

MEIOS DE CULTURA NO DESENVOLVIMENTO DE ÁPICES CAULINARES DE MAMONEIRA (*Ricinus communis* L.) *in vitro*

Culture media on *in vitro* development of castor bean (*Ricinus communis* L.) stem tips

Fernanda Bertozzo¹, Isaac Stringueta Machado²

RESUMO

A pesquisa da composição do meio de cultura mais adequado à espécie vegetal e ao tipo de explante empregado é o fator de maior relevância da cultura de tecidos. O cultivo de ápice caulinar com recuperação da planta matriz é uma técnica de grande impacto para a propagação de plantas *in vitro*, regeneração de plantas livres de vírus, conservação de germoplasma e modificação genética. Objetivou-se, neste trabalho, avaliar composições do meio de cultivo para organogênese direta *in vitro* a partir de ápices caulinares pertencentes à população FCA-UNESP-PB de mamoneira (*Ricinus communis* L.), com vistas à propagação clonal de genótipos elite. Foram testadas quatro formulações: MS básico (T1), MS modificado 1 (T2), MS modificado 2 (T3) e WPM (T4), em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 20 repetições em cada tratamento, sendo a repetição 1 ápice caulinar/frasco. O T3 apresentou-se superior e diferiu significativamente dos outros tratamentos apresentando 35% dos ápices caulinares diferenciados e desenvolvidos; seguiu-se o T2 com 10% e os tratamentos T1 e T4 não apresentaram diferenciação de tecidos. Os resultados permitiram concluir que os balanceamentos de sais minerais nos meios de cultura avaliados, especialmente a relação $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$ e ausência de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, indicaram grande influência no desenvolvimento de ápices caulinares de mamoneira.

Termos para indexação: Ápices caulinares, cultura de tecidos, organogênese direta.

ABSTRACT

The research of the culture medium composition suitable for plant species and the type of explant to be used is the most significant factor in plant tissue culture. The culture of stem tips with plant donor recovery is a technique of great impact for the *in vitro* plant production, regeneration of virus-free plants, germoplasm conservation and genetic modification. The objective of this study was to evaluate culture media composition *in vitro* on direct organogenesis of the FCA-UNESP-PB population of castor bean (*Ricinus communis* L.), from stem tips for clonal propagation of elite genotypes. Four formulations were tested: basic MS (T1), modified MS 1 (T2), modified MS 2 (T3) and WPM (T4) in a completely randomized experimental design with 20 replicates pretreatment with 1 stem tip/flask. The treatment T3 was superior, and differed significantly from the other treatments, with 35% of stem tips developed, followed by 10% in T2. T1 and T4 showed no plant tissue differentiation. The results allowed to conclude that the balance of mineral salts and culture media evaluated especially the rate $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$ and the absence of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ showed high influence on the development of stem tips of castor bean.

Index terms: Stem tips, plant tissue culture, direct organogenesis.

(Recebido em 17 de junho de 2009 e aprovado em 10 de março de 2010)

INTRODUÇÃO

A planta *Ricinus communis* L. pertence à família Euphorbiaceae, que possui cerca de 290 gêneros e aproximadamente 7.500 espécies (Angely, 1970; Joly, 1979; Barroso, 1986). Aclimatou-se às condições edafoclimáticas brasileiras sendo encontrada em, praticamente, todas as regiões. O processamento de suas sementes dá origem ao óleo e à torta. Seu cultivo apresenta importância socioeconômica crescente, pois o óleo extraído de suas sementes presta-se a uma ampla gama de setores da indústria. Representa hoje, devido às suas características físico-químicas, uma das alternativas para produção de biodiesel; podendo ser utilizada ainda, como matéria-prima da indústria

de fármacos, biopolímeros e outros. Além disso, a haste da mamoneira pode servir como fornecedora de celulose própria para a fabricação de papel (Azzini et al., 1984). A torta, subproduto da extração do óleo das sementes, é um adubo orgânico de elevado valor econômico, além de apresentar propriedades nematocidas (Akhtar & Mahmood, 1996) e inseticidas (Carlini & Sá, 2002).

No Brasil, existem programas que têm como base o melhoramento genético da mamoneira. Um dos objetivos desses programas é a produção de híbridos comerciais. Entre as etapas iniciais desse processo está a obtenção de linhagens pistiladas, ou seja, plantas que possuem racemos com 100% de flores femininas. O grande entrave do desenvolvimento dessas plantas é que as mesmas não

¹Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrônomicas – Campus Botucatu – Rua José Barbosa de Barros, 1780 – Cx. P. 237 – 18610-307 – Botucatu, SP – fbertozzo@yahoo.com.br

²Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrônomicas – Campus Botucatu – Botucatu, SP

podem ser autofecundadas, já que não possuem flores masculinas em seus racemos; então surge a necessidade do cruzamento com plantas monóicas para que se dê continuidade ao processo de reprodução. Nesse momento, perde-se a pureza genética das plantas devido ao cruzamento com plantas monóicas. Surge então a necessidade de um método eficaz de propagação assexuada no qual a pureza genética seja mantida juntamente com a produção de clones.

A micropropagação possibilita a multiplicação por via assexuada resultando em um grande número de descendentes. Genótipos superiores podem ser multiplicados sem modificação em sua estrutura genética, fato que é de extrema importância para manutenção de características desejadas conseguidas através de um programa de melhoramento. Possibilita ainda, proporcionar maior precocidade na produção e abreviar o tempo necessário à liberação de uma nova cultivar (Bueno et al., 2006).

A organogênese é o processo de neoformação de parte aérea ou raiz a partir de calo ou de outros explantes (Torres et al., 2000). De acordo com Peres (2002), a organogênese *in vitro* pode ser dividida em dois processos distintos, a organogênese direta quando o explante já possui células meristemáticas, e a organogênese indireta quando há a necessidade de desdiferenciação do explante, com a consequente formação de calo antes do estabelecimento das células competentes.

Das técnicas da propagação *in vitro*, a cultura de ápices caulinares pode ser usada na produção de plantas, limpeza clonal, conservação e intercâmbio de germoplasma e transformação (Torres et al., 1998).

O grande obstáculo desse método biotecnológico é o ajuste de um protocolo com um meio de cultivo que supra as necessidades da planta tornando-a propícia à multiplicação em larga escala. Cada espécie de planta requer um meio de cultura específico para ter um desenvolvimento considerado normal, por isso, torna-se fundamental o estudo da composição em sais minerais, suplementos orgânicos e o balanceamento e tipo de reguladores vegetais para a indução da diferenciação da parte aérea ou raiz das plantas (Santos et al., 2005).

O meio MS (Murashige & Skoog, 1962) formulado para o cultivo *in vitro* de células de tabaco (*Nicotiana* sp), apresentou-se eficiente para a maioria das espécies vegetais herbáceas; no entanto, as espécies mais lenhosas frequentemente não são responsivas à composição original. No cultivo dessas espécies, modificações como a redução do teor de macronutrientes, apresentam melhor desempenho. Outra possibilidade é a substituição do meio MS basal pelo meio WPM (Lloyd & McCown, 1980), de

composição mais diluída em nutrientes e originalmente formulado para espécies lenhosas (Melo et al., 1999). De acordo com Pasqual (2001) citado por Soares et al. (2009), o meio WPM possui 25% das concentrações de íons nitrato e amônia quando comparado ao meio MS, no entanto, apresenta mais potássio e um elevado nível de íons sulfato.

Objetivou-se, neste trabalho avaliar o efeito de diferentes meios de cultura na diferenciação *in vitro* de ápices caulinares em partes aéreas de plantas de mamoneira, pertencentes à população FCA-UNESP-PB (porte baixo), livres de contaminações e de oxidação fenólica.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Ambiental, do Departamento de Recursos Naturais, da Faculdade de Ciências Agrônomicas – UNESP, Botucatu/SP.

Os meios nutritivos testados foram: MS basal (T1); MS modificado 1 (T2); MS modificado 2 (T3) e WPM (T4), cujas formulações e suplementações são apresentadas na Tabela 1. O pH dos meios foi aferido em 5,8 antes da adição do ágar. Os meios foram distribuídos em alíquotas de 5 ml por tubo de ensaio e esterilizados a 121° C, sob pressão de 1 atm, durante 20 minutos.

Ápices caulinares de mamoneira foram excisados de plantas matrizes de seis meses de idade, da população FCA-UNESP-PB, provenientes de um programa de melhoramento genético da FCA-UNESP. Os explantes foram lavados em água corrente por 12 horas e imersos por 12 horas sob agitação constante, em solução contendo o fungicida benomil a 0,5 g L⁻¹ e o antibiótico cloranfenicol na mesma concentração.

Procedeu-se à desinfestação superficial dos explantes com etanol 70% por 1 minuto, seguido de solução de hipoclorito de sódio a 2% de cloro ativo e Tween 20® (1 gota 100 ml⁻¹ de hipoclorito de sódio) por 20 minutos, e 5 lavagens com água deionizada estéril. Em câmara de fluxo laminar, os ápices caulinares foram transferidos para os diferentes tratamentos.

Após a inoculação dos explantes, os frascos foram incubados em câmara de germinação (B.O.D.) em condições de escuro e temperatura de 26° C ± 2° C; após 7 dias foram submetidos a fotoperíodo de 16h de luz/8h de escuro e intensidade luminosa de 1000 lux.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 4 tratamentos e 20 repetições em cada tratamento sendo a repetição constituída por 1 ápice caulinar/frasco. Os experimentos foram avaliados 30 dias após a inoculação. A variável observada foi a ocorrência, ou não, da diferenciação dos ápices caulinares por meio do alongamento do sistema caulinar e desenvolvimento foliar.

Para a análise estatística dos resultados, os dados coletados em porcentagem foram transformados para arco seno ($\sqrt{x+0,5}/100$), visando à análise da variância. Compararam-se as médias dos tratamentos pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise estatística dos dados revelou diferenças significativas entre os tratamentos para a variável diferenciação em partes aéreas dos ápices caulinares, com o meio MS modificado 2 (T3) apresentando o maior número de ápices caulinares diferenciados em partes aéreas. Os

demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre si.

Os resultados das avaliações obtidos 30 dias após a inoculação podem ser observados na Figura 1, que relaciona a frequência de diferenciação dos ápices caulinares em parte aérea de mamoneira, cultivados em diferentes meios de cultura. Observa-se que no T3, 35% das 20 repetições testadas apresentaram diferenciação em estruturas caulinar e foliar.

Como já descrito, os meios MS básico (T1) e WPM (T4) não induziram a diferenciação dos ápices caulinares. Resultados discordantes foram obtidos por Melo et al.

Tabela 1 – Composição dos meios MS básico, MS modificado 1, MS modificado 2 e WPM.

Componentes	MS	MS	MS	WPM
	Básico mg L ⁻¹ + suplementações	Modificado 1 mg L ⁻¹ + suplementações	Modificado 2 mg L ⁻¹ + suplementações	Básico mg L ⁻¹ + suplementações
NH ₄ NO ₃	1650	1650	825	400
KNO ₃	1900	1900	950	-
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	6,2	6,2
KH ₂ PO ₄	170	170	170	170
K ₂ SO ₄	-	-	-	990
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-	-	-	556
KI	0,83	0,83	0,83	-
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,025	0,025	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	440	440	96
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	370	370	370
MnSO ₄ ·H ₂ O	-	-	-	22,3
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	22,3	22,3	-
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	8,6	8,6	8,6
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,25
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37,3	37,3	37,3	37,3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	27,8	-	27,8
Tiamina HCl	0,1	0,1	0,1	1,0
Ác. nicotínico	0,5	0,5	0,5	0,5
Piridoxina HCl	0,5	0,5	0,5	0,5
Glicina	2,0	2,0	2,0	2,0
Inositol	100,0	100,0	100,0	100,0
Sacarose	30000	30000	15000	30000
PVP	250	250	250	250
Carvão Ativado	-	1000	1000	1000
Benomil	-	1000	1000	1000
Ágar	7000	7000	3500	7000

(1999), que testaram outra forma de explante, os segmentos nodais de aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.), em diferentes composições de meio (MS, DKW e WPM) e chegaram à conclusão de que o meio WPM favoreceu, além da diferenciação dos explantes, a indução da multiplicação de brotações. Também Ribeiro et al. (2002) trabalhando com café (*Coffea arabica* L.), ao inocularem segmentos nodais de 2 cm de comprimento em diferentes meios de cultura (MS basal, Knudson, WPM e White), obtiveram melhores resultados com os meios WPM e MS basal.

Resultados semelhantes aos aqui encontrados foram obtidos por Machado et al. (2007) ao avaliarem o efeito dos meios de cultura MS/2, NN, WPM, QL e C₂D no cultivo de segmentos nodais do porta-enxerto de videira "VR043-043". Também Gray & Benton (1990) testaram o meio WPM no desenvolvimento de meristemas apicais de uva (*Vitis rotundifolia* Michx.) e obtiveram resultados negativos. Ainda, no trabalho de Oliveira et al. (2000), foi testada, em meio MS, a diferenciação de meristemas apicais de diferentes variedades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) medindo entre 0,4 a 0,6 mm; como resultados foram alcançados níveis satisfatórios no estabelecimento e multiplicação dos explantes. Empregando o meio MS e o WPM no cultivo *in vitro* de amoreira-preta "Xavante" e framboeseira "Batum" e "Heritage", Leitzke et al. (2010), encontraram os melhores resultados utilizando o meio MS para ambas as espécies.

As modificações que revelaram o tratamento mais eficiente deste trabalho são compatíveis com as descritas por Teixeira (2001), que relatou, para o controle da oxidação

fenólica e diferenciação de tecidos, a eficácia da redução em 50% da concentração original dos macronutrientes NH₄NO₃ e KNO₃, da sacarose e do ágar do meio MS. Ademais, a ausência do FeSO₄.7H₂O no meio de cultivo pode ter contribuído para o melhor resultado, pois o mesmo está relacionado com a oxidação dos tecidos; observação também encontrada por Barghchi & Alderson (1983), na propagação *in vitro* de *Pistacia* spp.

Mesmo com todos os procedimentos preventivos empregados neste trabalho, a oxidação fenólica apresentou-se renitente em todos os tratamentos, além de significativa contaminação microbiana. Essas limitações, comuns na cultura de tecidos de plantas da família Euphorbiaceae, são previsíveis e permanecem de difícil controle. De acordo com Reddy & Bir Bahadur (1989) e Molina & Schobert (1995), as tentativas de modificar ou aperfeiçoar características em *Ricinus* usando técnicas de cultura de tecidos são raras devido ao fato de essa ser uma espécie recalcitrante, apresentando assim grande dificuldade na regeneração *in vitro*. A contaminação é mais frequente em explantes advindos de plantas cultivadas em campo, como no presente trabalho, e esse também é considerado um grande obstáculo para o estabelecimento de muitas espécies *in vitro*. De acordo com observações de Litz & Conover (1978), quando os explantes são retirados de plantas cultivadas em campo e introduzidos *in vitro*, a taxa de contaminação microbiana pode chegar a 95%, mesmo após a descontaminação.

Com base nos resultados aqui divulgados, observa-se que são necessários mais estudos e pesquisas

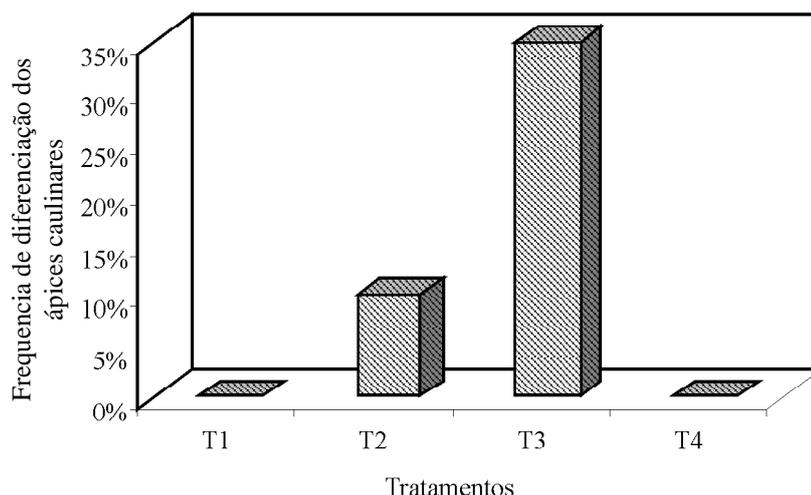


Figura 1 – Diferenciação de ápices caulinares de mamoneira em parte aérea pela organogênese direta, em diferentes composições de meios de cultura (MS básico (T1), MS modificado 1 (T2), MS modificado 2 (T3), WPM (T4)).

na área de cultivo de ápices caulinares de mamoneira, tanto em relação ao desenvolvimento da parte aérea, que foi visto neste trabalho, quanto à indução de sistema radicular, além da multiplicação de brotações.

CONCLUSÕES

A redução de NH_4NO_3 e KNO_3 , sacarose e ágar em 50% da concentração do meio MS basal, ausência de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, suplementação com os agentes antioxidantes polivinilpirrolidona (PVP) e carvão ativado e, ainda, adição do fungicida benomil ao meio de cultivo foi o mais eficiente para o estabelecimento e a indução da diferenciação e desenvolvimento de ápices caulinares de mamoneira, em partes aéreas, por meio da organogênese direta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHTAR, M.; MAHMOOD, I. Control of plant-parasitic nematodes with organic and inorganic amendments in agricultural soil. **Applied Soil Ecology**, Aligarh, v.4, n.3, p.243-247, Nov. 1996.
- ANGELY, J. **Flora analítica e fitográfica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Ayrton, 1970. 330p.
- AZZINI, A.; SAVY FILHO, A.; SALGADO, A.L. de B.; ARNALDI, F.Z. Deslignificação dos resíduos agrícolas da cultura da mamona para produção de celulose e papel. **Bragantia**, Campinas, v.43, n.2, p.519-530, 1984.
- BARGHCHI, M.; ALDERSON, P.G. *In vitro* propagation of *Pistacia* species. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v.131, p.49-60, 1983.
- BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa, MG: UFV, 1986. 3p.
- BUENO, L.C. de S.; MENDES, A.N.G.; CARVALHO, S.P. **Melhoramento genético de plantas: princípios e procedimentos**. 2.ed. Lavras: UFLA, 2006. 319p.
- CARLINI, C.R.; SÁ, M.F.G. Plant toxic proteins with insecticidal properties: a review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v.40, p.1515-1539, 2002.
- GRAY, D.J.; BENTON, C.M. Micropropagation and plant establishment of *Muscadine grape*. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, Hruiter Haven, v.103, p.300-302, 1990.
- JOLY, A.B. **Botânica econômica: as principais culturas brasileiras**. Brasília: Hucitec, 1979. 66p.
- LEITZKE, L.N.; DAMIANI, C.R.; SCHUCH, M.W. Influência do meio de cultura, tipo e concentração de citocininas na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.34, n.2, p.352-360, mar./abr. 2010.
- LITZ, R.E.; CONOVER, R. *In vitro* propagation of papaya. **HortScience**, Alexandria, v.13, p.241-242, 1978.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings of International Plant Propagators' Society**, Seattle, v.30, p.421-427, 1980.
- MACHADO, M.P.; BIASI, L.A.; RITTER, M.; RIBAS, L.L.F.; KOEHLER, H.S.; ZANETTE, F. Meios de cultura na micropropagação do porta-enxerto de videira "VR043-43" (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.1, p.277-280, jan./fev. 2007.
- MELO, N.F. de; OKASAKI, W.Y.; LEITA, C.B.; FÁRI, M. Estabelecimento do cultivo *in vitro* da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.1, p.102-107, jan./mar. 1999.
- MOLINA, S.M.; SCHOBERT, C. Micropropagation of *Ricinus communis*. **Journal of Plant Physiology**, Washington, v.147, p.270-272, June 1995.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised method for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- OLIVEIRA, R.P. de; GOMES, T. da S.; VILARINHOS, A.D. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.12, p.2329-2334, dez. 2000.
- PERES, E.P.L. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n.25, p.44-48, 2002.
- REDDY, K.R.K.; BIR BAHADUR. Adventitious bud formation from leaf cultures of castor (*Ricinus communis* L.). **Current Science**, Chicago, v.58, n.3, p.152-154, 1989.

RIBEIRO, L. de S.; PASQUAL, M.; MACIEL, A.L. de R.; CHAGAS, E.A.; DUTRA, L.F. Multiplicação *in vitro* de brotações de várias cultivares de *Coffea arabica* L. em diferentes meios de cultura. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.5, p.949-954, set./out. 2002.

SANTOS, A.S.A.; MACHADO, I.S.; LEÃO, A.L.; RAMOS, A.A. Concentrações de BAP e TDZ na propagação *in vitro* de curauá (*Ananas erectifolius* L.B. Smith): a influência das citocininas sintéticas na cultura de tecido. **Revista de Biotecnologia – Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.8, n.35, jul./dez. 2005.

SOARES, F.P.; PAIVA, R.; STEIN, V.C.; NERY, F.C.; NOGUEIRA, R.C.; OLIVEIRA, L.M. de. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA₃ e pH sobre a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa*

Gomes.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.33, Edição Especial, p.1847-1852, 2009.

TEIXEIRA, J.B. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas**. Brasília: Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001.

TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G. de; BUSO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BRÍGIDO, M. de M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128p.

TORRES, A.C.; TEIXEIRA, S.L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v.2.