

EFEITO DO CLORETO DE POTÁSSIO E FOSFATO DE SÓDIO NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE AMOREIRA-PRETA CV. CHEROKEE

Fábola Villa¹
Moacir Pasqual²
Leila Aparecida Salles Pio¹
Grazielle Sales Teodoro³
Luzia Yuriko Miyata⁴

RESUMO

A micropropagação da amoreira-preta pode gerar plantas livres de vírus e em curto espaço de tempo. Com o objetivo de aprimorar técnicas de micropropagação de amoreira-preta cv. Cherokee (*Rubus* spp.), segmentos nodais com cerca de 2 cm e 2 gemas axilares, oriundos de plantas pré-estabelecidas *in vitro*, foram excisados e inoculados em meio MS, suplementado com diferentes concentrações de fosfato de sódio (0, 125, 250, 500 e 1000 mg L⁻¹) e de cloreto de potássio (0, 125, 250, 500 e 1000 mg 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 transferidos para a sala de crescimento a 27 ± 1°C, com irradiância de 35 mmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas, onde permaneceram por 60 dias. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições e quatro tubos contendo um explante cada. O número de brotos e o comprimento da parte aérea das plantas foram menores em função de maiores concentrações de cloreto de potássio. Melhores resultados foram obtidos na ausência de KCl e na presença de fosfato de sódio, principalmente para comprimento e peso da matéria fresca da parte aérea.

Palavras-chave: *Rubus* spp., micropropagação, cloreto de potássio, fosfato de sódio.

ABSTRACT

EFFECT OF POTASSIUM CHLORIDE AND SODIUM PHOSPHATE IN THE *IN VITRO* MULTIPLICATION OF BLACKBERRY CV. CHEROKEE

The micropropagation of blackberry (*Rubus* spp.) can generate virus-free plants in a short time. With the objective of refining micropropagation techniques of blackberry cv. Cherokee, nodal segments with 2 cm length and 2 axillary buds, originating from plants generated *in vitro*, were excised and inoculated in MS medium, supplemented with different concentrations of sodium phosphate (0, 125, 250, 500 and 1000 mg L⁻¹) and potassium chloride (0, 125, 250, 500 and 1000 mg L⁻¹). The pH was adjusted for 5.8 before the addition of 6 g L⁻¹ agar and sterilization at 121°C and 1 atm for 20 minutes. After inoculation, the explants were transferred to a growth room at 27 ± 1°C, 35 mmol m⁻² s⁻¹ irradiance and photoperiod of 16 hours, where they stayed for 60 days. The experiment was arranged in a completely randomized design, with four repetitions of 12 plants each. The number of sprouts and the length of the aerial part of plants decreased as a function of larger concentrations of potassium chloride. Better results were obtained in the absence of potassium chloride and in the presence of sodium phosphate, specially for length and fresh weight of the aerial part.

Key-words: *Rubus* spp., micropropagation, potassium chloride, sodium phosphate.

¹ Eng.^a Agr.^a Doutoranda em Fitotecnia/ UFLA, Lavras, MG, e-mail: fvilla2003@libero.it

² Eng.^a Agr.^a, Dr., Prof. Dep. de Agricultura/ UFLA. C.P. 37 - 37200-000, Lavras, MG

³ Aluna de graduação em Ciências Biológicas/ UFLA

⁴ Aluna de graduação em Agronomia/ UFLA, Lavras

INTRODUÇÃO

Apesar de ser uma ótima alternativa para pequenos produtores, como uma fonte de renda, no Brasil o cultivo da amoreira-preta não está tão difundido como na Europa, sendo a qualidade das mudas um fator limitante (Antunes, 1999). Desde os anos 80, no País há a possibilidade de micropropagação de muitas culturas, inclusive framboesa e amora preta (Donnelly & Danberry, 1986; Finne, 1986). Entretanto, a elevada variabilidade de comportamento das espécies *in vitro* requer a adequação de condições de cultivo para cada uma, pois nem todas as espécies de *Rubus* demonstram grande coeficiente de propagação nessa condição. (Jennings & McNicol, 1991; Leontiev-Orlov, 1989).

O meio de cultura deve suprir tecidos e órgãos cultivados *in vitro* com nutrientes necessários ao crescimento. Os macronutrientes são fornecidos ao meio de cultura na forma de sais: cálcio, magnésio e potássio e estes são absorvidos pelas células vegetais como cátions (Ca^{+2} , Mg^{+2} e K^{+}); nitrogênio na forma de amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-); fósforo como íons fosfato (HPO_4^-) e (H_2PO_4^-). Esses sais também podem ser associados a íons dos elementos sódio (Na^+) e cloro (Cl^-), bem tolerados pelas células vegetais em altas concentrações dos mesmos (Pasqual, 2001). O potássio entra como íon acompanhante do nitrato, fosfato ou, em alguns casos, do cloreto. O íon exerce suas funções metabólicas e bioquímicas na planta e nas células *in vitro*, como íon livre, sem incorporação em compostos orgânicos, tornando seu metabolismo muito simples (Caldas *et al.* 1998).

O fosfato de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) é um componente do meio White (1963) e de B5 (Gamborg *et al.* 1968), e o cloreto de potássio (KCl) é somente de meio White (1963). O meio MS possui baixas concentrações de sódio e cloro. Porém, estudos com a micropropagação de orquídeas demonstraram a necessidade de se adicionar, ao meio, concentração maior desses sais. Em estudos com orquídeas *Phalaenopsis nebula*, verificou-se regeneração de plantas por meio de cultura de calos, em meio MS, com a adição de 170 mg L^{-1} de fosfato de sódio (Chen *et al.* 2000).

Este trabalho teve como objetivo determinar as melhores concentrações de cloreto de potássio e fosfato de sódio na multiplicação *in vitro* de plantas de amoreira-preta.

MATERIAL E MÉTODOS

Segmentos nodais de amoreira-preta, cultivar Cherokee, com cerca de 2 cm de comprimento e 2 gemas axilares, foram excisados de plantas pré-estabelecidas *in vitro*, em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), sem reguladores de crescimento. Estes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio de cultura. Os tratamentos consistiram da amoreira-preta 'Cherokee' e de diferentes concentrações de fosfato de sódio (0; 250; 500; 750 e 1000 mg L^{-1}) e cloreto de potássio (0; 250; 500; 750 e 1000 mg L^{-1}). O meio foi acrescido de 30 g L^{-1} de sacarose, solidificado com 6 g L^{-1} de ágar (Merck) e o pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 121°C e 1 atm por 20 minutos. Posteriormente à inoculação, os explantes foram transferidos para a sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, irradiância de $35 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fornecida por tubos fluorescentes de 20W (Osram), luz do dia especial e fotoperíodo de 16 horas diárias, permanecendo nestas condições por 60 dias. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições e 12 plantas cada uma.

Foram avaliados os parâmetros número de folhas, número de brotos, comprimento, e peso da matéria fresca da parte aérea e peso da matéria fresca de calos. Os dados foram analisados através do software Sisvar (Ferreira, 2000), sendo utilizada a regressão polinomial para as concentrações dos sais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise de variância da variável número de folhas da amoreira-preta 'Cherokee', verifica-se que o maior número de folhas (7,1) foi obtido com 1000 mg L^{-1} de KCl e 125 mg L^{-1} de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Figura 1).

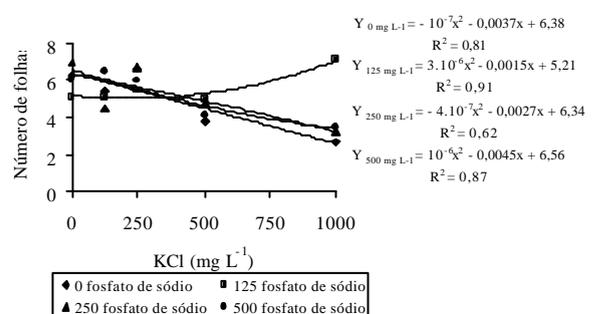


Figura 1. Número de folhas de plantas de amoreira-preta 'Cherokee' em diferentes concentrações de cloreto de potássio (KCl) e fosfato de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). UFLA, Lavras, MG.

Mesmo na ausência do cloreto de potássio, houve formação de folhas nas plantas deste cultivar, porém, com o aumento das dosagens deste sal, observou-se queda no número de folhas, talvez pelo fato de as altas dosagens serem tóxicas aos explantes estudados.

Maior número de folhas de crisântemo foi obtido com a adição de 1000 mg L⁻¹ de nitrato de cálcio ao meio MS na ausência de KCl (Junqueira *et al.*, 2003).

Amarelecimento das folhas e enfraquecimento das hastes também foram observados nos tratamentos que continham o cloreto de potássio, corroborando com Pasqual (2001), que afirma que concentrações muito elevadas de cloro em algumas espécies lenhosas podem favorecer o aparecimento desses sintomas.

Com as dosagens de 750 e 1.000 mg L⁻¹ de KCl, foi verificada hiperhidricidade nas folhas de 'Cherokee', causada pelo excesso de cloro (Pasqual, 2001).

Pode-se observar que houve multiplicação de brotos na ausência do KCl, porém foi menor em razão de

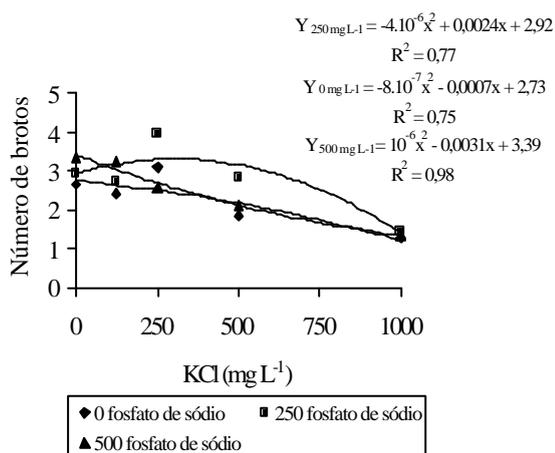


Figura 2 Número de brotos de plantas de amoreira-preta 'Cherokee' em diferentes concentrações de cloreto de potássio (KCl) e fosfato de sódio (NaH₂PO₄·H₂O). UFLA, Lavras, MG.

maior concentração de cloreto de potássio (Figura 2).

Nota-se que os melhores resultados foram obtidos na ausência do cloreto de potássio e na adição de fosfato de sódio ao meio MS, principalmente para comprimento e peso da matéria fresca da parte aérea (Figuras 3 e 5).

Altas concentrações de fosfato de sódio diminuíram o crescimento do explante, conforme já citado por Pasqual (2001), possivelmente porque o sódio e alguns microelementos são precipitados da solução ou

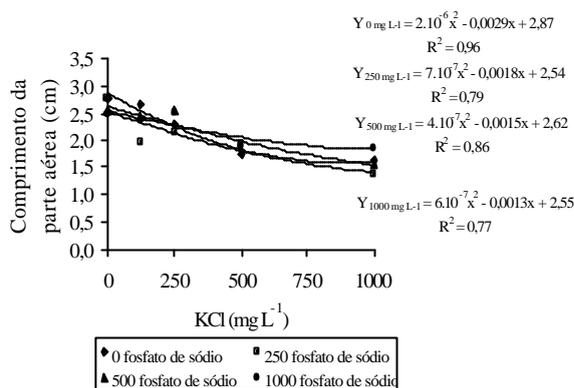


Figura 3. Comprimento da parte aérea de plantas de amoreira-preta 'Cherokee' em diferentes concentrações de cloreto de potássio (KCl) e fosfato de sódio (NaH₂PO₄·H₂O). UFLA, Lavras, MG.

sua absorção é reduzida. A taxa de incorporação de íons fosfato depende do genótipo, que é usualmente constante e proporcional à taxa de crescimento da cultura.

Maior peso da matéria fresca de calos (1,05 g) foi obtido na ausência dos dois sais no meio MS (Figura 4). Em estudos com orquídeas *Phalaenopsis nebula*, verificou-se regeneração de plantas através de cultura de calos, em meio MS, com a adição de 170 mg L⁻¹ de fosfato de sódio (Chen *et al.*, 2000).

Resultados muito próximos foram observados com relação ao peso da matéria fresca de plantas de amoreira-preta. Com o aumento das concentrações de cloreto de potássio, houve uma queda no peso da matéria fresca da parte aérea, e com 125 mg L⁻¹ de NaH₂PO₄·H₂O, as plantas

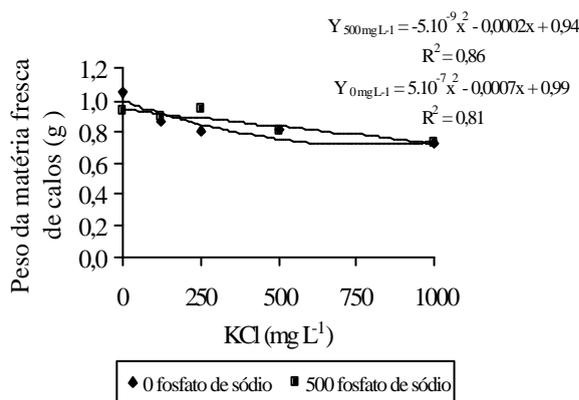


Figura 4. Peso da matéria fresca de calos de amoreira-preta 'Cherokee' em diferentes concentrações de cloreto de potássio (KCl) e fosfato de sódio (NaH₂PO₄·H₂O). UFLA, Lavras, MG.

tiveram respostas positivas para esta variável, verificando-se um crescimento no peso a partir de 500 mg L⁻¹ de KCl (Figura 5).

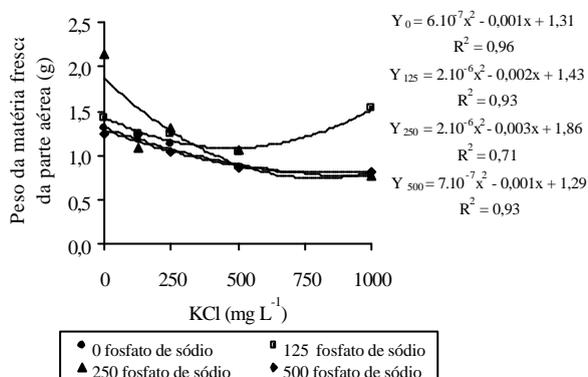


Figura 5. Peso da matéria fresca de plantas de amoreira-preta 'Cherokee' em diferentes concentrações de cloreto de potássio (KCl) e fosfato de sódio (NaH₂PO₄.H₂O). UFLA, Lavras, MG.

CONCLUSÕES

O número de brotos e o comprimento da parte aérea das plantas foi menor em razão de maior concentração de cloreto de potássio.

Melhores resultados foram obtidos na ausência de KCl e na presença de NaH₂PO₄.H₂O, principalmente do comprimento e do peso da matéria fresca.

REFERÊNCIAS

Antunes LEC (1999). Aspectos fenológicos, propagação e conservação pós-colheita de frutas de amoreira-preta (*Rubus* spp.) no sul de Minas Gerais. Tese de doutorado. Lavras, UFLA. 129 p.

Caldas LS, Haridasan P & Ferreira ME (1998). Meios nutritivos. In: Torres, AC, Caldas LS, Buso ja. (eds). Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Brasília: EMBRAPA/CNPH, 1:87-132.

Chen Y, Chang C. & Chang W (2000) A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis*. In Vitro Cellular and Developmental

Biology-Plant 36(5):420-423.

Donnelly DJ & Daubeny H (1986) Tissue culture of *Rubus* species. Acta Horticulturae 183:305-314.

Ferreira DF (2000). Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, 45, 2000, São Carlos. Anais... São Carlos: UFSCar. p.225-258.

Finne A (1986) Micropropagation of *Rubus* spp. Journal of Agricultural Science of Finland 58:193-196.

Gamborg OL, Miller RA & Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research 50:151-158.

Jennings DL & McNicol RJ (1991) *Rubus* breeding – recent progress and problems. Plant Breeding Abstracts 61:753-758.

Junqueira KP, Rodrigues VA, Santos FC & Pasqual M (2003). Crescimento *in vitro* de crisântemo: efeito do nitrato de cálcio (Ca(NO₃)₂.4H₂O e cloreto de potássio (KCl). In: Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, 14., Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 1. Lavras. Anais... Lavras - MG, 2003. p. 197.

Leontiev-Orlov O (1989) Propagation of plant of *Rubus* generation by the method of cutting. Proceedings of Problems of Modern Horticulture, p.37.

Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497.

Pasqual M (2001) Meios de cultura. Lavras-MG: UFLA/FAEPE, 74p.

White PR (1963) A handbook of plant tissue culture. Lancaster: Jacques Cotteil Press, 345p.