

# MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE AMOREIRA-PRETA CULTIVAR BRAZOS

## *In vitro* multiplication of blackberry cv. Brazos

Fabiola Villa<sup>1</sup>, Chrystiane Borges Fráguas<sup>2</sup>, Leonardo Ferreira Dutra<sup>3</sup>,  
Leila Aparecida Salles Pio<sup>4</sup>, Moacir Pasqual<sup>4</sup>

### 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 cultivar Brazos (*Rubus idaeus* L.), segmentos nodais, oriundos de plântulas preestabelecidas *in vitro* foram excisados e inoculados em meio WPM (0, 50, 100, 150 e 200%), suplementado com diferentes concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>). Após a inoculação, os explantes foram transferidos para sala de crescimento a 27±1°C, irradiância de 35 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas, onde permaneceram por 60 dias. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, utilizando-se de quatro repetições com quatro explantes cada. Maior número de brotos foi proporcionado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP associado a 100% de meio WPM e maior comprimento médio dos brotos após 60 dias foi verificado em 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP associado a 200% de meio WPM. Maior peso de matéria seca da parte aérea foi obtido em meio WPM 200% acrescido de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

**Termos para indexação:** *Rubus idaeus* L., micropropagação, benzilaminopurina, meio de cultura WPM.

### ABSTRACT

With the objective of multiplying blackberry cv. Brazos, nodal segments, coming from *in vitro* plants previously selected, were excised and inoculated in WPM culture medium (0, 50, 100, 150 and 200%), supplemented with different concentrations of BAP (0; 0,5; 1,0; 2,0 and 4,0 mg L<sup>-1</sup>). After inoculation, the explants were transferred to culture room, at 27±1°C temperature, 35 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> of irradiance and photoperiod of 16 hours, for 60 days. The experimental was a design randomized complete block, with four replications and four explants each. Greater number of sprouts was provided with 1,0 mg L<sup>-1</sup> of BAP associated with 100% WPM culture medium and larger sprouts length average after 60 days were verified in 1,0 mg L<sup>-1</sup> of BAP associated with 200% WPM culture medium. Higher dry matter weight of the aerial part was obtained in 200% WPM culture medium added with 0,5 mg L<sup>-1</sup> of BAP.

**Index terms:** *Rubus idaeus* L., micropropagation, benzilaminopurin, WPM culture medium.

(Recebido para publicação em 23 de janeiro de 2004 e aprovado em 27 de setembro de 2004)

### INTRODUÇÃO

Muitas espécies do gênero *Rubus*, ao qual pertencem a framboesa e a amora-preta, são originárias da região mediterrânea, têm uma longa história de cultivo e hoje encontram-se disseminadas pelo mundo (ANTUNES, 1999).

Os maiores produtores de amora-preta na América do Sul são a Argentina e o Chile (JENNINGS & MCNICOL, 1991). O Brasil, apesar de seu grande potencial, não apresenta produção significativa desta fruta. O estado que se destaca é o Rio Grande do Sul, sendo suas principais regiões produtoras próximas às cidades de Feliz e Pelotas, onde se encontra a Embrapa/Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, que desenvolve pesquisas com pequenos frutos. Além do Rio Grande do

Sul, 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 na EPAMIG/Fazenda Experimental de Caldas, localizado no município de Caldas.

A propagação da amoreira-preta é feita normalmente por estacas de raízes (CADWELL, 1984) que, por ocasião do repouso vegetativo, são preparadas e enviveiradas em sacolas plásticas. Podem também ser usados brotos (rebentos) originados de plantas cultivadas, além de estacas herbáceas (ANTUNES, 1999; RASEIRA et al., 1984). Outra alternativa viável é a cultura de tecidos, por meio da micropropagação, com o intuito de se obterem plantas livres de vírus, geneticamente uniformes e em curto espaço de tempo (SANTOS & RASEIRA, 1988).

<sup>1</sup> Doutoranda em Fitotecnia – Departamento de Agricultura – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37.200-000 – Lavras, MG – fvilla2003@libero.it

<sup>2</sup> Doutoranda em Produção Vegetal, FCAV/UNESP – Cx. P. 545 – 18.618-000 – Botucatu, SP.

<sup>3</sup> Engenheiro Agrônomo, Dr., Pesquisador Centro Nacional de Pesquisa de Florestas/CNPQ – EMBRAPA – Estrada da Ribeira, Km 11 – Colombo, PR – Cx. P. 319 – 83.411-000.

<sup>4</sup> Professor Dr. Titular do Departamento de Agricultura – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37.200-000 – Lavras, MG – mpasqual@ufla.br

Entretanto, a elevada variabilidade de comportamento *in vitro* obriga a se desenvolver condições específicas de cultivo, pois nem todas as espécies do gênero *Rubus* possuem grande coeficiente de propagação *in vitro* (KISS & ZAKYTO, 1978; LEONTIEV-ORLOV, 1989).

Os meios de cultura são parte essencial da cultura de tecidos. O meio básico WPM (Wood Plant Medium) de Loyd & McCown (1980) foi desenvolvido para cultura de brotações de plantas lenhosas e apresenta  $\frac{1}{4}$  das concentrações de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  do meio MS, além de possuir mais potássio e um alto nível de íons sulfato. Entretanto, para cada tipo de espécie, cultivar e explante, o meio mais adequado e eficiente é variável. Para determinar qual o melhor meio de cultura deve-se realizar diversos ensaios (BRUM, 2001).

Os reguladores de crescimento são substâncias sintéticas que, apresentam propriedades químicas semelhantes a dos hormônios vegetais (TOMBOLATO & COSTA, 1998). O tipo de citocinina e sua concentração são os principais fatores que influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*. Testes de diversas combinações de citocinina com outros reguladores de crescimento são muito comuns para o ajustamento dos meios de cultura (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

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, seguida pela cinetina e 2iP (isopenteniladenina). Para multiplicação em meio de cultura, em geral, suas concentrações variam de 0,1 a 5 mg L<sup>-1</sup> (TOMBOLATO & COSTA, 1998).

O fácil enraizamento de brotos de um híbrido 'amora-preta x framboesa' foi obtido por Kiss & Zakyto (1978) em meio Nitsch e Nitsch com 3 % de sacarose e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB (Ácido indolbutírico).

A cultura de gemas axilares das cultivares 'Smothstem' e 'US 64-39-2' foi realizada em meio MS líquido adicionado de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> (ácido giberélico) e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB, sendo posteriormente transferida para meio sólido, onde houve rápida proliferação dos brotos (BROOME & ZIMMERMAN, 1978).

Objetivou-se com este trabalho avaliar a influência de diferentes concentrações dos componentes do meio WPM e BAP, na micropropagação de amoreira-preta cultivar Brazos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Segmentos nodais de amoreira-preta, cultivar Brazos, com cerca de 2 cm e 2 gemas axilares/explante, oriundos de plantas preestabelecidas *in vitro* no laboratório de cultura de tecidos de plantas da Embrapa Clima Temperado-Pelotas, RS, foram inoculados em meio de cultura WPM nas concentrações de 0, 50, 100, 150 e 200%, combinadas com cinco concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (15 minutos a 120°C e 1,5 atm de pressão) e adicionado de com 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose.

Os segmentos nodais foram inoculados em tubos de ensaio (20 x 150mm), contendo 12 mL do meio de cultura e posteriormente transferidos para sala de crescimento a 27±1°C, irradiância de 35 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas, permanecendo nestas condições por 60 dias.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo cada repetição formada por quatro tubos de ensaio e cada tubo com um explante. As variáveis analisadas foram número, comprimento médio dos brotos e peso da matéria seca dos brotos. Os resultados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se de regressão polinomial para concentrações de BAP e meio WPM.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve aumento do número de brotos com o aumento da concentração do meio WPM. Na concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP o comportamento foi quadrático, indicando que houve aumento até cerca de 150% do meio WPM. Depois, estabilizou-se e até mostrou certo decréscimo. Maior número de brotos/planta (2,63) foi obtido em 100% de meio WPM com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Figura 1).

Brum (2001) obteve também maior número de brotos em figueira cultivar 'Roxo de Valinhos' com a mesma concentração de meio WPM. Fráguas (2003), com a utilização de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de cinetina e 100% do meio WPM obteve brotos maiores e bem formados, mas brotações pequenas com a utilização de BAP em figueira. Na ausência de BAP, não houve produção de brotos, em todas as concentrações de meios WPM utilizados.

Em trabalho com macieira, Yui (1990) observou melhores resultados com a aplicação de 5,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, comprovando que este regulador de crescimento deve ser incorporado ao meio de cultura para aumentar a taxa de multiplicação dos brotos. Um maior número e peso de

matéria fresca de brotos de crisântemo foram proporcionados por 200% de meio WPM combinado com 4,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP (FINOTTI et al., 2002).

Souza (1995), trabalhando com cultivar 'Ébano' em meio MS, observou que na ausência de sacarose, houve uma produção média de 2,9 brotos e com 35,3 g L<sup>-1</sup> de sacarose houve uma produção de 18,2 brotos. Esta resposta sugere que, o explante utilizou-se de suas reservas de nutrientes para induzir as novas brotações ou produziu, sua própria energia pela fotossíntese. Babic & Neskovic (1984) registraram uma produção análoga de brotos para as cultivares Smoothstem e Thornless em meio de cultura com a concentração de sacarose em torno de 30 g L<sup>-1</sup>.

Maior comprimento médio de brotos (7,87 cm) foi observado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, em meio WPM 200% (Figura 2). Na concentração de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP o comportamento foi quadrático, indicando que houve aumento até 200% do meio WPM. Houve crescimento dos brotos com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP até cerca de 150% do meio WPM. Depois, estabilizou-se e até mostrou certo decréscimo. Mesmo na ausência de meio WPM, pode-se observar crescimento dos brotos para as concentrações de BAP.

Esse crescimento dos brotos, verificado na ausência de meio WPM, pode ter sido um estiolamento da amoreira-preta, pois, o crescimento e desenvolvimento de brotos de plântulas *in vitro*, na ausência de micro e macronutrientes do meio de cultura é praticamente inexistente.

Schuch (1989), trabalhando com macieira 'Marubakaido', verificou que a melhor taxa de multiplicação

foi obtida com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

Para James (1981), o BAP em concentrações variando de 1,0 a 2,0 mg L<sup>-1</sup>, na multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de macieira cv. M9, mostrou também ser eficiente.

Pasqual et al. (1991) observaram que brotos mais alongados da cultivar Ébano de amoreira-preta são obtidos com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0,001 mg L<sup>-1</sup> de ANA (Ácido naftaleno acético) e que a adição de AG<sub>3</sub> ao meio com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,001 mg L<sup>-1</sup> de ANA resulta num significativo aumento do número de brotos por gema.

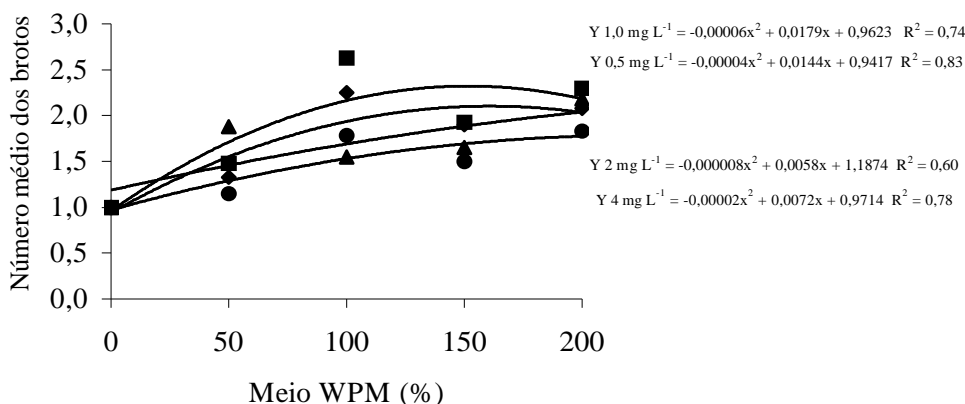
Skirvin et al. (1981) verificaram uma rápida proliferação de gemas axilares de amoreira-preta cultivares Thornless Boysenberry e Thornless Youngberry em meio MS acrescido de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA.

Maior peso da matéria seca (0,093 g) ocorreu em meio WPM 200%, suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Figura 3).

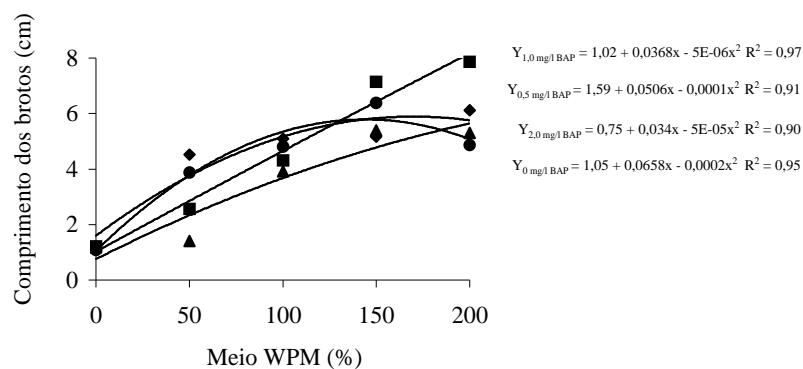
Houve um aumento das concentrações de 0,5 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP com o acréscimo da concentração de WPM no meio em relação à matéria seca dos brotos.

Mesmo na ausência de meio WPM, verificou-se matéria seca dos brotos. Na concentração de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP o comportamento foi quadrático, indicando que houve aumento até 150% do meio WPM. Depois, estabilizou-se e até mostrou certo decréscimo.

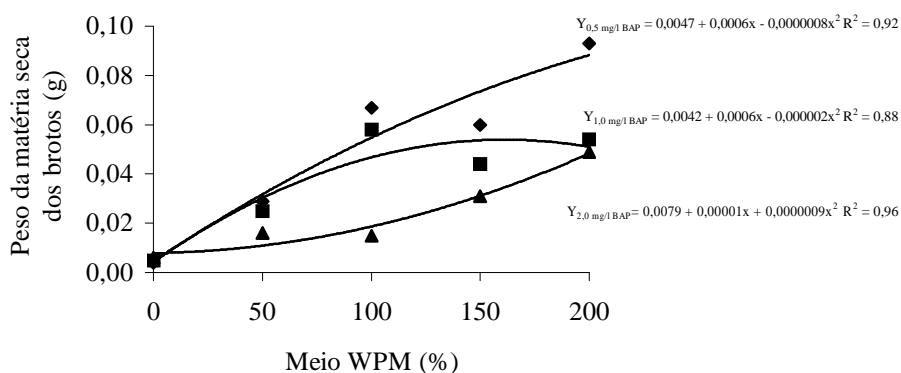
De maneira geral, a concentração adequada de BAP situou-se entre 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>.



**FIGURA 1** – Número médio de brotos em plântulas de amoreira-preta, cultivar Brazos, com diferentes concentrações de BAP e meio WPM. UFLA, Lavras - MG, 2003.



**FIGURA 2** – Comprimento de brotos em plântulas de amoreira-preta, cultivar Brazos, cultivadas em diferentes concentrações de BAP e meio WPM. UFLA, Lavras - MG, 2003.



**FIGURA 3** – Peso da matéria seca dos brotos de amoreira-preta, cultivar Brazos, cultivadas em diferentes concentrações de BAP e meio WPM. UFLA, Lavras - MG, 2003.

### CONCLUSÕES

Maior número médio de brotos/planta e comprimento médio de brotos foi proporcionado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP associado a 100% e 200% de meio WPM, respectivamente.

Maior peso de matéria seca da planta foi obtido em meio WPM 200% acrescido de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, L. E. C. **Aspectos fenológicos, propagação e conservação pós-colheita de frutas de amoreira-preta (*Rubus spp*) no sul de Minas Gerais.** 1999. 129 p. Tese

(Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

BABIC, V.; NESKOVIC, M. Propagation of three blackberry cultivars from small apical buds *in vitro*. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 59, n. 2, p. 183-185, 1984.

BROOME, O. C.; ZIMMERMAN, R. H. *In vitro* propagation of blackberry. **HortScience**, Alexandria, v. 13, n. 2, p. 151-153, Apr. 1978.

BRUM, G. R. **Micropropagação da figueira (*Ficus carica L.*) ‘Roxo de Valinhos’.** 2001. 41 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

- CADWELL, J. D. Blackberry propagation. **HortScience**, Alexandria, v. 19, n. 2, p. 193-195, 1984.
- CHEEMA, G. S.; SHARMA, D. P. *In vitro* propagation of apple rootstocks-EMLA. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 131, p. 75-88, 1983.
- FINOTTI, D. R.; PASQUAL, M.; REZENDE, J. C. de; CHAGAS, E. A.; DUTRA, L. F. Multiplicação *in vitro* de crisântemo. In: CICESAL/UFLA, 15., 2002, Lavras, MG. **Resumos...** Lavras: UFLA, 2002. p. 24.
- FRÁGUAS, C. B. **Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira ‘Roxo de Valinhos’ em diferentes ambientes**. 2003. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. L.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa, 1998. v. 1, p. 183-260.
- HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Eds.). **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. New York: Macmillan, 1983. p. 117-227.
- JAMES, D. J. Shoot and root initiation *in vitro* in the apple rootstock M9 and the promotive effects of the phloroglucinol. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 56, n. 1, p. 15-20, 1981.
- JENNINGS, D. L.; McNICOL, R. J. *Rubus* breeding: recent progress and problems. **Plant Breeding Abstracts**, Berlin, v. 61, p. 753-758, 1991.
- KISS, F.; ZAKYTO, J. Vegetative propagation of *Rubus* species *in vitro*. **Botanikai Közlemények**, Budapest, p. 65-69, 1978.
- LEONTIEV-ORLOV, O. Propagation of plant of *Rubus* generation by the method of cutting. **Pros. Problems of Modern Horticulture**, [S.l.], p. 37, 1989.
- LOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.
- PASQUAL, M.; PEIXOTO, P. H. P.; SANTOS, J. C. dos; PINTO, J. E. B. P. Propagação *in vitro* da amora-preta (*Rubus* sp.) cv Ébano: uso de reguladores de crescimento. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 15, n. 3, p. 282-286, 1991.
- RASEIRA, M. do C. B.; SANTOS, A. M. dos; MADAIL, J. C. M. **Amora-preta: cultivo e utilização**. Pelotas: EMBRAPA-CNPFT, 1984. 20 p. (Circular técnica, 11).
- SANTOS, A. M. dos; RASEIRA, M. do C. B. **Lançamento de cultivares de amoreira-preta**. Pelotas: EMBRAPA-CNPFT, 1988. Não paginado. (Informativo, 23).
- SCHUCH, M. W. **Micropropagação de macieira cultivares Marubakaido (*Malus prunifolia*) e Megumi (*Malus domestica* Borkh)**. 1989. 98 f. Dissertação (Mestrado em Fruticultura de Clima Temperado) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1989.
- SKIRVIN, R. M.; CHU, M. C.; GOMEZ, E. *In vitro* propagation of Thornless Trailing Blackberries. **HortScience**, Alexandria, v. 16, n. 3, p. 310-312, 1981.
- 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**. 1995. 36 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1995.
- TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. Micropropagação de plantas ornamentais. **Boletim Técnico do Instituto Agrônomo**, Campinas, n. 174, p. 58-62, maio 1998.
- YUI, E. **Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de macieira (*Malus domestica* Borkh.)**. 1990. 69 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1990.