.
- FARIAS, P. C. M.; PETERS, J. A.; NAKASU, B. H. Micropropagação de porta-enxerto de pereira *Pyrus calleryana* D-6. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 17, n. 1, p. 109-120, 1995.
- FIROOZABADY, E.; GUTTERSON, N. Cost-effective *in vitro* propagation methods for pineapple. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, n. 9, p. 844-850, June 2003.
- FREIRE, R. M. M. Ricinoquímica. In: AZEVEDO, D. M.; LIMA, E. F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2008. p. 295-336.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: part I: the technology.** Edington: Exegetics, 1996. 1574 p.

GEORGE, E. F. The components of tissue media. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G.-J. **Plant propagation by tissue culture.** 2.ed. Edington: Espringer, 1993. v. 9, p. 273-343.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1998. p. 183-260.

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-CNPH, 1990. p. 99-169.

HAN, B. H.; PAEK, K. Y.; CHOI, J. K. Micropropagation of *Gypsophila paniculata* through shooty tip culture *in vitro*. **Journal of Korean Society for Horticultural Science**, Korea, v. 32, n. 3, p. 394-400, 1991.

JOLY, A. B. **Introdução à taxonomia vegetal.** São Paulo: Nacional, 2002. 777 p.

KORUZA, B.; JELASKA, S. Influence of meristem culture and virus elimination on phenotypical modifications of grapevine (*Vitis vinifera* L., cv. Refosk). **Vitis**, Siebeldingen, v. 32, n. 1, p. 59-60, 1993.

LEIFERT, C.; PRYCE, S.; LUMSDEN, P. J.; WAITES, W. M. Effect of medium acidity on growth and rooting of different plant species growing *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 30, n. 3, p. 171-179, 1992.

LESHEM, B.; SACHS, T. Vitriified *Dianthus teratomata in vitro* due to growth factor imbalance. **Annals of Botany**, Wageningen, v. 56, n. 5, p. 613-617, 1985.

MACEDO, F. C. O.; MILANI, M.; CARVALHO, J. M. F. C.; ANDRADE, F. P. de. Produção de mudas de mamoneira (*Ricinus communis* L.) a partir da estimulação de estacas pelo ácido 3-indolacético (AIA) e pelo ácido indol butírico (AIB). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 2., 2006, Aracaju. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão/Embrapa Tabuleiro Costeiro/SAGRI15, 2006. Disponível em: <<http://www.congressomamona.se.gov.br/>>. Acesso em: 10 jan. 2009.

MACHADO, M. P. BIASI, L. A.; RITTER, M.; RIBAS, L. L. F.; KOEHL H. S. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de videira 'VR043-43' (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*). **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 648-655, jul./ago. 2006.

MAESTRI, M.; VIEIRA, C. Nota sobre a redução da porcentagem de germinação de sementes de café (*Coffea arabica* L. var. Bourbon), por efeito do ácido giberélico. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 11, n. 65, p. 247-249, 1961.

MILANI, M.; MIGUEL JÚNIOR, S. R.; OLIVEIRA, É. C. S.; NÓBREGA, M. B. de M. V.; COSTA, M. N. **Caracterização taxonômica de acessos de mamona (*Ricinus communis* L.) do banco ativo de germoplasma da Embrapa Algodão**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 17 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 67).

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, New York, v. 25, p. 135-166, 1974.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, Oct. 1962.

NASS, L. L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C.; PESCADOR, R.; ARAÚJO, P. S.; MAAS, C. H.; REBELO, R. A.; GIOTO, C. R.; WENDHAUSEN JR., R.; LARGURA, G.; TAVARES, L. B. B. Biotecnologia de *Piper hispidinervium*-pimenta longa. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 15, p. 19-23. 2000.

NICIOLI, P. M.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; SANTANA, J. R. F. de; SILVA, L. C.; SILVA, D. P. C. da; PORTO, J. M. P. Ajuste do protocolo de micropropagação de Barbatimão. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 685-689, maio/jul. 2008.

OCHATT, S. J.; CASO, O. M. In vitro meristem of M4 apple (*Malus pumila* Lill.) optimal nutrient medium. **Plant Cell and Organ Culture**, New York, v. 2, p. 39-48, 1983.

PAEK, K. Y.; HAN, B. H.; CHOI, S. L. Physiological, biochemical and morphological characteristics of vitrification shoot regenerated *in vitro*. **Korean Journal of Plant Tissue Culture**, Texas, v. 18, n. 3, p. 151-162, 1991.

PAIVA, P. D. O.; PASQUAL, M.; PAIVA, R. Efeito de concentrações de ágar e níveis de pH na propagação *in vitro* de crisântemo. **Revista Ceres**, Lavras, n. 46, p. 141-148, 1999.

PASQUAL, M.; HOSHIDA, E.; ISHIDA, J. S. Influência de diferentes concentrações de sacarose e sais minerais sobre a multiplicação *in vitro* de *Nephrolepis exaltata* uma samambaia ornamental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 11, p. 1681-1684, 1994.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações: meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 74 p.

PEIXOTO, P. H. P.; PASQUAL, M. Micropropagação da videira: efeitos do pH e do ágar. **Revista Ceres**, Lavras, v. 42, p. 432-443, 1995.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 356 p.

POMPELLI, M. F. **Morfogênese *in vitro*, métodos de micropropagação e conservação de germoplasma de *Dyckia distachia* Hassler**. 2002. 93 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Curso de Pós Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing reference index version 2.8.0**. Vienna, Austria: Foundation for Statistical Computing, 2008. Pacote estatístico R Software livre UFG. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 16 nov. 2008.

SCHUCH, M. W.; DAMIANI, C. R.; SILVA, L. C. da; ERIG, A. C. Micropropagação como técnica de rejuvenescimento em mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cultivar climax. **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 814-820, 2008.

SILVEIRA, C. A. P.; CITADIN, I.; FORTES, G. R. de L. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira m-7 (*Malus* sp.) sob diferentes tipos e concentrações de auxinas. **Revista Brasileira de Agrocência**, Pelotas, v. 7, n. 2, p. 107-109, maio/ago. 2001.

SKIRVIN, R. M.; CHU, M. C.; MANN, M. L. Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time and cultured plant material. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 5, n. 4, p. 292-294, Aug. 1986.

STEIN, V. C.; PAIVA, R.; SOARES, F. P.; NOGUEIRA, R. C.; SILVA, L. C.; EMRICH, E. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de *Inga vera* Willd. subsp. *Affinis* (DC.) T.D. Penn. **Ciências & Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1702-1708, nov./dez. 2007.

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**, Berlin, v. 17, n. 6/7, p. 561-566, Apr. 1998.

TAKAKI, M.; DIETRICH, S. M. C.; FURTADO, J. S. Anatomical changes in the hard endosperm of gibberellic acid-treated coffee seeds during germination. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 103-106, dez. 1979.

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. 88 p.

YUI, E.; PASQUAL, M.; RAMOS, J. D. Efeito de reguladores de crescimento sobre a proliferação *in vitro* de porta-enxertos de macieira cv. M.7. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 5, p. 597-602, 1993.