

Meios de cultura e reguladores de crescimento na micropropagação de amoreira-preta.

Ribeiro, Márcia de Nazaré Oliveira¹; Villa, Fabíola¹; Pasqual, Moacir²; Vilela, Ximena Maira de Souza³; Santos, Jean Carlos de Souza⁴; Silva, Andrieli Leão Pereira da⁴; Souza, Aline das Graças⁵.

¹Doutoranda em Fitotecnia (DAG), UFLA, Lavras, MG, e-mail: mribeiro@ufla.br; ²Professor Adjunto do Departamento de Agricultura (DAG), UFLA, Lavras, MG, e-mail: mpasqual@ufla.br; ³Aluna de graduação em Agronomia, UFLA, Lavras, MG; ⁴Aluna de graduação em Agronomia, Cesur, Rondonópolis, MT, e-mail: andrielileao@hotmail.com; ⁵Bióloga, UNILAVRAS, Lavras, MG.

INTRODUÇÃO

Um dos fatores importantes para o sucesso do sistema de micropropagação é a conjugação de fatores nutritivos, ambientais e endógenos. No caso específico dos fatores ambientais, procura-se estudar os componentes do meio de cultura, como sais minerais, vitaminas, reguladores de crescimento, entre outros. Neste caso, diversas formulações de meios básicos têm sido utilizadas na micropropagação de frutíferas. Embora não exista uma formulação padrão, o meio MS, suas modificações e diluições tem apresentado resultados satisfatórios para diversas espécies (George & Sherrington, 1984).

Entretanto, com espécies lenhosas, o meio MS não se mostrou satisfatório em alguns casos, observando-se que composições mais diluídas em macronutrientes tiveram melhor desempenho. Outras formulações como, por exemplo, o meio NN e Knudson, têm sido descritas e utilizadas como alternativas ao MS.

O crescimento e morfogênese *in vitro* são fatores regulados pela interação e balanço dos fitoreguladores existentes no meio de cultura, principalmente auxinas e citocininas (George & Sherrington, 1984). As citocininas são utilizadas para quebrar a dominância apical dos brotos e aumentar a taxa de multiplicação. Deste modo, ocorre grande número de brotações por meio do crescimento de meristemas laterais (Hu & Wang, 1983).

As auxinas, apesar de não promoverem a proliferação de brotações axilares, podem incrementar o crescimento da cultura (Hu & Wang, 1983). Uma das possíveis ações da auxina no meio seria a anulação do efeito supressivo das altas concentrações de citocinina sobre a alongação das brotações axilares, restaurando o crescimento normal das mesmas. Dentre os reguladores de crescimento comumente usadas no cultivo *in vitro* da amoreira-preta estão a 6-benzilaminopurina (BAP) e o ácido indolbutírico (AIB) (Donnelly et al., 1980).

O presente trabalho objetivou avaliar o efeito das concentrações de ácido indolbutírico (AIB) e 6-benzilaminopurina (BAP) sob diversos meios de cultura na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta cultivares Tupy e Brazos.

MATERIAL E MÉTODOS

Segmentos nodais de amoreira-preta (*Rubus* sp.), cultivares Tupy e Brazos, com cerca de 2 cm, foram excisados de propágulos pré estabelecidos *in vitro*. Os explantes foram inoculados em tubo de ensaio contendo 15 mL de diversos meios de cultivo. O primeiro experimento constou da cv. 'Brazos' inoculada em 3 diferentes meios: 1) MS (Murashige & Skoog, 1962), 2) Knudson (1946) e 3) Roubelakis (Roubelakis-Angelakis & Zivanovitch, 1991), combinados com cinco concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L⁻¹). O segundo experimento constou da cv. 'Tupy' inoculada em 4 meios de cultivo: 1) MS (Murashige & Skoog, 1962), 2) Knudson (1946), 3) Roubelakis (Roubelakis-Angelakis & Zivanovitch, 1991) e 4) NN (Nitsch & Nitsch, 1969), combinados com cinco concentrações de AIB (0; 0,125; 0,25; 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹). O pH dos meios foram ajustados para 5,8 antes da autoclavagem e solidificados 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 e fotoperíodo de 16 horas, permanecendo nestas condições por 70 dias. O delineamento experimental foi inteiramente

casualizado com 4 repetições constituídas e 12 plantas por tratamento. As variáveis analisadas foram número de folhas e de raízes, comprimento da parte aérea e das raízes, peso da matéria fresca da parte aérea, número de brotos (cv. 'Brazos') e peso fresco de calos (cv. 'Brazos'). Os resultados foram submetidos à análise de variância por meio do software Sisvar (Ferreira, 2000), sendo utilizado regressão polinomial para concentrações de BAP e AIB e teste de Scott-Knott para os tipos de meios de cultivo.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Verificou-se interação significativa para as variáveis analisadas em todas as concentrações de AIB e meios de cultura empregados no estudo com a cv. 'Tupy'. Para a cv. 'Brazos', interação significativa deu-se somente para número de folhas, de raízes, peso fresco de calos, comprimento da parte aérea e das raízes. Nas Tabelas 1, 2, 3 e 4, observam-se os dados obtidos na avaliação feita 70 dias após a inoculação, relacionando-se o comprimento da parte aérea e das raízes de amoreira-preta cvs. Tupy e Brazos com os respectivos meios de cultura e concentrações dos fitormônios. Para número de folhas de 'Tupy' o meio de cultivo que se destacou foi o Knudson, com a adição de baixas concentrações do regulador (0,125 - 0,5 mg.L⁻¹), seguido do MS. O melhor meio para se obter maior número de folhas dessa cultivar com concentrações de 0,5 a 1,0 mg.L⁻¹ de AIB foi o meio de cultivo MS. Para a cv. 'Brazos', maior número de folhas foi verificado em meio MS e Knudson adicionado de 2,0 mg.L⁻¹ de BAP.

Na ausência da auxina os meios não de cultivo não diferiram estatisticamente para a cv. 'Tupy'; porém os que tiveram resultados levemente superiores foram o MS, Knudson e Roubelakis. Possivelmente, a concentração de nutrientes dos meios sem a adição do regulador não interfere no aumento do número de folhas de amoreira-preta.

Maior comprimento da parte aérea da cv. 'Tupy' foi verificado em meio NN adicionado ou não de AIB (Tabela 1), sugerindo que a concentração desse meio em relação aos outros testados é ideal para o crescimento e desenvolvimento da parte aérea dessa cultivar. Na ausência da citocinina a altura dos propágulos de 'Brazos' mostrou-se superior quando inoculadas em Knudson. O efeito da composição dos meios sobre o desenvolvimento de frutíferas já foi constatado por diversos autores (Nali et al., 2005).

TABELA 1. Comprimento da parte aérea de amoreira-preta cv. Tupy cultivada em diferentes meios de cultura, adicionados de concentrações de AIB. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Meios de cultura	AIB (mg.L ⁻¹)				
	0	0,125	0,25	0,5	1,0
MS	1,34 b	1,47 b	1,38 b	1,47 b	1,72 a
Knudson	1,31 b	1,05 c	1,16 c	1,36 b	1,49 b
Roubelakis	1,07 c	1,20 c	1,45 b	1,61 b	1,56 b
NN	1,89 a	1,84 a	1,72 a	1,90 a	1,90 a

Médias seguidas por letras minúsculas distintas diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Os resultados aqui apresentados para as duas cultivares corroboram Erig et al. (2002), que afirmaram que, nas concentrações de 0 e 1µM de AIB, o aumento nos níveis de BAP resultou na diminuição do comprimento médio das brotações *in vitro* da cv. 'Tupy'. Elevados níveis de citocinina no meio de cultura podem ser tóxicos à cultura, caracterizada pelo demasiado enroscamento e falta de alongamento das culturas (Leshem et al., 1988).

Foi observada a formação do sistema radicular de plantas em todos os meios empregados, porém melhores resultados de 'Tupy', na ausência de AIB deu-se nos meios Knudson, NN e MS. Resultados semelhantes foram observados com a adição de 0,5 mg.L⁻¹ do regulador. Com outras concentrações do fitohormônio, o meio de cultivo que se destacou foi o MS. Mesmo na ausência de AIB observou-se que os meios de cultura tiveram papel importante no crescimento do sistema radicular, sendo que os meios MS, Knudson e NN não diferem estatisticamente (Tabela 2). Maior comprimento de raízes de 'Brazos' foi verificado em meio Roubelakis adicionado de 0,5 mg.L⁻¹ de BAP.

TABELA 2. Comprimento de raízes de amoreira-preta cv. Tupy cultivada em diferentes meios de cultura, adicionados de concentrações de AIB. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Meios de cultura	AIB (mg.L ⁻¹)				
	0	0,125	0,25	0,5	1,0
MS	1,28 a	0,86 b	1,51 a	1,47 a	1,33 a
Knudson	1,61a	1,49 a	0,78 b	1,28 a	1,31 a
Roubelakis	0,86 b	1,33 a	0,86 b	0,84 b	0,78 b
NN	1,27 a	1,18 a	1,36 a	1,43 a	1,43 a

Médias seguidas por letras minúsculas distintas diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

TABELA 3. Comprimento da parte aérea de amoreira-preta cv. Brazos cultivada em diferentes meios de cultura, adicionados de concentrações de BAP. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Meios de cultura	BAP (mg.L ⁻¹)				
	0	0,5	1,0	2,0	4,0
MS	---	---	---	4,37 a	3,93 a
Knudson	---	---	---	4,63 a	2,48 b
Roubelakis	---	---	---	3,69 b	3,39 a

Médias seguidas por letras minúsculas distintas diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

TABELA 4. Comprimento de raízes de amoreira-preta cv. Brazos cultivada em diferentes meios de cultura, adicionados de concentrações de BAP. UFLA, Lavras, MG, 2007.

Meios de cultura	BAP (mg.L ⁻¹)				
	0	0,5	1,0	2,0	4,0
MS	---	1,60 a	1,62 a	1,58 a	1,57 a
Knudson	---	0,92 b	0,71 b	0,97 b	0,84 b
Roubelakis	---	1,80 a	1,78 a	1,65 a	1,45 a

Médias seguidas por letras minúsculas distintas diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Pasqual et al. (1995) obtiveram melhor enraizamento adicionando 0,1 mg.L⁻¹ de ácido indolbutírico ao meio MS, promovendo a formação de mudas bem desenvolvidas. Kiss & Zakyto (1978) também obtiveram maior enraizamento de brotações de um híbrido entre amoreira-preta e framboeseira, utilizando 1,0 mg.L⁻¹ de AIB. Isto, provavelmente, se deve ao fato de se utilizarem diferentes genótipos, os quais respondem melhor à adição de auxina ao meio de cultivo. Provavelmente, a cultivar Tupy apresenta quantidade de auxina endógena suficiente para estimular o enraizamento, não respondendo, portanto, à adição de auxina exógena (Salisbury, 1991).

Diversas espécies enraízam com níveis muito reduzidos de auxina ou em meio básico sem substâncias de crescimento (Anderson, 1984). Nesse caso, as partes aéreas em rápido crescimento são fontes de intensa produção de auxina, a qual é translocada para a base, estimulando a rizogênese (Grattapaglia et al, 1987).

Para o peso fresco da parte aérea, os meios utilizados na micropropagação de amoreira-preta não diferiram entre si estatisticamente com a adição de 0,125 mg.L⁻¹ de AIB. Na ausência desse regulador, os meios que se destacaram foram o NN, MS e Knudson. Com a adição de 0,25 e 0,5 mg.L⁻¹ de AIB, melhores resultados para essa variável foram obtidos em meios MS, NN e Roubelakis. Piores resultados para essa variável foram obtidos em meio Knudson com 1,0 mg.L⁻¹ de AIB. Esse meio, por ser mais diluído que os meios empregados na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta, fornece menor quantidade de nutrientes ao desenvolvimento dos explantes, mesmo com a adição do fitoregulador.

CONCLUSÕES

As cultivares de amoreira-preta apresentam diferentes potencias de multiplicação.

Maior número de brotos da cv. 'Brazos' deu-se em meio MS. Comprimento e número de raízes dessa cultivar foram estimulados em meio Roubelakis e MS adicionados de 0,5 mg.L⁻¹ de BAP. Menor formação de calos na base dos explantes de 'Brazos' deu-se em meio Knudson com 4,0 mg.L⁻¹ do fitoregulador.

Maior comprimento da parte aérea e número de raízes da cv. 'Tupy' foram obtidos nos meios NN e MS, com a adição de 0,5-1,0 mg.L⁻¹ de AIB. Para o sistema radicular, os meios que se destacaram foram o Knudson, MS e NN, sem a auxina. Com 1,0 mg.L⁻¹ de AIB adicionado em meio Roubelakis obteve-se maior peso fresco da parte aérea.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, W. C. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.109, p.343-347, 1984.

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. 2000. p.255-258.

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

GRATTAPAGLIA, D.; ASSIS, T.F.; CALDAS, L.S. Efeito residual de BAP e NAA na multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 2., 1987, Brasília, DF. **Resumos ...** Brasília, 1987. p.10.

KISS, F.; ZAKYTO, J. Vegetative propagation of *Rubus* species *in vitro*. **Botanikal Koslemenyek**, Budapest, v.65, p. 65-69, 1978.

LESHEN, B., WERKER, E., SHALEV, D. P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany**, London, v.62, 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.

NALI, L.R.; ALMEIDA, W.A.B.; MELO, N.F. Propagação *in vitro* de videiras. **Magistra**, Cruz das Almas, v.17, n.2, p.96-100, 2005.

NITSCH, J.P.; NITSCH, C. Haploids plants from pollen grains. **Science**, Washington, v.163, p.85-87, 1969.

PASQUAL, M.; RAMOS, J.D.; CHALFUM, N.N.J.; ANTUNES, L.E.C.; CARVALHO, G.R. Effects of temperature and sacarose on *in vitro* multiplication of sprouts of temperature climate fruit trees. In: ENCUENTRO LATINOAMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 2., 1995, Puerto Iguazu, Argentina.

ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A.; ZIVANOVITC, 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.

SALISBURY, F. B.; ROOS, C.W. **Plant Physiology**. California: Wadsworth,. 1991. cap.17, p.357-378.

PALAVRAS-CHAVE: *Rubus* sp., BAP, AIB.