

Ácido bórico e sulfato de zinco hidratado no crescimento *in vitro* de duas espécies frutíferas.

Myiata, Luzia Yuriko¹; Villa, Fabíola²; Pasqual, Moacir³; Assis, Franscinely Aparecida¹; Vilela, Ximena Maira de Souza¹; Silva, Andrieli Leão Pereira⁴.

¹Aluno de graduação em Agronomia, UFLA, Lavras, MG, e-mail: luziaym@yahoo.com.br;

²Doutoranda em Fitotecnia (DAG), UFLA, Lavras, MG, e-mail: fvilla2003@libero.it; ³Professor Adjunto do Departamento de Agricultura (DAG), UFLA, Lavras, MG, e-mail: mpasqual@ufla.br; ⁴Aluna de graduação em Agronomia, Cesur, Rondonópolis, MT, e-mail: andriellileao@hotmail.com.

INTRODUÇÃO

A fruticultura de clima temperado apresenta grande importância no contexto da produção mundial de frutas. Algumas das frutas produzidas em maior volume em todo o mundo, tais como a macieira e a videira, são de espécies pertencentes a esta classe. Além disso, estas espécies são cultivadas com maior intensidade nas regiões de maior consumo de frutas, tais como os países desenvolvidos do Hemisfério Norte (Chalfun et al., 1998).

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. O Sul de Minas Gerais tem apresentado elevado potencial para esta fruta, destacando-se o município de Caldas. A sua propagação se faz através de estacas de raízes, ou ainda por brotos, originados de plantas cultivadas e estacas herbáceas (Antunes et al., 2004). Além destes, com a micropropagação, é possível obter plantas livres de vírus, geneticamente uniformes e em curto espaço de tempo, sendo assim uma alternativa viável (Peixoto & Pasqual, 1996).

A cultura da videira (*Vitis* spp.), pela sua extensa área plantada no Brasil e pelo seu potencial de utilização como matéria-prima para indústrias de vinhos, sucos, geléias, passas, vinagres, e para consumo *in natura*, constitui uma importante fruteira de clima temperado, ocupando o terceiro lugar quanto ao valor de produção.

Devido à grande variabilidade genética e à maior dificuldade de crescimento e diferenciação *in vitro*, a micropropagação de espécies lenhosas requer estudos mais específicos e desenvolvimento de metodologias que atendam às exigências do explante. Os meios utilizados na micropropagação fornecem 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 tenha favorecido o crescimento e desenvolvimento de várias espécies, a utilização de composições mais diluídas, como o meio DSD1 (Silva & Doazan, 1995), para algumas espécies lenhosas, como é o caso da videira, tem fornecido melhores resultados.

Existe grande variedade de meios para micropropagação. Entretanto, a maioria das descrições de preparos de meios alternativos não demonstram de maneira comparativa se o novo meio é ou não melhor que o outro do qual foi originado. Várias mudanças de padrão foram propostas na tentativa de otimizar o crescimento *in vitro* (Pasqual, 2001). Essas visam principalmente a redução ou incremento de alguns componentes, como por exemplo os micronutrientes, que podem promover melhor crescimento em tecidos vegetais.

O boro (B) é encontrado no solo sob a forma de ácido bórico e este é o composto usado como fonte do elemento em cultura de tecidos (Pasqual, 2001). O sintoma da deficiência desse micronutriente em plantas é a paralisação do crescimento dos meristemas apicais (Faquin, 2001). O zinco (Zn) é um elemento muito importante, pois, é responsável direto pela síntese do triptofano e indireto pela síntese de proteína. A principal função do Zn no metabolismo é como componente a ativador enzimático. Também está envolvido no metabolismo de auxinas, em particular no ácido indolacético (AIA) (Faquin, 2001). Os sintomas mais típicos da carência do elemento consistem no encurtamento dos internódios e na produção de folhas pequenas cloróticas e lanceoladas.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de propagação *in vitro* sobre o porta-enxerto de videira 'Kobber 5BB' e amoreira-preta cv. Tupy, visando mudanças nas concentrações de micronutrientes do meio de cultura DSD1.

MATERIAL E MÉTODOS

Segmentos nodais de amoreira-preta (*Rubus* sp.), com cerca de 2 cm de comprimento, oriundos de brotações preestabelecidas *in vitro* foram excisados e introduzidos em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio de cultura DSD1 modificado (Silva & Doazan, 1995). O experimento consistiu de plantas de amoreira-preta cv. Tupy, do porta-enxerto de videira (*Vitis* spp.) 'Kobber 5BB' e de quatro diferentes concentrações de ácido bórico (0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) e quatro de sulfato de zinco hidratado (0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹), em todas as combinações possíveis, adicionadas ao meio de cultura.

Os meios de cultivo foram acrescidos de 20 g L⁻¹ de sacarose, solidificados com 7 g L⁻¹ de ágar e o pH ajustado para 6,4, antes da autoclavagem a 121°C e 1 atm por 20 minutos. Posteriormente à inoculação, os tubos de ensaio foram transferidos para sala de crescimento a 25 ± 2°C, irradiância de 35 µmol.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas diárias, permanecendo nestas condições por 70 dias. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, utilizando-se 4 repetições com 12 brotações por tratamento. Foram avaliados os números de folhas e de raízes, comprimento da parte aérea e das raízes e peso da matéria fresca da parte aérea. Os dados foram analisados através do software Sisvar (Ferreira, 2000), utilizando regressão polinomial para as variáveis.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados da análise de variância para as características avaliadas estão apresentados nas Tabelas 1 e 2. No experimento com o porta-enxerto de videira, observou-se significância do micronutriente boro apenas para NF e CR do porta-enxerto de videira. Não houve interação significativa para o CPA, PFPA e NR em relação à mudança da concentração dos micronutrientes do meio de cultura DSD1. Em todos os tratamentos que continham Zn foi verificada a presença de calos na base dos explantes utilizados.

TABELA 1. Resumo da análise de variância para número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), número de raízes (NR), peso fresco da parte aérea (PFPA) e comprimento das raízes (CR) do porta-enxerto de videira. UFLA, Lavras, 2006.

Fontes de Variação	Quadrados Médios					
	GL	NF	CPA	NR	PFPA	CR
B	3	3,49*	0,79 ^{n.s.}	0,041 ^{n.s.}	0,00021 ^{n.s.}	3,62*
Zn	3	1,66 ^{n.s.}	4,47 ^{n.s.}	0,0096 ^{n.s.}	0,00069 ^{n.s.}	2,49 ^{n.s.}
B x Zn	9	1,08 ^{n.s.}	1,33 ^{n.s.}	0,0175 ^{n.s.}	0,00053 ^{n.s.}	1,63 ^{n.s.}
Resíduo	45	0,76	2,56	0,0172	0,00035	1,23
CV (%)		12,90	14,75	9,83	22,45	24,51

* significativo a 5% de probabilidade.

TABELA 2. Resumo da análise de variância para número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), número de raízes (NR), peso fresco da parte aérea (PFPA) e comprimento das raízes (CR) de amoreira-preta. UFLA, Lavras, 2006.

Fontes de Variação	Quadrados Médios					
	GL	NF	CPA	NR	PFPA	CR
B	3	68,35 ^{n.s.}	1,234 ^{n.s.}	0,137 ^{n.s.}	0,0046 ^{n.s.}	0,108 ^{n.s.}
Zn	3	86,16 ^{n.s.}	0,416 ^{n.s.}	0,098 ^{n.s.}	0,0058 ^{n.s.}	0,174 ^{n.s.}
B x Zn	9	60,46*	1,255*	0,056 ^{n.s.}	0,0041*	0,349*
Resíduo	45	1,94	0,54	0,064	0,0012	0,066
CV (%)		13,30	18,82	15,79	13,28	13,59

* significativo a 5% de probabilidade.

Com incrementos na concentração do ácido bórico no meio de cultura, verificou-se um aumento de forma quadrática no número de folhas do porta-enxerto de videira, onde maior número foi observado com altas concentrações desse ácido ($4,0 \text{ mg L}^{-1}$). Os dados obtidos aqui com esse porta-enxerto corroboram com Ribeiro (2005), que também observou que, plantas *in vitro* de *Cattleya loddigesii* possuíam menor número de folhas na ausência de sulfato de zinco hidratado adicionado ao meio de cultura Knudson. A redução dessa variável pode ter sido causada pela toxidez por $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Verificou-se interação significativa entre boro x zinco para NF, CPA, CR e PFPA de amoreira-preta. Não houve interação significativa para o número de raízes em relação à mudança da concentração dos micronutrientes do meio de cultura DSD1. Com incrementos na concentração do ácido bórico no meio de cultura, observaram-se respostas antagônicas para as duas frutíferas estudadas, verificando assim uma diminuição de forma quadrática no NF da cultivar 'Tupy', onde maior número foi observado na ausência dos micronutrientes estudados. Os dados obtidos para amoreira-preta corroboram com Ribeiro (2005), que também observou que, plantas *in vitro* de *Cattleya loddigesii* possuíam menor número de folhas na ausência de sulfato de zinco hidratado.

Resultados contrastantes foram obtidos por Franco (2004), que obteve maior número de folhas com a utilização de $17,2 \text{ mg L}^{-1}$ de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $12,4 \text{ mg L}^{-1}$ de H_3BO_3 do meio de cultura MS na micropropagação de crisântemo (*Dendranthema grandiflora*). Entretanto, deve-se observar que, entre espécies ocorrem comportamentos distintos. Possivelmente a amoreira-preta e o porta-enxerto de videira requerem um meio de cultura mais pobre em boro para se desenvolver melhor, quando comparados ao crisântemo.

Observa-se que incrementos nas concentrações de H_3BO_3 adicionadas ao meio DSD1, na ausência de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, proporcionaram diminuição de forma quadrática na altura das plantas de amoreira-preta até 1,07 cm. Essa redução foi provavelmente causada por distúrbios nutricionais pela adição desses sais. Entretanto, maior altura de brotações (5,42 cm) foi observada na ausência dos micronutrientes no meio de cultivo. Franco (2004) trabalhando com micropropagação de crisântemo *in vitro* afirma que maior comprimento de plantas é obtido em meio MS, adicionado de $17,2 \text{ mg L}^{-1}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $12,4 \text{ mg L}^{-1}$ H_3BO_3 , o que mostra a necessidade do aumento da disponibilidade desses nutrientes nesse meio para um melhor crescimento de plantas.

Resultados semelhantes ao comprimento da parte aérea também foram constatados para peso fresco de plantas de amoreira-preta, ou seja, com incrementos nas concentrações de ácido bórico no meio DSD1, um decréscimo de forma quadrática no peso fresco da parte aérea foi observado. Ono et al. (1992) observaram que tratamentos com auxina mais boro obtiveram um aumento significativo da matéria fresca média, em relação aos tratamentos apenas com auxina. Isso implica a influência positiva do boro para esta variável.

Pode-se observar um decréscimo de forma quadrática no comprimento das raízes do porta-enxerto de videira até $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido bórico. A partir desse ponto houve redução, provavelmente devido ao excesso de micronutrientes, causando toxidez. Resultados semelhantes foram verificados tanto na presença de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ da fonte de boro como na sua ausência. Se o objetivo do trabalho for o enraizamento de plantas e de reduzir custos, seria viável a utilização de um meio de cultura sem a presença de ácido bórico. Evidencia-se assim que, para promover o comprimento médio do sistema radicular, o meio DSD1 é benéfico com apenas a adição de ácido bórico. De acordo com Pasqual (2001), o B promove a destruição da auxina natural e aumenta sua translocação, logo, plantas com deficiência de B têm sistema radicular reduzido.

Num substrato com deficiência de nutrientes, aumentar o comprimento das raízes é uma maneira da plântula buscar os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento mesmo que isto implique em gasto de reservas. Observa-se que a ausência de ácido bórico e ausência dos dois micronutrientes, respectivamente, no meio de cultura DSD1 influenciou o comprimento médio do sistema radicular desta maneira. Pode-se observar também para a amoreira-preta, um decréscimo de forma quadrática em todas as variáveis analisadas e interação significativa sem a adição de boro e zinco no meio de cultura. A redução desses

parâmetros pode ter sido causada pela toxidez por ácido bórico e/ou sulfato de zinco hidratado.

Se o objetivo do trabalho for de multiplicação de plantas e redução de custos, seria viável a utilização de um meio de cultura sem a presença desses micronutrientes. Evidencia-se assim que, para promover o comprimento da parte aérea e médio do sistema radicular, o meio DSD1 é benéfico na ausência de boro e zinco.

CONCLUSÕES

Melhores resultados na micropropagação de amoreira-preta cv. Tupy são obtidos na ausência de ácido bórico e sulfato de zinco hidratado em meio de cultura DSD1. Com $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido bórico adicionado ao meio, verifica-se maior número de folhas e comprimento das raízes do porta-enxerto de videira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, L.E.C.; RASEIRA, M.C.B. **Aspectos Técnicos da Cultura da Amora-Preta**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. p.13. Embrapa Clima Temperado. Documentos, 122).

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA/ CNPH, 1998. 1:87-132.

CHALFUN, N. N. J; PASQUAL, M.; HOFFMANN, A. **Fruticultura comercial: frutíferas de clima temperado**. Lavras: UFLA-FAEPE, 1998, 7:304p.

FERREIRA, D.F. 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. 2000. p. 255-8.

FAQUIN, V. **Nutrição mineral de plantas**. Lavras, MG. UFLA/FAEPE, 2001. 182p. Lavras, MG.

FRANCO, J.C.C. **Micropropagação do crisântemo: ácido bórico e sulfato de zinco**. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2004. 21p.

ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D.; RODRIGUES, S.D. Interações entre auxinas e boro no enraizamento de estacas de camélia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v.4, n.2, p.107-112, 1992.

PASQUAL, M. **Meios de cultura**. Lavras, UFLA/FAEPE, 2001. 74p.

PEIXOTO, P.H.P.; PASQUAL, M. Influência da origem dos explantes na multiplicação e no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de videira. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.20, n.3, p.293-300, 1996.

RIBEIRO, L. de S. **Adequação de meio de cultura para o crescimento *in vitro* de orquídeas do gênero *Cattleya***. 2005. Tese de doutorado (Fisiologia Vegetal), Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG. 2005.

SILVA, A.L.; DOAZAN, J. P. Une méthode d'irradiation aux rayons gamma appliquée à des porte-greffes de Vigne *in vitro*. **Journal Int. Science of Vigne et Vin**, v. 29, p. 1-9, 1995.

PALAVRAS-CHAVE: *Rubus* sp.; *Vitis* spp., meio de cultura DSD1, boro, zinco.