

CULTIVO *IN VITRO* DE NABO FORRAGEIRO

CULTIVATION *IN VITRO* OF NABO FORRAGEIRO

Débora de Oliveira Prudente, deboraoprudente@outlook.com

Joselma Moreira Resende, joselma_resende@hotmail.com

Prof. Dra. Fernanda Carlota Nery

Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais

Submetido em 16/09/2015

Revisado em 07/10/2015

Aprovado em 10/12/2015

Resumo: Objetivou-se estudar a germinação e propagação *in vitro* de nabo forrageiro. As sementes passaram por assepsia e foram inoculadas em meio de cultura MS e WPM. Plântulas com 5 cm foram inoculadas em tubos de ensaio contendo WPM, suplementado com diferentes concentrações de BAP e para o enraizamento *in vitro* brotações foram inoculadas em meio WPM suplementado com AIB. Para a indução de calos foram utilizados segmentos foliares, hipocotiledonares e radiculares em meio WPM suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D. Houve maior porcentagem de germinação (85%), maior comprimento médio da parte aérea (6,08) e maior número de raízes (2,40) no meio de cultura WPM. A concentração de 1,3 mg L⁻¹ de BAP favoreceu a maior porcentagem de formação de brotações secundárias (80%). O tratamento com 1,5 mg L⁻¹ de AIB obteve maior porcentagem de enraizamento (65%) e a ausência de fitorreguladores favoreceu a calogênese em explantes foliares (25%), já em explantes hipocotiledonares a concentração de 1,2 mg L⁻¹ favoreceu maior formação de calos (45%) e para explantes radiculares a concentração de 2,3 mg L⁻¹ resultou em maiores porcentagens de indução de calos.

Palavras chave: *Raphanus sativus* L. var. *oleiferus* Metzg. Oleaginosa. Cultura de tecidos.

Abstract: The objective was to study the germination and *in vitro* propagation of nabo forrageiro. The seeds have undergone sterilization and were inoculated in medium MS and WPM. Seedlings with 5 cm were inoculated in test tubes containing WPM supplemented with different concentrations of BAP and the enraizamento *in vitro* shoots were inoculated in WPM medium supplemented with IBA. For callus induction were used leaf segments, hypocotyl and root in WPM medium supplemented with different concentrations of 2,4-D. There was a higher germination percentage (85%), higher average length of shoot (6.08) and highest number of roots (2.40) in WPM medium. The concentration of 1.3 mg L⁻¹ BAP favored the highest percentage of formation of secondary shoots (80%). Treatment with 1.5 mg L⁻¹ IBA obtained the highest rooting percentage (65%) and the absence of growth regulators favored the callus formation in leaf explants

(25%) as early as explants hypocotyledonar concentration of 1.2 mg L⁻¹ favored higher callus formation (45%) and root explants concentration of 2.3 mg L⁻¹ resulted in a higher callus induction percentages.

Keywords: *Raphanus sativus* L. var. *oleiferus* Metzg. Oilseed. Tissue culture.

Introdução

Nas últimas décadas, os combustíveis renováveis ganharam importância devido as crescentes preocupações ambientais geradas pela extração de petróleo e principalmente em razão da constante variação dos preços no mercado internacional gerado pelo crescente esgotamento dos recursos petrolíferos (ZUNIGA et al., 2014). Entre as novas fontes energéticas renováveis, o biodiesel, integra uma solução viável e de grande potencial na substituição dos combustíveis fósseis derivados do petróleo (HOLANDA, 2004).

No entanto, as pesquisas atuais com espécies oleaginosas que sejam economicamente viáveis na produção de biodiesel, ainda é incipiente e não abrange a maioria das espécies em potencial, como: colza, canola, mamona, coco, tungue, pinhão-manso, crambe, nabo forrageiro, entre outras (CAMARGOS, 2005; CASTRO et al., 2010). Dentre estas espécies, o nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L. var. *oleiferus* Metzg.), se destaca por apresentar em suas sementes consideráveis teores de óleo, 30% a 43%, com relativa facilidade de extração e baixa viscosidade, podendo se tornar matéria-prima de substancial interesse aos produtores rurais para produção de óleo em programas sustentáveis (SILVA et al., 2007; MAPA, 2014).

Contudo, uma das deficiências no aproveitamento dessa espécie para produção de óleo é a baixa disponibilidade de lotes de sementes de qualidade no mercado, plantios desuniformes e a incipiência de tecnologias para produção em larga escala de mudas saudáveis. Sendo apontados como os principais fatores que limitam a expansão da cultura (NERY, 2008). Logo, a produção *in vitro* de nabo forrageiro se torna uma ferramenta importante, tanto para maximizar a taxa de germinação dessa espécie quanto para obter plantas com elevado potencial fisiológico, proporcionando uniformidade das mudas, alto vigor, ausência de doenças transmitidas via semente e, por conseguinte, maior produtividade (ANDRADE et al., 2000; NUNES et al., 2008).

Os vários tipos de respostas morfogênicas *in vitro* apresentadas por diferentes espécies fazem com que seja necessário o estabelecimento de condições padronizadas de cultivo para cada uma delas e tipos de explantes utilizados (NOLETO & SILVEIRA, 2004). Portanto, a escolha adequada do meio nutritivo e a padronização das condições de cultivo faz-se necessário para o desenvolvimento de pesquisas que possam auxiliar na futura produção em larga escala desta cultura (RADMAN et al., 2009). Diante do exposto, objetivou-se estudar a germinação e propagação *in vitro* do nabo forrageiro, visando técnicas alternativas que otimizem o sistema produtivo da espécie.

Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, localizado no Campus CTAN, na Universidade Federal de São João Del Rei – UFSJ.

Germinação *in vitro*

Foram utilizados sementes de nabo forrageiro da cultivar CATI AL 1000, obtidas comercialmente. As sementes foram levadas à câmara de fluxo laminar, imersas em álcool 70% por um minuto e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) com 1% de cloro ativo por 15 minutos e lavadas cinco vezes em água destilada autoclavada. As sementes foram inoculadas em diferentes meios de cultura. Os meios de cultura utilizados foram o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e o *Woody Plant Medium* (WPM) (LLOYD & MCCOWN, 1981) acrescidos de 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos. Após inoculadas, as sementes foram mantidas em sala de crescimento sob irradiância de fótons de 36 µmol m⁻² s⁻¹, temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas. A avaliação foi realizada aos 30 dias de cultivo *in vitro*, sendo avaliada a porcentagem de sementes germinadas (protrusão radicular a ± 2,0 mm) em cada tratamento, comprimento médio da parte aérea (cm) e número médio de raízes.

Efeito do BAP na indução de brotações

Plântulas oriundas da germinação *in vitro*, com 5 cm de comprimento e 2 folhas foram utilizadas como explantes para este experimento. As plântulas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura WPM, suplementado com diferentes concentrações de BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg L⁻¹), 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos. Após a inoculação os tubos foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de 36 µmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C. A avaliação foi realizada aos 30 dias de cultivo *in vitro*, sendo avaliado o número de brotações secundárias, o comprimento da maior brotação e o número de folhas por explante.

Efeito do AIB no enraizamento *in vitro* de brotações

As brotações obtidas *in vitro* foram repicadas e inoculadas em meio de cultura WPM, contendo diferentes concentrações de AIB (0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg L⁻¹), 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos. Após a inoculação os tubos foram mantidos em sala de crescimento sob irradiância de 36 µmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C. A avaliação foi realizada aos 30 dias de cultivo *in vitro*, sendo avaliado a porcentagem de enraizamento nos diferentes tratamentos.

Efeito do 2,4-D na indução de calos

Foram utilizados segmentos foliares, hipocotiledonares e radiculares obtidos de brotações multiplicadas e enraizadas *in vitro*. As folhas foram excisadas em diâmetros de aproximadamente 1 cm² e os explantes hipocotiledonares e radiculares com aproximadamente 1 cm de comprimento. Os segmentos foram inoculados em meio de cultura WPM, suplementado com diferentes concentrações de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹) além de 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar. O pH foi corrigido para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C, durante 20 minutos. Após a inoculação os tubos foram mantidos em sala de crescimento na ausência de luz em temperatura de 25 ± 2°C. A avaliação

foi realizada 30 dias após a inoculação, avaliando-se a porcentagem de indução de calos nos diferentes tratamentos.

Aclimatização

30 brotações de nabo forrageiro enraizadas *in vitro*, com 60 dias de cultivo, oriundas do melhor tratamento de multiplicação e enraizamento, foram transferidas diretamente para recipientes plásticos (50 mL) contendo Plantmax® e envoltas com saco plástico transparente para manutenção da umidade relativa no ambiente. Esses recipientes foram mantidos em sala de crescimento à temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e irradiância de fótons de $67 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Neste mesmo período, o saco plástico foi perfurado até a remoção completa, visando à redução gradual da umidade relativa. Aos 20 dias, os recipientes com as plantas foram levados para casa de vegetação, onde permaneceram por mais 10 dias. Aos 30 dias, foi realizada a avaliação da porcentagem de sobrevivência ao ambiente *ex vitro*.

Análises estatísticas

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com 30 repetições por tratamento, sendo que cada repetição foi composta por um tubo de ensaio contendo uma semente, brotação ou explante. Aplicou-se a análise de regressão polinomial até segundo grau, para avaliar o efeito das concentrações de AIB, BAP e 2,4-D sobre o enraizamento e a porcentagem de formação de calos, respectivamente. A análise de variância foi realizada utilizando-se o software estatístico SISVAR® (FERREIRA, 2011), comparando as médias pelo teste de Tukey com probabilidade de 5%

Resultados

Germinação *in vitro*

Houve diferença significativa na germinação das sementes de nabo forrageiro *in vitro*, com maior porcentagem de germinação no meio de cultura WPM (85%) (Figura 1A), maior comprimento médio da parte aérea (6,08 cm) (Figura 1B) e maior número de raízes (2,40) (Figura 1C). O aspecto visual das

sementes de nabo forrageiro *in vitro* e o comprimento de suas raízes, está ilustrado nas Figuras 4A e 4B.

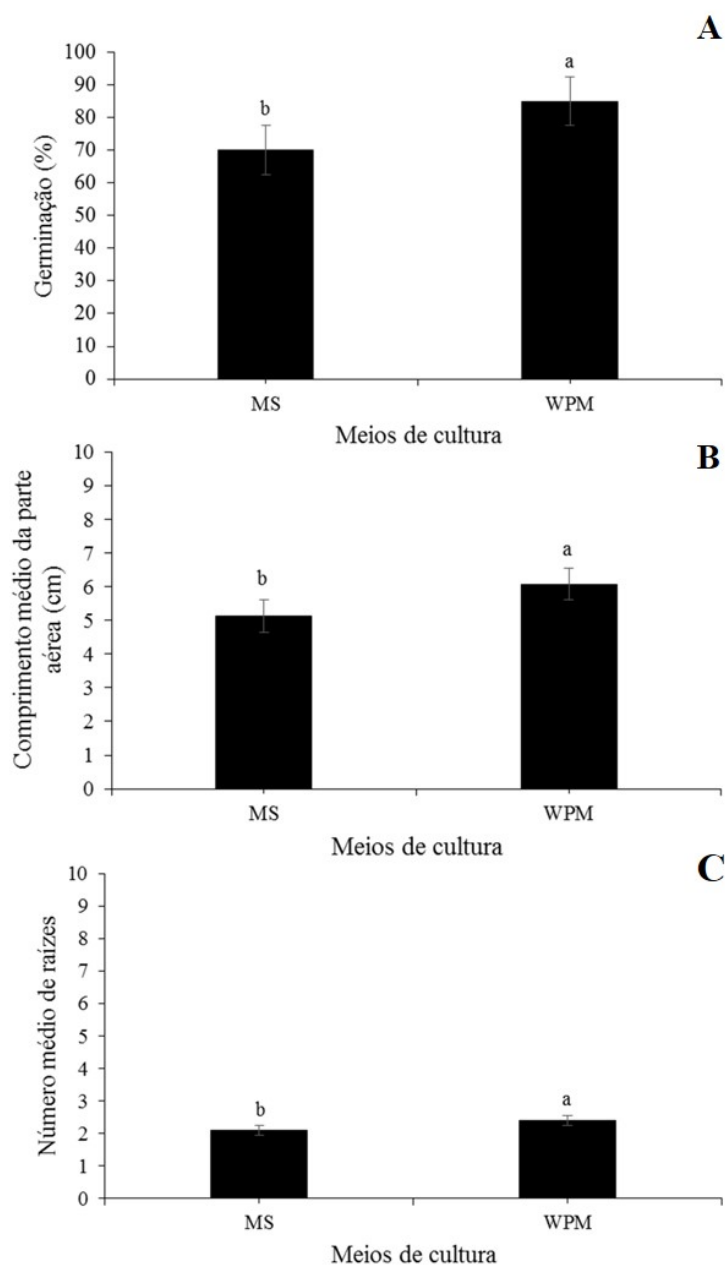


Figura 1 - Porcentagem de germinação de sementes, comprimento médio da parte aérea e número médio de raízes de nabo forrageiro em diferentes meios de cultura (MS e WPM). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

A maior porcentagem de germinação em meio de cultura WPM pode ser justificada pelo fato de que o meio WPM possui concentrações menores de nitrogênio total (ROCHA et al., 2007) e apenas 45% da força iônica total do meio MS (NUNES et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2011), sendo condição ótima para iniciar a germinação em nabo forrageiro.

Efeito do BAP na indução de brotações

Pelos resultados obtidos verificou-se diferenças significativas entre as porcentagens de formação de brotações. Aos 30 dias após a inoculação a concentração de $1,3 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP favoreceu a maior porcentagem de formação de brotações secundárias (80%) em plântulas de nabo forrageiro (Figura 2A) e (Figura 4C). Já para o número médio de folhas em cada brotação, a concentração de $1,8 \text{ mg L}^{-1}$ obteve os melhores resultados (3,70).

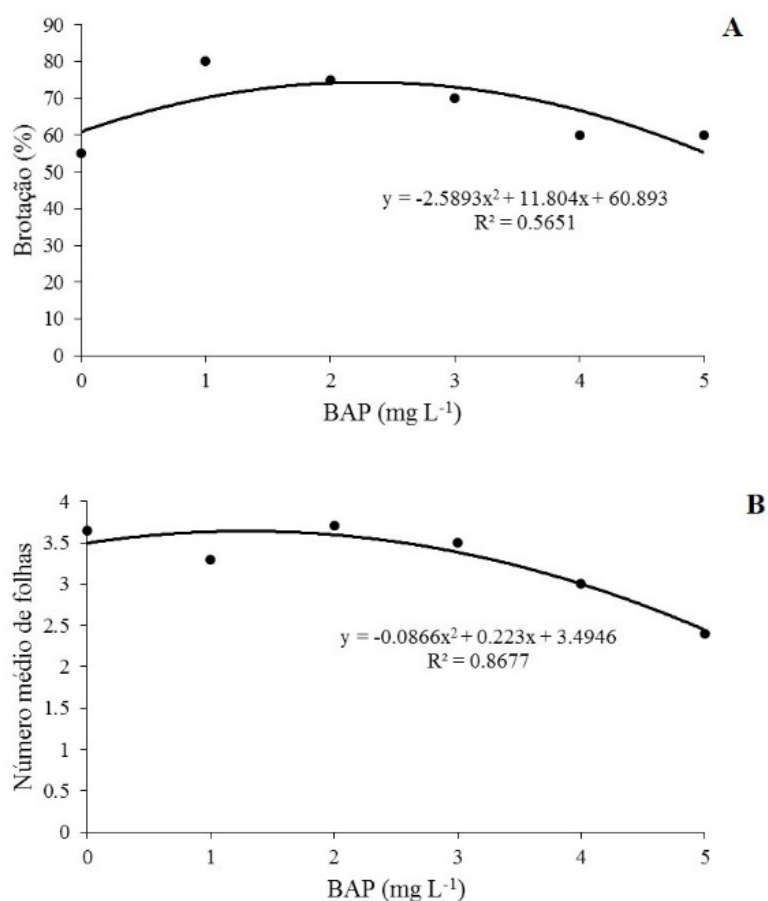


Figura 2 - Porcentagem de formação de brotações em função de diferentes concentrações de BAP no meio de cultura WPM (A) e número médio de folhas (B) aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com Vicente et al. (2009) em estudos com *Vernonia condensata*, onde, obteve resultados significativos para a concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP aumentando significativamente as brotações.

Efeito do AIB no enraizamento *in vitro* de brotações

Houve uma diferença significativa para a porcentagem de enraizamento das brotações. O tratamento com $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB obteve maior porcentagem de enraizamento (65%) (Figura 3).

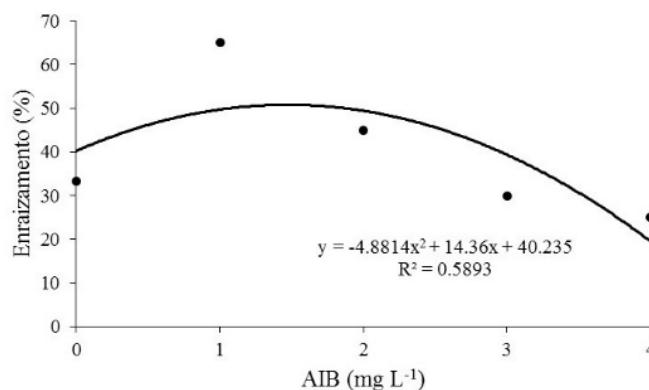


Figura 3 - Efeito de diferentes concentrações de AIB no enraizamento *in vitro* de brotações de nabo forrageiro aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

Bertoni (2006) também obteve no seu trabalho com *Calendula officinalis* L., aproximadamente 80% de enraizamento quando suplementou o meio $\frac{1}{2}$ MS com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB, evidenciando assim que a presença de auxinas podem promover o desenvolvimento radicular de diferentes espécies.

Aclimatização

As brotações obtidas na multiplicação *in vitro* foram aclimatizadas em período de 30 dias, porém só foi observado a média de 27% de sobrevivência (Figura 4D). Evidenciando a fragilidade dos tecidos de nabo forrageiro.

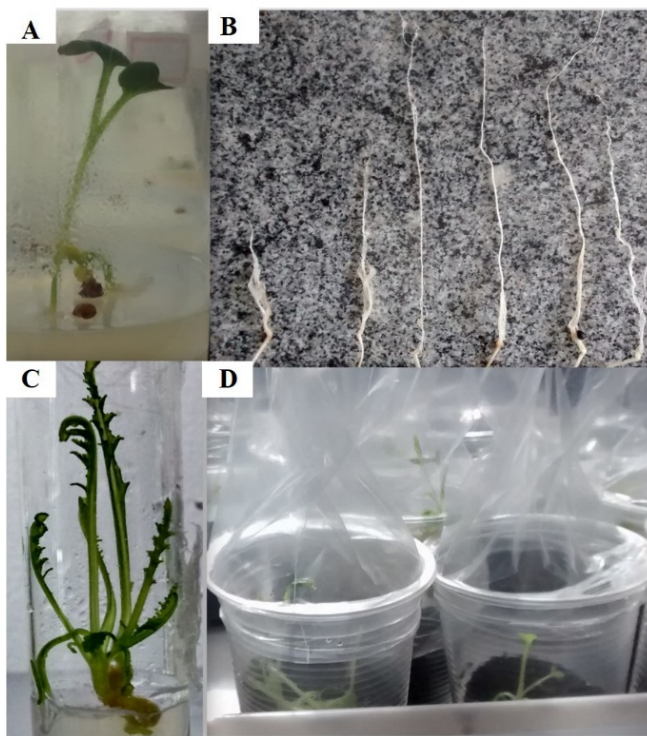


Figura 4 - Aspecto visual de plântulas de nabo forrageiro germinadas *in vitro* (A) comprimento de raízes em diferentes tratamentos (B), brotações *in vitro* (C) e brotações aclimatizadas (D).

Efeito do 2,4-D na indução de calos

Aos 30 dias após a inoculação a ausência de fitorreguladores favoreceu a calogênese em explantes foliares (25%) já em explantes hipocotiledonares a concentração de $1,2 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D favoreceu maior formação de calos (45%) e para explantes radiculares a concentração de $2,3 \text{ mg L}^{-1}$ (10%) obteve os melhores resultados (Figura 5). O aspecto visual dos calos está ilustrado na Figura 6.

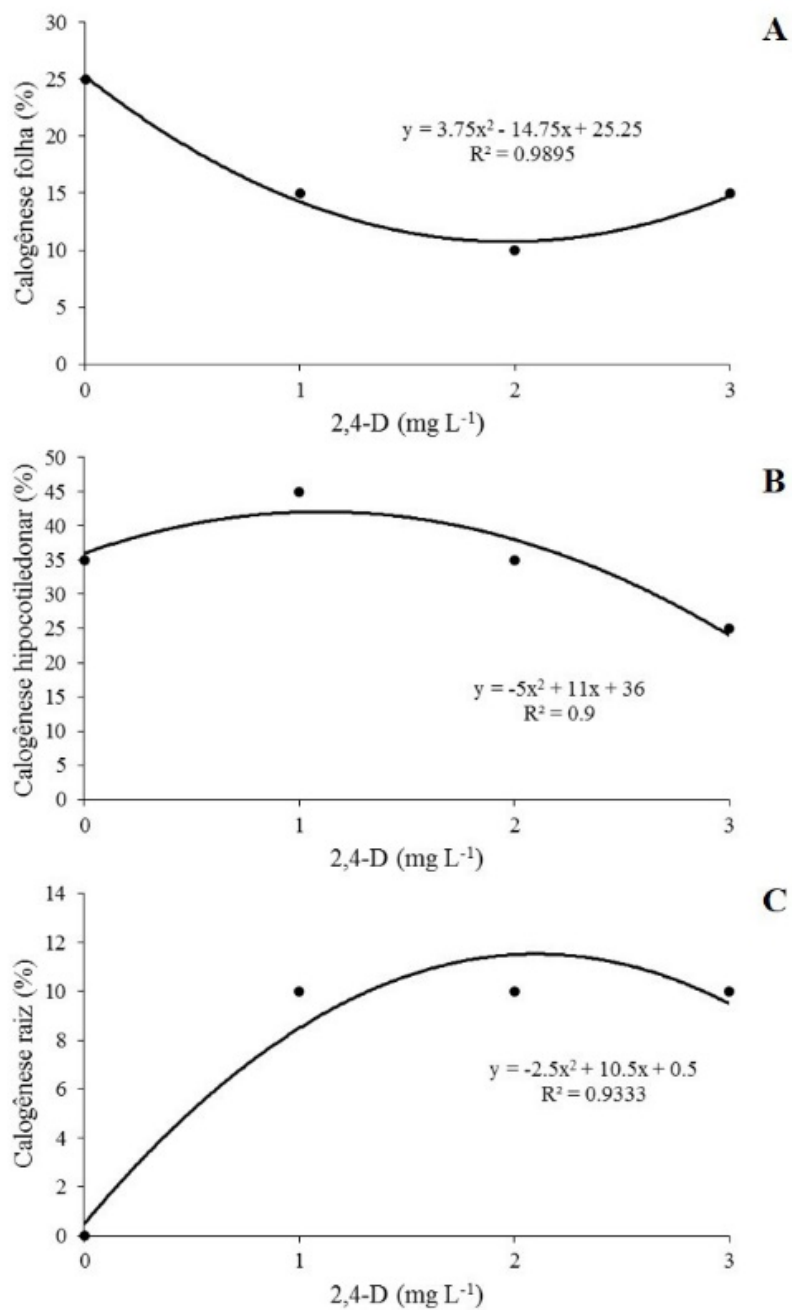


Figura 5 - Porcentagem de formação de calos em função de diferentes concentrações de 2,4-D no meio de cultura WPM, em explantes foliares (A), hipocotiledonares (B) e radiculares (C) de nabo forrageiro aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

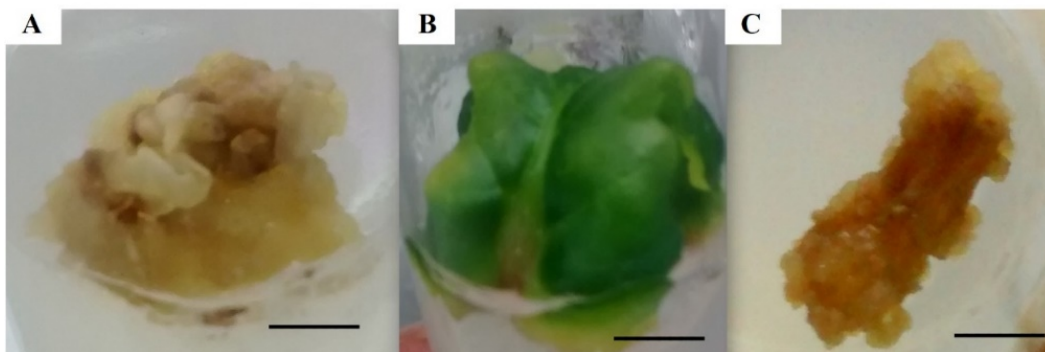


Figura 6 - Formação de calos em nabo forrageiro a partir de explantes hipocotiledonares (A) foliares (B) e radiculares (C) aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

Os resultados indicam que as fontes de explantes utilizadas possuem uma quantidade de hormônios endógenos adequada para iniciar a diferenciação celular, sendo suficiente para a indução de calos. Porém a adição de 2,4-D foi benéfica para incrementar a produção de calos em explantes hipocotiledonares. Esse resultado também foi observado por Itaya et al. (2005), que trabalhando com a indução de calos em *Viguiera discolor*, obteve resultados positivos utilizando 2,4-D a $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ em segmentos nodais.

Conclusões

A germinação e propagação *in vitro* do nabo forrageiro foram alcançados com sucesso, com a utilização do meio de cultura WPM e $1,3 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. Os resultados alcançados neste estudo são contribuições valiosas que no futuro poderão viabilizar a produção assexuada em larga escala de plantas com potencial econômico, como nabo forrageiro.

Agradecimentos

Agradeço à UFSJ pela oportunidade e ao CNPq pelo apoio financeiro, possibilitando o desenvolvimento desta pesquisa.

Referências

- ANDRADE, E. B. **Programa Brasileiro de desenvolvimento tecnológico de combustíveis alternativos**. Disponível em: <http://www.tecpar.br/cerbio/seminários-palestras.htm>. Acesso em 23 de julho de 2015.
- BERTONI, B. W.; DAMIÃO FILHO, C. F.; MORO, J. R.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A.M.S. Micropropagação de *Calendula officinalis* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.8, n.2, p.48-54, 2006.
- CAMARGOS, R.R.S. **Avaliação da viabilidade de se produzir biodiesel através da transesterificação de óleo de grãos de café defeituosos**. Belo Horizonte: UFMG, 2005. 105 p. (Dissertação de Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CASTRO, A. M. G. et al. **Complexo Agroindustrial de Biodiesel no Brasil.: competitividade das Cadeias Produtivas de Matérias-Primas**. Brasília-DF. Embrapa Agroenergia, 2010.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- HOLANDA, A. **Biodiesel e inclusão social**. Brasília: câmara dos deputados, coordenação de publicações, 2004.
- ITAYA, N. M. et al. Produção de frutanos em calos e plântulas clonadas *in vitro* de *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae). **Acta Botânica Brasilica**, v. 19, p. 579-586, 2005.
- LLOYD, G.; Mc COWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendro* spp. **HortScience**, v. 15, n. 3, p. 416, 1980.
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano Nacional de Agroenergia 20011-2014**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2014. 110 p.

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

NERY, M.C. **Colheita, beneficiamento e controle de qualidade de sementes de nabo forrageiro**. Lavras: UFLA, 2008. 180 p. (Tese – Doutorado).

NOLETO, L. G.; SILVEIRA, C.E. dos S. Micropropagação de Copaíba. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 33, p. 109-120. 2004.

NUNES, C. F. et al. Diferentes suplementos no cultivo *in vitro* de embriões de pinhão-manso. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.1, p.9-14, 2008.

NUNES, C.F. et al. Diferentes suplementos no cultivo in vitro de embriões de pinhão-manso. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 43, n. 1, p. 9-14, 2008.

OLIVEIRA, M.L. et al. Effects of culture medium and BAP/NAA ratio on in vitro multiplication of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* clones in a temporary immersion bioreactor. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, n. 6, p. 1207-1217, 2011.

RADMANN, E.B. et al. Multiplicação *in vitro* e alongamento das brotações micropropagadas do portaenxerto 'Tsukuba 1' (*Prunus persica* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.31, n.3, p. 656-663, 2009.

ROCHA, S.C. et al. Micropropagation of *Cabralea canjerana*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 1, p. 43-50, 2007.

SILVA, A. R. B. et al. Comportamento de cultivares de nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L.) em função da variação do espaçamento entre linhas. Disponível em: <<http://www.portal do biodiesel.gov.br>> Acesso em: 12 abr. 2014.

ZUNIGA, A. D. G. et al. Situação atual e perspectivas do biodiesel no estado do Tocantins. **Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, v. 1, n. 01, p. 263-278, 2014