

Meios de cultura e BAP na micropropagação de amoreira-preta cv. Brazos.

Rodrigues, Joyce Dória¹; Villa, Fabíola²; Pasqual, Moacir³; Assis, Franscinely Aparecida¹; Ângelo Albérico Alvarenga⁴; Vilela, Ximena Maira de Souza¹.

¹Aluna de graduação em Agronomia, UFLA, Lavras, MG, e-mail: joycerodrigues01@yahoo.com.br;

²Doutoranda em Fitotecnia (DAG), UFLA, Lavras, MG, e-mail: fvilla2003@libero.it; ³Professor Adjunto do Departamento de Agricultura (DAG), UFLA, Campus Universitário, Lavras, MG, CEP.: 37200-000, fone: (35) 38291323; e-mail: mpasqual@ufla.br; ⁴Pesquisador da EPAMIG, Lavras, MG, CEP.: 37200-000, fone: (35) 38291304; e-mail: angelo@epamig.br.

INTRODUÇÃO

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de tecidos de plantas fornecem substâncias essenciais para o crescimento e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (Caldas et al., 1998). No entanto, as exigências nutricionais para o crescimento ótimo de um tecido *in vitro* podem variar com a espécie e, mesmo na própria planta, explantes de diferentes partes podem requerer meios distintos para o crescimento satisfatório.

Um dos objetivos da micropropagação é a maximização da multiplicação de gemas. Muita atenção para sua obtenção tem sido dada com a manipulação de substâncias de crescimento no meio de cultura. O crescimento e a morfogênese *in vitro* são fatores regulados pela interação e balanço dos reguladores existentes no meio, principalmente auxinas e citocininas (George & Sherrington, 1984). Dentre os reguladores de crescimento comumente usados no cultivo *in vitro* da amoreira-preta estão a 6-benzilaminopurina (BAP) e o ácido indol butírico (AIB).

O presente trabalho objetivou avaliar o efeito de 6-benzilaminopurina (BAP) e de meios de cultura na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta cv. Brazos.

MATERIAL E MÉTODOS

Segmentos nodais de amoreira-preta (*Rubus* spp.), cultivar Brazos, com cerca de 2 cm, foram excisados de brotações preestabelecidas *in vitro*. Os explantes foram inoculados em tubo de ensaio contendo 15 mL de quatro diferentes meios de cultura (MS, 1962; Knudson, 1946; Roubelakis, 1991), combinados com cinco concentrações de BAP (0, 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 mg L⁻¹). O pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem e solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar. Posteriormente foram transferidos para sala de crescimento a 27±1°C, irradiância de 35 µmol.m⁻².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 três explantes. As variáveis analisadas foram número de folhas, número de brotos, comprimento da parte aérea, comprimento das raízes, número de raízes, peso da matéria fresca da parte aérea e de calos. Os resultados foram submetidos à análise de variância (SISVAR, Ferreira, 2000), sendo utilizado regressão polinomial para concentrações de BAP e teste de médias para tipos de meio de cultivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos neste trabalho revelaram que houve interação significativa para todos os parâmetros estudados, exceto para número de brotos e peso fresco da parte aérea (Tabela 1). Nas Tabelas 2 e 3 observa-se interação para os diferentes meios de cultivo empregados na micropropagação de amoreira-preta cv. Brazos.

Tabela 1. Análise de variância para número de folhas (NF), número de brotos (NB), peso fresco da parte aérea (PFPA), peso fresco de calos (PFCA), comprimento da parte aérea (CPA), número de raízes (NR) e comprimento de raízes (CR) de amoreira-preta cv. Brazos micropropagada. UFLA, Lavras, MG, 2007.

| | GL | QM | | | | | | |
|----------|----|--------|-----------------------|-----------------------|--------|--------|-----------------------|-----------------------|
| | | NF | NB | PFPA | PFCA | CPA | NR | CR |
| BAP | 4 | 2,839* | 11,187* | 0,011 ^{n.s.} | 0,053* | 1,161* | 0,149 ^{n.s.} | 0,063 ^{n.s.} |
| MC | 2 | 1,331* | 16,432* | 0,468* | 0,106* | 5,015* | 1,849* | 2,251* |
| BAP x MC | 8 | 0,891* | 0,456 ^{n.s.} | 0,004 ^{n.s.} | 0,022* | 4,328* | 0,229* | 0,300* |
| Resíduo | 42 | 0,251 | 0,347 | 0,005 | 0,002* | 0,422 | 0,066 | 0,066 |
| CV (%) | | 13,58 | 22,63 | 7,97 | 5,12 | 23,37 | 18,51 | 18,43 |

* Significativo a 5% de probabilidade, n.s. = não-significativo, MC = meios de cultura.

Tabela 2. Diferentes meios de cultura e concentrações de BAP na micropropagação de amoreira-preta cv. Brazos. UFLA, Lavras, MG, 2007.

| Tipos de meio de cultura | | BAP (mg L ⁻¹) | | | | |
|--------------------------|------------|---------------------------|--------|--------|--------|--------|
| | | 0 | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 4,0 |
| NF | Knudson | --- | --- | --- | 4,63 a | 2,48 b |
| | MS | --- | --- | --- | 4,37 a | 3,93 a |
| | Roubelakis | --- | --- | --- | 3,69 b | 3,39 a |
| PFCA | Knudson | --- | 0,76 b | 0,80 b | 0,77 c | 0,71 c |
| | MS | --- | 0,78 b | 0,85 b | 0,97 a | 1,03 a |
| | Roubelakis | --- | 0,88 a | 0,94 a | 0,88 b | 0,93 b |
| CPA | Knudson | 4,38 a | 1,74 b | 1,28 b | 2,00 b | 1,71 b |
| | MS | 1,88 c | 3,67 a | 3,79 a | 3,29 a | 3,31 a |
| | Roubelakis | 3,31 b | 3,38 a | 3,38 a | 2,50 b | 2,11 b |
| NR | Knudson | --- | 0,93 b | 0,71 b | 0,97 b | 0,93 b |
| | MS | --- | 1,68 a | 1,52 a | 1,66 a | 1,55 a |
| | Roubelakis | --- | 1,66 a | 1,52 a | 1,47 a | 1,56 a |
| CR | Knudson | --- | 0,92 b | 0,71 b | 0,97 b | 0,84 b |
| | MS | --- | 1,60 a | 1,62 a | 1,58 a | 1,57 a |
| | Roubelakis | --- | 1,80 a | 1,78 a | 1,65 a | 1,45 a |

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Diferentes meios de cultura para número de brotos (NB) e peso fresco da parte aérea (PFPA) de amoreira-preta cv. Brazos micropropagado. UFLA, Lavras, MG, 2007.

| Tipos de meios de cultura | NB | PFPA |
|---------------------------|--------|--------|
| Knudson | 1,93 b | 0,76 b |
| MS | 3,63 a | 1,04 a |
| Roubelakis | 2,24 b | 0,79 b |

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si a 5% de probabilidade.

O número de folhas foi estimulado pelo tipo de meios de cultura e 2 e 4 mg L⁻¹ de BAP, observando a interação entre esses dois fatores. Maior número de folhas foi observado em meio Knudson e MS adicionados de 2 mg L⁻¹ de BAP e MS e Roubelakis adicionados de 4 mg L⁻¹ de BAP. Verificou-se menor número de folhas em meio Knudson adicionado de 4 mg L⁻¹ de BAP. Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira (1994), trabalhando com crisântemo cultivado em meio MS, que observou queda no número com aumento das concentrações de BAP. Isto pode ser atribuído ao fato do BAP estimular a

formação de maior número de brotos, porém, de tamanho reduzido, apresentando menor número de segmentos nodais e folhas.

Através da análise de variância observou-se que, o número de brotos foi estimulado pelo tipo de meio de cultivo e pela concentração de BAP separadamente (Tabelas 1 e 3). Em meio de cultivo MS verificou-se maior número de brotos. Em trabalho com café 'Catuaí', objetivando determinar o efeito de diferentes proporções dos sais inorgânicos e componentes orgânicos do meio MS, Forni & Pasqual (1996) observaram que o aumento dos níveis de MS proporcionou maior número de brotos, de folhas e peso da matéria seca. Com incremento nas concentrações de BAP, foi observado aumento de forma quadrática no número de brotos de amoreira-preta até 2 mg L⁻¹ de BAP. Após essa concentração, verificou-se um decréscimo nesses valores, devido ao fato da citocinina em altas concentrações ser tóxica às culturas *in vitro*.

Maior comprimento da parte aérea foi observada nos diversos meios de cultivo associados as cinco concentrações do regulador estudado. Verificou-se maior alongamento dos brotos em meio Knudson, na ausência de BAP (Tabela 1). Menores alturas de brotações de amoreira-preta foram observadas em meio Knudson adicionado de altas concentrações da citocinina. Estes resultados concordam com a maioria dos autores que afirmam que este regulador de crescimento não é responsável pelo alongamento de brotos (Paiva et al., 1997). Leshem et al. (1988) mencionam ser tóxico o uso da citocinina em níveis elevados, caracterizando-se principalmente, pelo enrosetamento e falta de alongamento das culturas.

Verificou-se interação significativa para número e comprimento das raízes em relação ao meio de cultivo e as concentrações de 0,5; 1; 2 e 4 mg L⁻¹ de BAP. Melhores resultados para essas variáveis foram observados com a utilização do meio Roubelakis e MS associados a 0,5-2 mg L⁻¹ de BAP. O meio MS vem sendo utilizado com sucesso na micropropagação de amoreira-preta (Erig et al., 2002)). O crescimento de plantas, órgãos, tecidos e células *in vitro* depende do desenvolvimento de meios de cultura otimizados para a perfeita interação de componentes essenciais como fontes de carbono e nutrientes minerais. Os fatores que limitam esse crescimento *in vitro* são similares àqueles que limitam *in vivo* (Amaral, 2003).

O peso da matéria fresca da parte aérea foi estimulado pela utilização do meio de cultura. Melhores resultados foram obtidos em meio MS. Com um aumento significativo do peso da matéria fresca no decorrer do tempo, o potencial osmótico do meio foi maior. Conseqüentemente, as plantas nesse meio conseguiram absorver mais água para os seus tecidos e, portanto, tiveram maior peso da matéria fresca.

O peso fresco de calos na base dos explantes de amoreira-preta foi influenciado pelos tipos de meio empregados e concentrações da citocinina. Maior peso de calos foi observado em meio MS associado a 2-4 mg L⁻¹ de BAP e em meio Roubelakis associado a 0,5-1 mg L⁻¹. A formação de calos não é desejada na micropropagação da amoreira-preta. Provavelmente os meios descritos acima não sejam adequados para multiplicação *in vitro* de explantes da cultivar 'Brazos'. Em contrapartida, no meio de cultura Knudson houve menor formação de calos na base dos explantes e conseqüentemente, melhor desempenho dessas brotações e melhor enraizamento *in vitro*.

CONCLUSÕES

A utilização de 2 mg L⁻¹ de BAP promove maior número de brotos de amoreira-preta cultivar Brazos. Melhores resultados para peso fresco da parte aérea foram observados em meio MS. Maior número e comprimento de raízes foram verificados nos meios MS e Roubelakis adicionados de 0,5 mg L⁻¹ de BAP. Menor formação de calos ocorreu em meio de cultura Knudson.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, A.F.C. Comportamento *in vitro* de explantes de matrizes de cenoura (*Daucus carota* L.) tratadas com variáveis níveis de potássio. Piracicaba, 2003. 103p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. **Meios nutritivos**. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, p.87-132, 1998.

ERIG, A.C.; DE ROSSI, A.; FORTES, G.R.L. 6-Benzilaminopurina e ácido indolbutírico na multiplicação *in vitro* da amoreira-preta (*Rubus idaeus* L.) cv. Tupy. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.5, p.765-770, 2002.

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. p.255-258, 2000.

FORNI, R.C.; PASQUAL, M. Influência da citocinina BAP e concentrações dos componentes do meio "MS" na micropropagação do café 'Catuaí'. **Ciência e Agrotecnologia**, v.20, n.4, p.468-474, 1996.

GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics, 709p, 1984.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, v.14, p.214-217, 1946.

LESHEM, B.; WERKER, E.; SHALEV, D.P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany**, London, v.62, n.3, p.271-276, 1988.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

OLIVEIRA, P.D. **Propagação *in vitro* de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzlev.) cv. Orange Reagen**. Lavras: ESAL, 1994, 116p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia).

PAIVA, P.D.O de; ROVERI JOSÉ, S.C.B.; PASQUAL, M.; PAIVA, R. Efeito do ácido naftaleno acético e GA₃ na micropropagação de violeta. **Revista Ceres**, Viçosa, v.44, n.254, p.392-398, 1997.

ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A.; ZIVANOTIC, S. B. A new culture medium for *in vitro* rhizogenesis of grapevine (*Vitis* spp.) genotypes. **HortScience**, Alexandria, v.26, n.12, p.1551-1553, 1991.