

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE AMOREIRA-PRETA ‘CHEROKEE’: EFEITO DE MEIOS DE CULTURA, CINETINA E GA₃

Fabíola Villa¹
Moacir Pasqual²
Leila Aparecida Salles Pio¹
Grazielle Sales Teodoro³
Luzia Yuriko Miyata³

RESUMO

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 plântulas prestabelecidas *in vitro*, foram excisados e inoculados em meios B5, ½ Knudson, Knudson e White, suplementado com diferentes concentrações de cinetina (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) e em meio Knudson com combinações de GA₃ (0; 2; 4; 6 e 8 mg L⁻¹) e cinetina (0; 0,5; 1,0; 2,0; e 4,0 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, utilizando-se quatro repetições, constituídas de quatro tubos com um explante em cada. No primeiro experimento, a maior média de brotos foi verificada em meio de cultura B5. A multiplicação de brotos ocorreu apenas nos tratamentos que continham cinetina associada aos meios de cultura B5 e Knudson. Observou-se maior comprimento da parte aérea em meio Knudson. Houve pouca ou nenhuma formação do sistema radicular nos tratamentos que continham o meio White. No segundo experimento, na ausência de cinetina, houve crescimento da parte aérea. O sistema radicular foi formado apenas nos tratamentos que não continham cinetina.

Palavras-chave: *Rubus* spp., micropropagação, reguladores de crescimento, meios de cultura

ABSTRACT

In vitro MULTIPLICATION OF BLACKBERRY ‘CHEROKEE’: EFFECT OF CULTURE MEDIA, KINETIN AND GA₃

With the objective of improving micropropagation techniques of blackberry cv. Cherokee (*Rubus* spp.), nodal segments with 2 cm length and two axillary buds, derived from *in vitro*-grown plants, were excised and inoculated in media B5, ½ Knudson, Knudson, and White, supplemented with different concentrations of kinetin (0; 0.5; 1.0; 2.0 and 4.0 mg L⁻¹), and in Knudson media with combinations of GA₃ (0; 2; 4; 6 and 8 mg L⁻¹) and cytokinin (0; 0.5; 1.0; 2.0 and 4.0 mg L⁻¹). The pH 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 a growth room at 27 ± 1 °C, 35 mmol m⁻² s⁻¹ irradiance and a photoperiod of 16 hours. The experiment was arranged in a completely randomized design, using four explants per replication. In the first experiment, the largest average number of sprouts was verified for the B5 medium. The multiplication of sprouts took place only in treatments that contained cytokinin associated to B5 and Knudson media. Larger length of the aerial part was observed in Knudson medium. There was little or any formation of roots in the treatments with the White medium. In the second experiment, growth of the aerial part took place in the absence of cytokinin. Roots were formed only in the treatments that did not contain cytokinin.

Key words: *Rubus* spp., micropropagation, growth regulators, culture media

¹ DAG/UFLA, Lavras, MG, e-mail: fvilla2003@libero.it

² Departamento de Agricultura/UFLA. Cx. P. 37, 37200-000, Lavras, MG, e-mail: mpasqual@ufla.br

³ Aluna de graduação em Agronomia, UFLA, Lavras, MG.

INTRODUÇÃO

Os maiores produtores de amora-preta na América do Sul são a Argentina e o Chile. O Brasil, apesar de seu grande potencial, não apresenta produção significativa desta fruta. O Estado que se destaca é o Rio Grande do Sul, mas, a amoreira-preta é também cultivada por pequenos produtores de Santa Catarina, Paraná e sul de Minas Gerais, restringindo-se, neste Estado, apenas ao plantio da EPAMIG/Fazenda Experimental de Caldas, localizado no município de Caldas (Antunes, 2002).

A propagação da amoreira-preta dá-se principalmente por meio de estacas de raiz, rebentos e hastes novas (Jennings & McNicol, 1991). Tem sido utilizada também a cultura de tecidos, permitindo a obtenção de milhares de plantas isentas de vírus e geneticamente uniformes em curto espaço de tempo (Caldwell, 1984, Pasqual *et al.*, 1991). Embora alguns métodos tradicionais sejam comumente usados, a técnica de cultura de tecidos juntamente com o uso de reguladores de crescimento e meios adequados podem eventualmente tornar-se um método preferido de propagação (Caldas *et al.*, 1998).

O crescimento e o desenvolvimento das plantas são controlados por substâncias orgânicas naturais denominadas fitormônios, os quais são sintetizados em pequenas concentrações e em determinadas regiões das plantas (Taiz & Zeiger, 1991). Quando são produzidos artificialmente, são denominados reguladores de crescimento, dentre os quais podem-se citar as citocininas e as giberelinas. O tipo de citocinina e sua concentração são os principais fatores que influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*.

Experimentos testando diversas combinações de citocinina com outros reguladores de crescimento são muito comuns para o ajustamento dos meios de cultura (Grattapaglia *et al.*, 1987). Apesar da citocinina ser essencial à multiplicação da parte aérea, o seu excesso é tóxico e caracteriza-se, principalmente, por grande número de brotos, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento exagerado dos caules e vitrificação (Leshem *et al.*, 1988). O BAP (6-benzilaminopurina) tem sido muito eficiente na multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias em diversas espécies (Hu & Wang, 1983) e é a citocinina mais utilizada, entretanto, a cinetina tem

apresentado resultados satisfatórios.

As giberelinas têm como um dos principais efeitos em cultura de tecidos o alongamento das brotações durante a multiplicação ou antes do enraizamento. Porém, quando aplicado em concentrações relativamente elevadas, o ácido giberélico impede a formação de raiz, especialmente se as auxinas forem aplicadas simultaneamente. De acordo com George (1996), o efeito do GA₃ na proliferação de brotações varia conforme a interação com outros reguladores de crescimento, dependendo também da espécie que está sendo micropropagada.

Os meios nutritivos utilizados na micropropagação fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (Caldas *et al.*, 1998). Embora o meio MS (Murashige & Skoog, 1962) tenha favorecido o crescimento e desenvolvimento de várias espécies, a utilização de composições mais diluídas, como os meios Knudson (1946), White (1963) e B5 (Gamborg *et al.*, 1968), têm fornecido melhores resultados (Grattapaglia & Machado, 1998).

Este trabalho teve como objetivo determinar a melhor concentração de cinetina, GA₃ e tipo de meio para a multiplicação *in vitro* de plantas de amoreira-preta.

MATERIAL E MÉTODOS

Segmentos nodais de amoreira-preta, cultivar Cherokee (*Rubus* spp.), com cerca de 2 cm e 2 gemas axilares, foram excisados de plantas prestabelecidas *in vitro*, em meio MS, sem reguladores de crescimento. O atual trabalho foi composto por dois experimentos; sendo no primeiro, os explantes inoculados em tubo de ensaio contendo 15 mL dos meios Knudson (1946), ½ Knudson, B5 (Gamborg *et al.*, 1968) e White (1963) combinados com cinco concentrações de cinetina (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹). O segundo experimento constou de explantes inoculados em tubo de ensaio contendo 15 mL de meio Knudson (1946), cinco concentrações de GA₃ (0; 2; 4; 6; e 8 mg L⁻¹) combinadas com cinco concentrações de cinetina (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹).

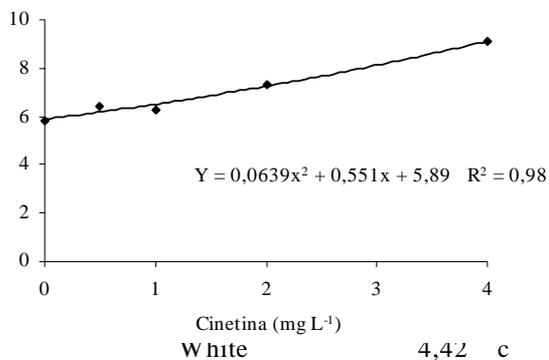
Os meios tiveram o pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem e foram solidificados com 6 g L⁻¹ de ágar

(Merck®). Posteriormente, os explantes foram transferidos para a sala de crescimento a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, irradiância de $35 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fornecida por tubos fluorescentes de 20W, marca Osram®, luz do dia especial e fotoperíodo de 16 horas, permanecendo nestas condições por 60 dias.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições, constituídas de quatro tubos contendo um explante cada uma. As variáveis analisadas no primeiro experimento foram número de folhas, número de brotos, comprimento e peso da parte aérea, presença de raízes, peso de calos frescos e no segundo foram número de folhas, número de brotos, comprimento e peso da matéria aérea e presença de raízes. Os resultados foram submetidos à análise de variância com o software Sisvar (Ferreira, 2000), sendo utilizados regressão polinomial para concentrações de cinetina e de GA₃ e teste de Scott-Knott (1974) para tipos de meio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o experimento composto de diferentes tipos



ior número de to que, para as

so da matéria fresca de plantas de amoreira-preta 'Cherokee' em diferentes tipos de

Peso da matéria fresca da parte aérea (g)	Comprimento da parte aérea (cm)
0,76 a	2,02 a
0,75 b	1,99 a
0,74 b	2,04 a
0,73 c	1,61 b

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott (1974).

demais variáveis estudadas, ½ Knudson e Knudson não diferiram estatisticamente. Possivelmente, a baixa concentração de nutrientes resultante da redução de 50% da concentração padrão do meio Knudson não interfere no aumento do número de folhas, no peso das plantas fresca e no comprimento da parte aérea das plantas de amoreira-preta (Tabela 1).

Menores números de folhas, peso da matéria fresca e comprimento da matéria fresca foram observados no meio White. Esse meio, por ser mais diluído que os outros, fornece menor quantidade de nutrientes essenciais ao desenvolvimento dos explantes e piores resultados.

Com o aumento das concentrações de cinetina, o número de folhas aumentou, sendo o maior número de folhas (9,45) observado com $4,31 \text{ mg L}^{-1}$ do regulador de crescimento (Figura 1).

A multiplicação de brotos ocorreu apenas nos tratamentos que continham cinetina associada aos meios B5 e Knudson (Figura 2). Houve pouca ou nenhuma formação do sistema radicular dos explantes inoculados no meio White.

Fráguas *et al.* (2004) verificaram a formação de raízes em explantes de *Ficus carica*, inoculados em meio WPM, na ausência de cinetina. Maior número de brotos

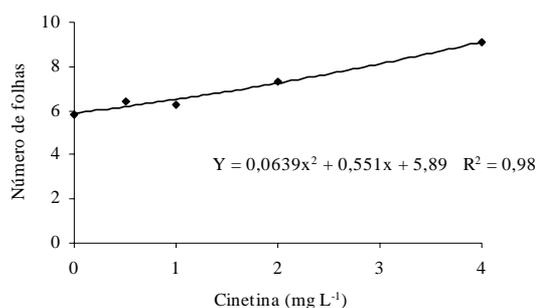


Figura 2. Número de brotos em plantas de amoreira-preta cv. Cherokee, com diferentes concentrações de cinetina e tipos de meio. UFLA, Lavras, MG.

(1,75 e 1,44) foi observado com 4 mg L⁻¹ de cinetina nos meios B5 e ½ Knudson, respectivamente. A utilização de 0,4 mg L⁻¹ de cinetina estimulou a formação de brotos e número de folhas por explante de *Embllica officinalis* (Misha *et al.*, 1999).

Não foi observada interação significativa para peso da matéria fresca da parte aérea. Maior peso da matéria fresca (0,752 g) foi obtido com 4 mg L⁻¹ de cinetina e melhores resultados em meio B5 (Tabela 1). Porém, com o aumento das concentrações deste regulador de crescimento houve decréscimo no peso da matéria fresca (Figura 3). É possível que essa redução no tamanho dos brotos seja devida ao efeito tóxico causado pelo excesso de citocinina nos explantes.

Maior comprimento da parte aérea (2,04 cm) foi verificado em meio Knudson (Tabela 1), sugerindo que sua concentração, em relação à de outros meios testados,

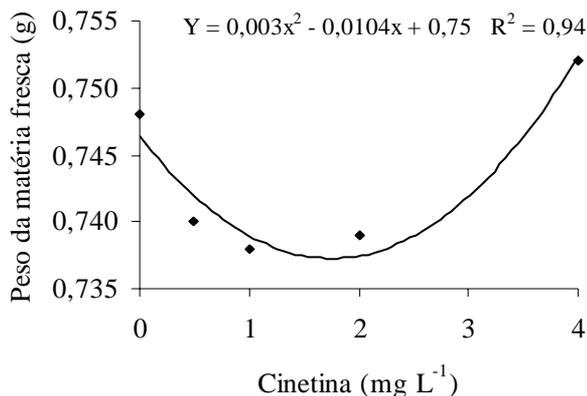


Figura 3. Peso da matéria fresca de amoreira-preta cv. Cherokee, em diferentes concentrações de cinetina. UFLA, Lavras, MG.

é ideal para o crescimento e desenvolvimento da parte aérea de plantas de amoreira-preta cv. Cherokee.

A formação de calos ocorreu apenas em meio B5 nas diferentes concentrações de cinetina (Figura 4). Diferentes resultados foram obtidos por Jordan e Iturriaga (1980), que verificaram que a utilização da cinetina como único regulador de crescimento no meio de cultura MS diminuiu a formação de calos em *Ficus carica*. Possivelmente, a concentração de nutrientes no meio B5, associada à cinetina, é suficiente para que calos se desenvolvam.

Para o segundo experimento, não foi observada interação significativa para número de folhas e peso da matéria fresca da parte aérea. O comprimento da parte

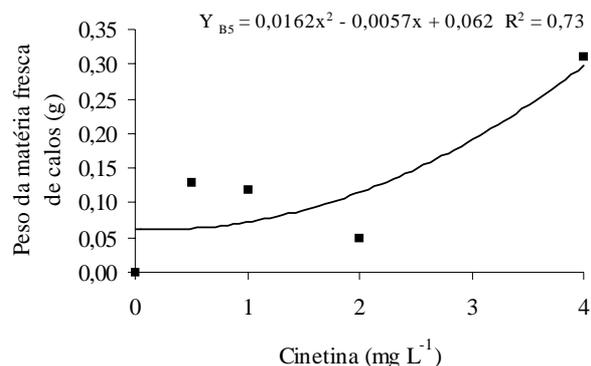


Figura 4. Peso da matéria fresca de calos de amoreira-preta cv. Cherokee, com diferentes concentrações de cinetina e meio B5. UFLA, Lavras, MG.

aérea das plantas foi menor em razão de maiores concentrações de cinetina (Figura 5). É possível que essa redução no tamanho dos brotos seja devida ao efeito tóxico causado pelo excesso de citocinina nos explantes. Leshem *et al.* (1988) relatam que, apesar da utilização de citocinina ser necessária à multiplicação dos brotos, o seu excesso é tóxico e algumas características observadas são falta de alongamento das culturas, redução no tamanho das folhas e encurtamento dos entrenós.

Diniz *et al.* (2003), estudando a interação de BAP e GA₃, verificou que, a adição da citocinina ao meio de cultura MS, causava uma redução no crescimento das

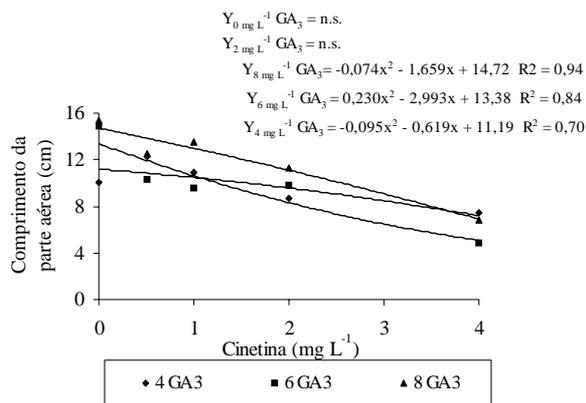


Figura 5. Comprimento da parte aérea (cm) de plantas de amoreira-preta cv. Cherokee, cultivadas em diferentes concentrações de cinetina e GA₃. UFLA, Lavras, MG.

plantas de macela.

Embora o número de folhas, número de brotos e peso da matéria fresca não tenham sido significativos, a multiplicação de brotos ocorreu apenas nos tratamentos

que continham cinetina na presença ou ausência de GA₃. Houve formação do sistema radicular apenas nos tratamentos que não continham cinetina.

CONCLUSÕES

Maior média de brotos foi verificada em meio de cultura B5.

A multiplicação de brotos ocorreu apenas nos tratamentos que continham cinetina associada aos meios de cultura B5 e Knudson.

Observou-se maior comprimento da parte aérea em meio Knudson.

Houve pouca ou nenhuma formação do sistema radicular em meio White.

Na ausência de cinetina, houve crescimento da parte aérea.

O sistema radicular foi formado apenas nos tratamentos sem cinetina.

REFERÊNCIAS

- Antunes LEC (2002) Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil. *Ciência Rural* 32(1):151-158.
- Caldas LS, Haridasan P & Ferreira ME (1998) Meios nutritivos. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA (Ed.). *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: EMBRAPA/CNPq, 1: 87-132.
- Caldwell JD (1984) Blackberry propagation. *HortScience* 19(2):13-15.
- 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.
- Diniz JDN, Almeida JL, Teixeira ALA, Gomes ES & Hernandez FFF (2003) Ácido giberélico (GA₃) e 6-Benzilaminopurina (BAP) no crescimento *in vitro* de macela [*Egletes viscosa* (L.) Less.]. *Ciência e Agrotecnologia* 27(4):934-938.
- Fráguas CB, Pasqual M & Pereira AR (2004) Multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L.: efeito da cinetina e do ácido giberélico. *Ciência e Agrotecnologia* 28(1):49-55.
- Gamborg OL, Miller RA & Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50:151-158.
- George EF (1996) *Plant propagation by tissue culture: part 1 – The Technology*, 2 ed. Edington: Exegetics Limited. 1574 p.
- Grattapaglia D, Assis TF & Caldas LS (1987) Efeito residual de BAP (6-benzilaminopurina) e NAA (ácido naftaleno acético) na multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus*. In: Simpósio Nacional de Cultura de Tecidos Vegetais, 2., 1987, Brasília, DF. Resumos... Brasília. p.8.
- Grattapaglia D & Machado MA (1998) Micropropagação. In: Torres AL, Caldas LS & Buso JA (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*, Brasília-DF: Embrapa, 1: 183-260.
- Hu CY & Wang PJ (1983) Meristem, shoot tip and bud culture. In: Evans da, Sharp WR, Ammirato PV & Yamada Y (Ed.). *Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding*. New York: Macmillan. p.117-227.
- Jennings DL, McNicol RJ (1991) *Rubus* breeding – recent progress and problems. *Plant Breeding Abstracts*, 61:753-758.
- Jordan M & Iturriaga L (1980) Formación de raíces en entrenudos de higuera (*Ficus carica* L.) cv. Adriatic) cultivados *in vitro*. *Ciencia Investigaciones Agrícolas* 7(2):149-151.
- Knudson L (1946) A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin* 14:214-217.
- Leshem B, Werker E & Shalev DP (1988) The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. *Annals of Botany* 62(3):271-276.
- Mishra M, Saxena, RP, Pathak RK & Srivastava AK (1999) Studies on micropropagation of aonla (*Emblica officinalis* Gaertn). *Progressive Horticulture* 31(3/4):116-122.

Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3):473-497.

Pasqual M, Peixoto PHP, Santos JC & Pinto Jebp (1991) Propagação “in vitro” da amora-preta (*Rubus* sp.) cv. Ébano: uso de reguladores de crescimento. *Ciência e*

Prática 15(3):282-286.

Taiz L & Zeiger E (1991) Auxins: Growth and Tropisms. In: _____. *Plant Physiology*. California: The Benjamin/Cummings Publishing Company. p.398-424.

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

Aceito para publicação em 23/07/2006