

MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DA AMOREIRA-PRETA EM DIFERENTES MEIOS¹

Fabíola Villa²
Chrystiane Borges Fráguas³
Leila Aparecida Salles Pio²
Moacir Pasqual⁴

RESUMO

Com o objetivo de propagar os cultivares Tupy e Ébano da amoreira-preta (*Rubus* sp.), segmentos nodais de plantas pré-estabelecidas *in vitro* foram inoculados em meio MS (0, 50, 100, 150 e 200%), suplementado com diferentes concentrações de sacarose (0, 15, 30, 45 e 60 g L⁻¹). O pH foi ajustado para 5,8 antes da adição de 6 g L⁻¹ de ágar e da autoclavagem a 121°C e 1 atm por 20 minutos. Após a inoculação, os explantes foram mantidos por 45 dias, em sala de crescimento a 27 ± 1°C, 32 µmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas. O experimento foi inteiramente casualizado, utilizando-se quatro explantes por repetição. Melhores resultados foram obtidos com o cultivar Tupy, no qual o maior número (6,53), comprimento de brotos (2,32 cm) e peso da matéria fresca foram obtidos em meio MS 150%, acrescido de 45-60 g L⁻¹ de sacarose. Não houve multiplicação de brotos no cultivar Ébano.

Palavras-chave: *Rubus* sp., sacarose, meio de cultura MS.

ABSTRACT

IN VITRO MULTIPLICATION OF BLACKBERRY UNDER DIFFERENTS CULTURE MEDIA

To propagate blackberry (*Rubus* sp.), cvs. Tupy and Ébano, nodal segments from plants established *in vitro* were inoculated in MS culture medium (0, 50, 100, 150 and 200%), supplemented with different sucrose concentrations (0, 15, 30, 45 and 60 g L⁻¹). pH

¹Aceito para publicação em 15.04.2004.

² Dep. de Agricultura, UFLA, 37200-000, Lavras, MG. E-mail: fvilla2003@libero.it

³ FCAV-UNESP, 18603-970, Botucatu, SP. E-mail: chrysbf@uol.com.br

⁴Departamento de Agricultura, UFLA, Cx. P. 37, 37200-000, Lavras, MG. E-mail: mpasqual@ufla.br

was adjusted to 5.8 before adding 6 g L⁻¹ agar and sterilization at 121°C, 1 atm for 20 minutes. After the inoculation, the explants were maintained for 60 days, in the growth room, at 27±1°C, 32 µmol m⁻² s⁻¹ and photoperiod of 16 hours. The experiment was arranged in a completely randomized design, using four explants per replication. Better results were obtained with cv. Tupy, with the highest number (6.53), sprout length (2.32 cm) and fresh matter weight being obtained in a 150% MS culture medium, added of 45-60 g L⁻¹ sucrose. Sprout multiplication was not achieved for cv. Ébano.

Key words: *Rubus* sp., sucrose, MS culture medium.

INTRODUÇÃO

No Brasil, a amoreira-preta vem sendo cultivada por pequenos produtores do Rio Grande do Sul (principal produtor brasileiro), Santa Catarina e Paraná, objetivando a exportação dos frutos. No primeiro, as maiores produções encontram-se nos municípios de Feliz e Vacaria, onde o cultivar Tupy responde por 70% da área cultivada, com produção a partir da terceira dezena de novembro (1). O sul de Minas Gerais tem apresentado elevado potencial para esta pequena fruta, destacando-se o município de Caldas.

O cultivar Ébano foi selecionada em 1977, na antiga UEPAE de Cascata, e lançado em 1981 pela Embrapa/CPACT-Pelotas, RS, sendo livre de espinhos (3, 14). O cultivar Tupy foi originado do cruzamento realizado no CPACT em 1982 e lançado em 1988. É recomendado para o consumo *in natura*, por apresentar baixa acidez (16).

A propagação desta espécie é feita por meio de estacas de raízes (4) que, por ocasião do repouso vegetativo, são preparadas e enviveiradas em sacolas plásticas. Podem também ser usados brotos (rebentos), originados de plantas cultivadas, e estacas herbáceas (15). Além destes, a micropropagação, com o intuito de se obterem plantas livres de vírus, geneticamente uniformes e em curto espaço de tempo, é outra alternativa viável e pode ser feita a partir de brotos apicais ou segmentos foliares em meio de cultura MS, suplementado com reguladores de crescimento (18).

Vários autores têm relatado a possibilidade de reduzir a concentração de sais do meio MS para diversas espécies, visando melhor desenvolvimento das plantas e redução nos custos (8). Paiva et al. (12) utilizaram 50% dos sais do meio MS, obtendo bom desenvolvimento *in vitro* de gloxínia.

A concentração de sacarose também é um fator determinante na promoção de crescimento e é dependente do tipo de explante (5). Estudos comprovaram que 75 a 85% do aumento da biomassa se devem à incorporação de carbono pela adição de sacarose (7). A concentração mais utilizada no preparo do meio de cultura MS é de 30 g L⁻¹; entretanto, modificações neste valor podem otimizar o crescimento *in vitro*.

Rápida proliferação de gemas axilares de amoreira-preta, cultivares Thornless Boysenberry e Thornless Youngberry, foi obtida em meio MS, acrescido de BAP (2,0 mg L⁻¹) e ANA (0,1 mg L⁻¹) (18). O enraizamento desses brotos deu-se em meio MS (1/16 da concentração), independentemente da adição de reguladores de crescimento. No entanto, concentrações de sais no

meio básico MS (10), reduzidas a 1/2, 1/3 ou 1/4, possibilitaram melhor enraizamento *in vitro* de amoreira-preta, cultivar Caiguangue (6).

A concentração de sacarose também é um fator determinante no crescimento e é dependente do tipo de explante (5). Estudos comprovaram que 75 a 85% do aumento da biomassa se devem à incorporação de carbono pela adição de sacarose (7). A concentração mais utilizada no preparo do meio de cultura MS é de 30 g L⁻¹; entretanto, modificações nesse número podem beneficiar o cultivo *in vitro*. Por outro lado, o excesso de sacarose pode ser prejudicial, pois inibe a síntese de clorofila e, portanto, reduz a capacidade fotossintética das culturas, mesmo sendo essencial ao crescimento (20). Embora o açúcar não seja o componente de maior custo no preparo do meio de cultura, a redução da sua concentração pode ser economicamente favorável, especialmente para a produção comercial de mudas (9).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da sacarose e diferentes concentrações de sais nutrientes do meio MS na micropropagação dos cultivares Tupy e Ébano de amoreira-preta.

MATERIAL E MÉTODOS

Segmentos nodais dos cultivares Tupy e Ébano de amoreira-preta, com cerca de 2 cm, foram excisados de plantas pré-estabelecidas *in vitro*, oriundas da Embrapa Clima Temperado/CPACT-Pelotas, RS. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio, contendo 15 mL de meio constituído dos sais minerais do meio MS (0, 50, 100, 150 e 200%), combinados com cinco concentrações de sacarose (0, 15, 30, 45 e 60 g L⁻¹). O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, e o meio de cultura solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar da marca Merck®. Posteriormente foram transferidos para sala de crescimento a 27 ± 1°C, irradiância de 32 µmol m⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas de 20 W, marca Osram®, luz do dia especial, e fotoperíodo de 16 horas, permanecendo nestas condições por 45 dias.

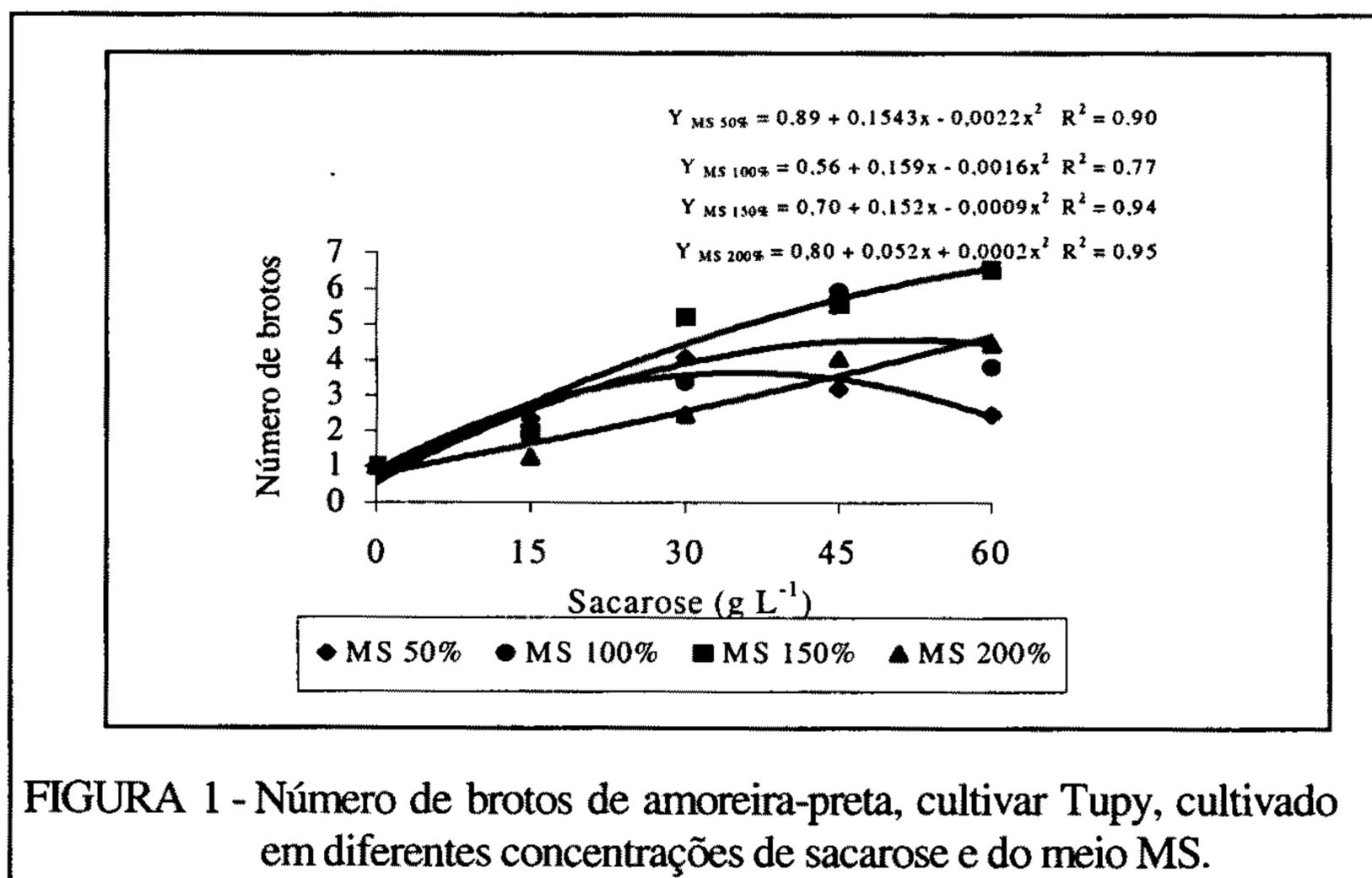
O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições constituídas de quatro explantes. As variáveis analisadas foram o comprimento dos brotos e os pesos das matérias fresca e seca da parte aérea.

Na análise estatística do experimento foi utilizada a análise de regressão para os dados quantitativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de brotos do cultivar Tupy foi estimulado pelo aumento da concentração de sacarose (Figura 1). No meio MS 150%, maior número de brotos (6,53) foi obtido com 60 g L⁻¹ de sacarose, enquanto no meio MS 50% houve tendência de redução no número de brotos em relação ao

aumento da concentração de sacarose. Nos meios MS 100 e 200% observou-se também aumento no número de brotos. Não houve efeito significativo de número de brotos na ausência de sacarose.



No cultivar Ébano não foi observada a multiplicação de brotos. Este resultado discorda do observado por Souza (19), que verificou na ausência de sacarose produção média de 2,9 brotos e, com 35,3 g L⁻¹ de sacarose, produção de 18,2 brotos. Esta resposta sugere que o explante não se utilizou de suas reservas de nutrientes para induzir novas brotações.

Babic e Neskovic (2) registraram maior produção de brotos de Smoothstem e Thornless em meio MS com 30 g L⁻¹ de sacarose.

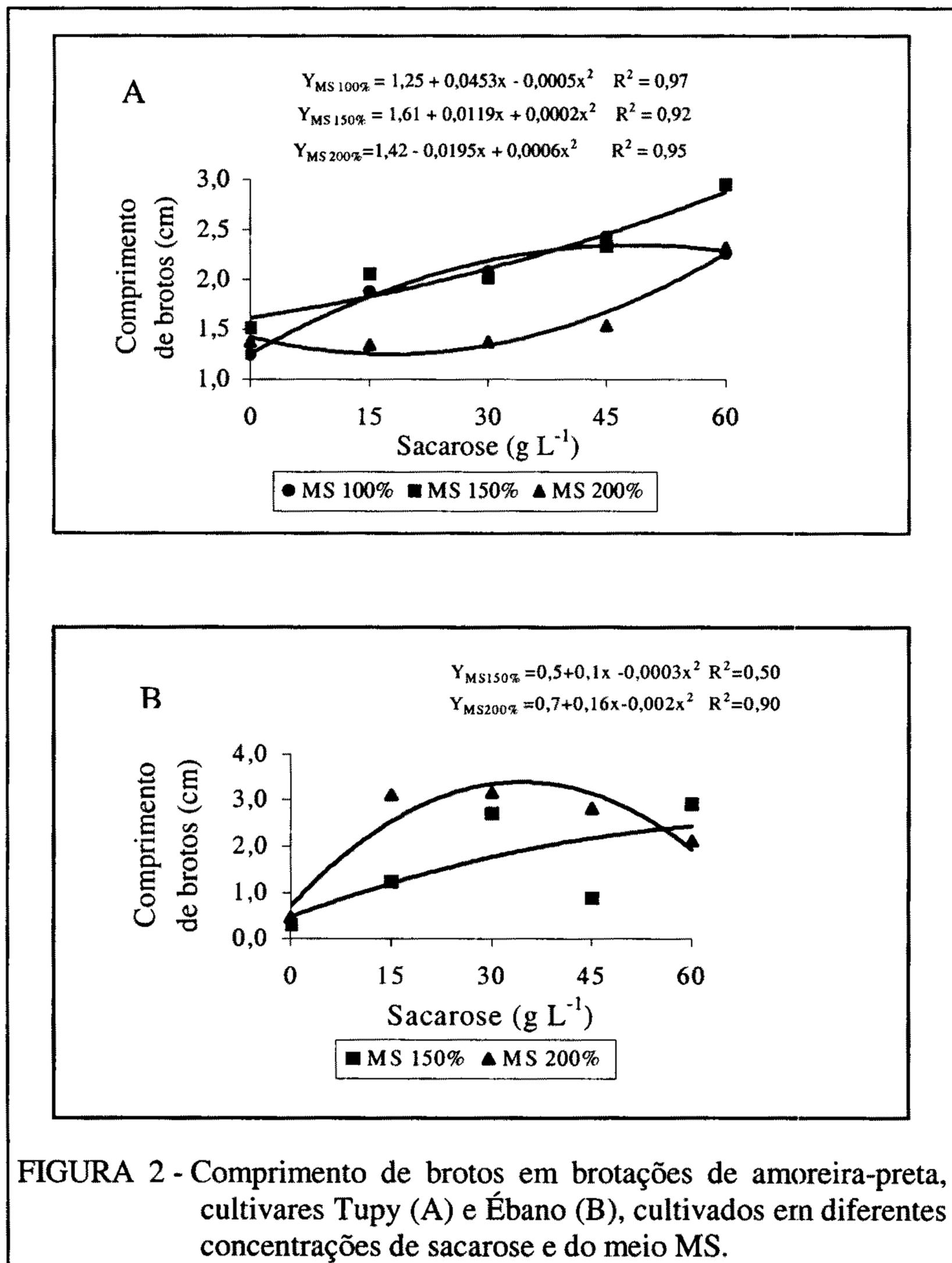
De acordo com Rezende (15), o número máximo de brotações de kiwi, cultivar Hayward, pode ser obtido em meio contendo 117,31% da concentração básica dos componentes do meio MS, sendo este adicionado de 36,10 g L⁻¹ de sacarose.

Maior comprimento de brotos no cultivar Tupy (2,95 cm) foi observado com 60 g L⁻¹ de sacarose em meio 150% (Figura 2A), enquanto no cultivar Ébano (4,07 cm), com 15 g L⁻¹ de sacarose em meio 50%, houve maior comprimento dos mesmos (Figura 2B). As menores alturas da parte aérea foram observadas na ausência de sacarose, em que o desenvolvimento da parte aérea possivelmente ocorreu devido ao gasto energético das reservas dos próprios explantes.

O aumento da concentração de sacarose incrementou o comprimento de brotos nos meios MS 50 e 150% nos cultivares Tupy e Ébano, respectivamente (Figuras 2A e 2B). Quando se elevou a concentração de sacarose, o desenvolvimento da parte aérea aumentou mesmo nas maiores concentrações do

meio MS. É possível que o aumento do potencial osmótico e a conseqüente redução na absorção de nutrientes pelos explantes tenha evitado um efeito deletério causado pela alta concentração do meio MS.

Rezende (15) constatou que em kiwi, cultivar Hayward, as brotações maiores foram obtidas na associação de 200% de meio MS com 36,30 g L⁻¹ de sacarose, e, no cultivar Matua, com a adição de 35,20 g L⁻¹ de sacarose ao meio contendo 163,51% da concentração de nutrientes.

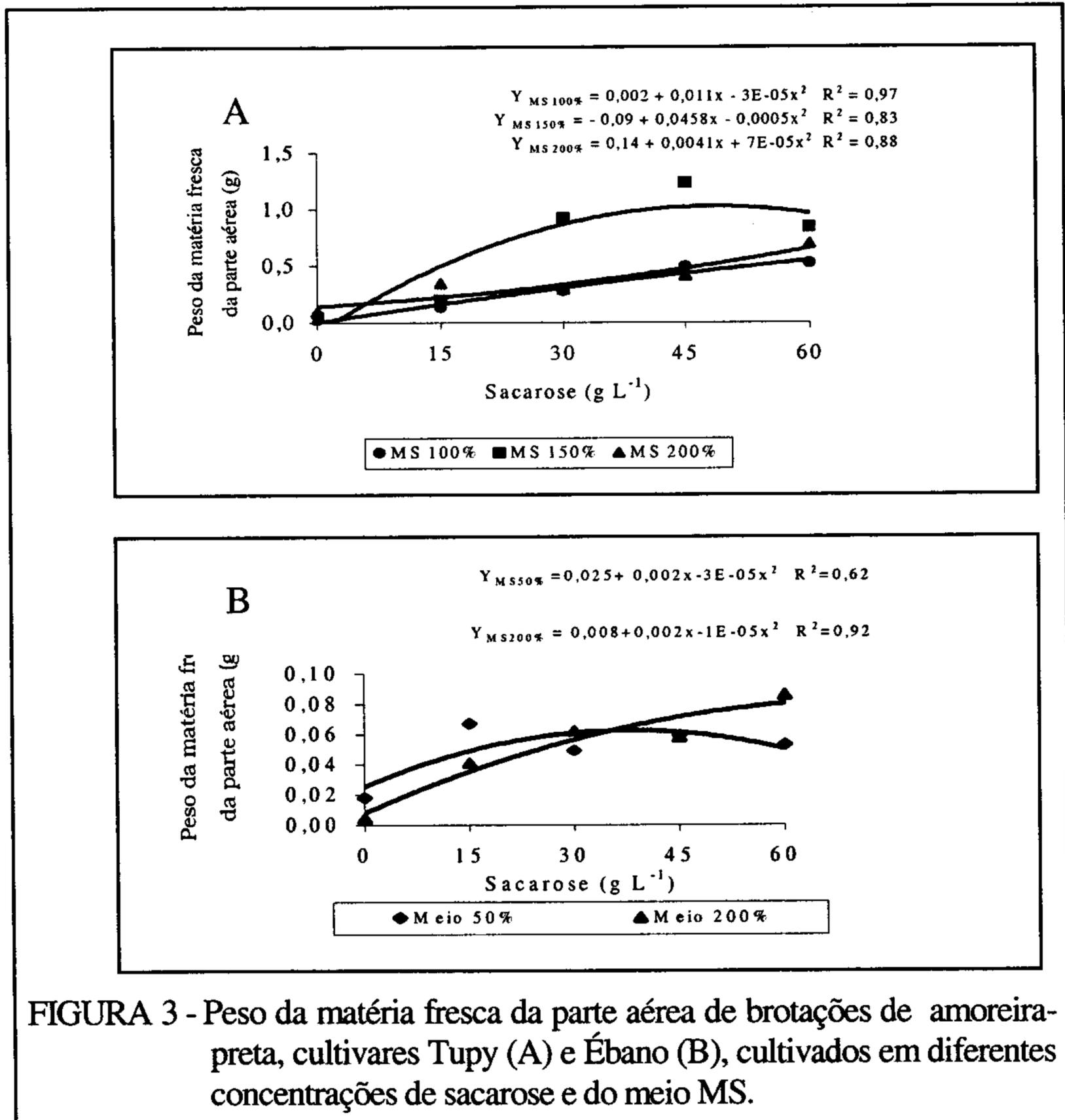


O maior peso da matéria fresca do cultivar Tupy (1,23 g) deu-se em meio MS 150%, suplementado com 45 g L⁻¹ de sacarose (Figura 3A), enquanto no cultivar Ébano o melhor meio foi o MS 200%, com 60 g L⁻¹ de sacarose (Figura 3B).

A utilização do meio de cultura MS proporcionou maior peso da matéria fresca dos dois cultivares estudados, com o aumento de sacarose até a concentração de 60 g L⁻¹ (Figuras 3A e 3B).

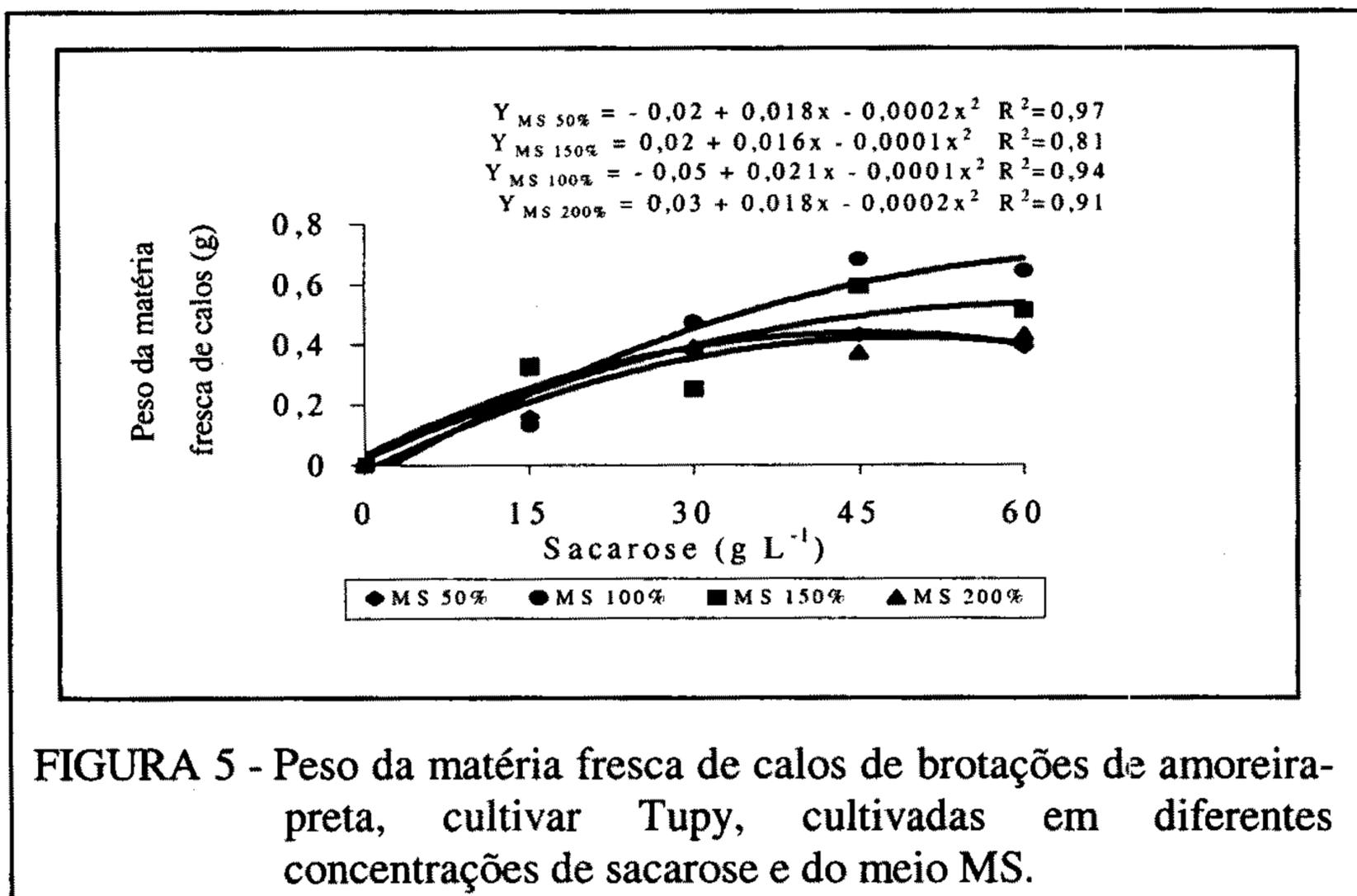
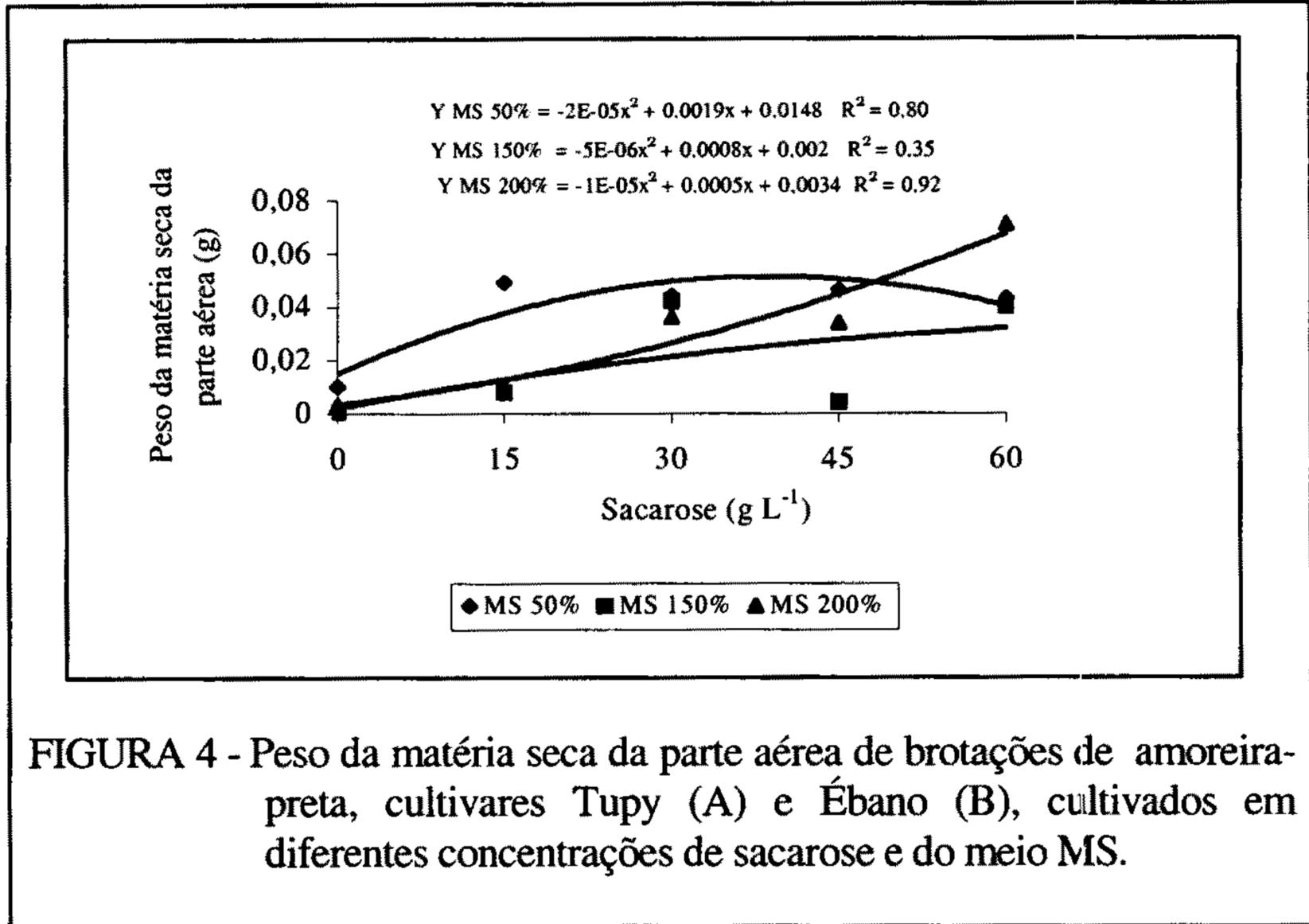
Embora a alta concentração de sacarose tenha elevado o potencial osmótico, a absorção de nutrientes pelos explantes não foi prejudicada.

A sacarose, em diferentes concentrações, influenciou de forma significativa o peso de matéria seca, e houve efeito significativo da concentração de MS (Figuras 4A e 4B). No cultivar Tupy o meio que se destacou foi o MS 150%, com maior peso de matéria seca com 45 g L⁻¹. Não foi obtido o mesmo resultado no cultivar Ébano em relação ao meio MS 150%, sendo o meio MS 50% de melhor destaque (Figura 4B).



No Tupy observaram-se calos, sendo o maior peso da matéria fresca (0,68 g) verificado com 45 g L⁻¹ de sacarose e meio MS 100% (Figura 5).

Os valores de todas as variáveis analisadas do cultivar Tupy foram incrementados à medida que se aumentou a concentração do meio de cultura MS até um ponto máximo, a partir do qual se verificou decréscimo.



É importante ressaltar que o meio MS possui alta concentração de sais em sua composição, quando comparado a outros meios de cultura (17). Dessa forma, os efeitos negativos causados por concentrações maiores do meio MS são devidos a uma elevação ainda maior do que a normalmente presente na composição original, tornando-se inadequada ao processo morfogênico (13).

A concentração adequada de sacarose situou-se entre 45 e 60 g L⁻¹. A sacarose, como fonte de carboidratos, visa suprir as necessidades metabólicas dos explantes, atuando como fonte de esqueletos carbônicos na diferenciação celular e no crescimento (11).

CONCLUSÃO

Para a propagação de amoreira-preta, melhores resultados são obtidos com o cultivar Tupy, em que o maior número, comprimento de brotos e peso da matéria fresca são obtidos em meio MS 150%, acrescidos de 45-60 g L⁻¹ de sacarose.

REFERÊNCIAS

1. ANTUNES, L.E.C. Aspectos fenológicos, propagação e conservação pós-colheita de frutas de amoreira-preta (*Rubus* spp.) no sul de Minas Gerais. Lavras, UFLA, 1999. 129p. (Tese de doutorado).
2. BABIC, V. & NESKOVIC, M. Propagation of three blackberry cultivars from small apical buds *in vitro*. *Journal of Horticultural Science*, 59:183-5, 1984.
3. BASSOLS, M.C. & MOORE, J.N. Ébano thornless blackberry. *HortScience*, 16:686-7, 1981.
4. CALDWELL, J.D. Blackberry propagation. *HortScience*, 19:193-5, 1984.
5. CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P. & FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: Torres, A.C. & Caldas, L.S. (eds.). Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília, ABCTP/EMBRAPA-CNPQ, 1990. p.37-70.
6. DANTAS, M.C.A.; CERETTA, M.; COUTINHO, F.E. & FORTES, G.R. de L. Enraizamento *in vitro* da amoreira-preta (*Rubus* sp.), cultivar Caigangue. *Agropecuária de Clima Temperado*, 3:123-30, 2000.
7. DE RIEK, J.; PIQUERAS, A. & DEBERGH, P.C. Sucrose uptake and metabolism in a double layer system for micropropagation of *Rosa multiflora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47:269-78, 1997.
8. GEORGE, E.F. & SHERRINGTON, P.D. Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories. Eversley, Exegetics Limited, 1984. 593p.
9. HOFFMANN, A. Enraizamento e aclimatização de mudas micropropagadas dos porta-enxertos de maceira 'Marubakaido' e 'M-26'. Lavras, UFLA, 1999. 240p. (Tese de doutorado).
10. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-97, 1962.
11. NAGAO, E.O. Efeitos da sacarose, nitrogênio inorgânico e ácido indolbutírico na propagação *in vitro* do porta-enxerto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. Lavras, UFLA, 1993. 56p. (Dissertação de mestrado).

12. PAIVA, P.D.O.; MAYER, M.B.D.; CAMPOS, R.J.C.; RODRIGUES, V.A. & PASQUAL, M. Propagação *in vitro* de gloxínia. Revista Brasileira de Horticultura Ornamental, 3(2):29-41, 1997.
13. PASQUAL, M.; ALVES, G.P.; DUTRA, L.F.; FINOTTI, D.R. & CHAGAS, E.A. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerina 'Poncã': concentrações do meio MS e da sacarose. Revista Ceres, 49:181-9, 2002.
14. RASEIRA, M. do C.B.; SANTOS, A.M. dos & MADAIL, J.C.M. Amora-preta: cultivo e utilização. Pelotas, EMBRAPA/CNPFT, 1984. 20p. (Circular Técnica, 11).
15. REZENDE, M.E. de. Multiplicação *in vitro* de kiwi [*Actinidia deliciosa* (A. Chevalier) Liang e Ferguson var. *deliciosa*] cvs. 'Hayward' e 'Matua': influência de concentrações do meio MS e sacarose e de níveis de ágar e pH. Lavras, UFLA, 1996. 71p. (Dissertação de mestrado).
16. SANTOS, A.M. dos & RASEIRA, M. do C.B. Lançamento de cultivares de amoreira-preta. Pelotas, EMBRAPA/CNPFT, 1988. n.p. (Informativo 23).
17. SAKUTA, M. Effects of nitrogen source on betacyanin accumulation and growth in suspension culture of *Phytolacca americana*. Physiologia Plantarum, 71:459-63, 1987.
18. SKIRVIN, R.M.; CHU, M.C. & GOMEZ, E. *In vitro* propagation of thornless trailing blackberries. HortScience, 16:310-2, 1981.
19. SOUZA, A.S. de. Efeitos da sacarose e do fotoperíodo na propagação *in vitro* da cv. Ébano de amora-preta e dos porta-enxertos de macieira "MM.111" e pereira *Pyrus calleryana* Deene. Lavras, UFLA, 1995. 36p. (Dissertação de mestrado).
20. YAMADA, Y. & SATO, F. The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. Plant Cell Physiology, 19:691-9, 1978.