

Meios de cultura, cinetina e GA₃ na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta cv. Cherokee.

Soares, Joyce Dória Rodrigues¹; Villa, Fabíola²; Pasqual, Moacir³; Rodrigues, Filipe Almendagna¹; Assis, Franscinely Aparecida¹; Vilela, Ximena Maira de Souza¹; Souza, Aline das Graças⁴.

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, DAG, UFLA, Lavras, MG, e-mail: mpasqual@ufla.br; ⁴Bióloga, UNILAVRAS, MG, e-mail: alinedasgracas@yahoo.com.br.

INTRODUÇÃO

A propagação da amoreira-preta dá-se principalmente por meio de estacas de raiz, rebentos e hastes novas. 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). Esses também são produzidos artificialmente, sendo denominados reguladores de crescimento, dentre os quais podemos 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. Apesar da utilização de citocinina ser essencial à multiplicação da parte aérea, o seu excesso é tóxico e caracteriza-se, principalmente, por excessivo número de brotos, redução no tamanho das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento exagerado dos caules e vitrificação (aspecto vitrificado das folhas) (Leshen et al., 1998). O BAP 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 espécie empregada e a interação existente com outros reguladores de crescimento.

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 e 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 (Brum, 2001).

O presente 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, com cerca de 2 cm e 2 gemas axilares, foram excisados de plantas pré-estabelecidas *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 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 quatro tubos contendo um explante cada. As variáveis analisadas no primeiro experimento foram número de folhas, número de brotos, comprimento e peso da parte aérea, presença de raízes, peso fresco de calos 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 utilizado 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 de meio e concentrações de cinetina; maior número de folhas foi verificada em meio B5, enquanto que, para as 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 no número de folhas, peso fresco e comprimento da parte aérea das plantas de amoreira-preta (Tabela 1).

Tabela 1. Número de folhas, comprimento e peso da matéria fresca de plantas de amoreira-preta 'Cherokee' em diferentes tipos de meio. UFLA, Lavras, MG.

Meio	Número de folhas	Peso da matéria fresca da parte aérea (g)	Comprimento da parte aérea (cm)
B5	8,71 a	0,76 a	2,02 a
½ Knudson	7,66 b	0,75 b	1,99 a
Knudson	7,19 b	0,74 b	2,04 a
White	4,42 c	0,73 c	1,61 b

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

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 meios estudados, 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 mg L⁻¹ do regulador de crescimento. A multiplicação de brotos ocorreu apenas nos tratamentos que continham cinetina associada aos meios B5 e Knudson. Houve pouca ou nenhuma formação do sistema radicular dos explantes inoculados no meio White.

Fráguas (2004) verificou a formação de raízes em explantes de *Ficus carica* L., inoculados em meio WPM, na ausência de cinetina. Maior número de brotos (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. É possível que essa redução no tamanho dos brotos seja devido 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 a concentração do mesmo em relação aos outros meios testados é ideal para o crescimento e desenvolvimento da parte aérea de plantas de amoreira-preta cv. Cherokee. Para Nali et al. (2005), um dos fatores que interfere no desenvolvimento de uma plântula *in vitro* é o meio de cultivo utilizado.

A formação de calos ocorreu apenas em meio B5 nas diferentes concentrações de cinetina. Diferentes resultados foram obtidos por Jordan & 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 presente no meio B5 associada a 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 aérea das plantas foi menor em função de maiores concentrações de cinetina. É possível que essa redução no tamanho dos brotos seja devido ao efeito tóxico causado pelo excesso de citocinina nos explantes.

Leshem et al. (1998) citam que apesar da utilização de citocinina ser necessária à multiplicação dos brotos, o seu excesso é tóxico e algumas características observadas são a falta de alongamento das culturas, redução no tamanho das folhas e encurtamento dos entrenós. Embora o número de folhas, número de brotos e peso da matéria fresca não foram 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 nos tratamentos que continham o meio White. Na ausência de cinetina houve crescimento da parte aérea. O sistema radicular foi formado apenas nos tratamentos que não continham cinetina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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 Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPq, 1998. v.1, p.87-132.

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.225-258.

FRÁGUAS, C.B.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A.R. **Multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L.: efeito da cinetina e do ácido giberélico.** Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v.28, n.1, p.49-55, 2004.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, New York, v.50, p.151-158, 1968.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: part 1 – The Technology**, 2 ed. Edington: Exegetics Limited, 1996. 1574 p.

HU, C.Y.; WANG, P.J. **Meristem, shoot tip and bud culture.** In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (Ed.). Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding. New York: Macmillan, 1983. p.117-227.

JORDAN, M.; ITURRIAGA, L. Formación de raíces en entrenudos de higuera (*Ficus carica* L.) cv. Adriatic cultivados *in vitro*. **Ciencia Investigaciones Agrícolas**, Buenos Aires, v.7, n.2, p.149-151, 1980.

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

LESHEN, 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, Sept. 1998.

MISHRA, M.; SAXENA, R. P.; PATHAK, R. K.; SRIVASTAVA, A. K. Studies on micropropagation of aonla (*Emblica officinalis* Gaertn). **Progressive Horticulture**, Chambattia, v.31, n.3/4, p.116-122, Dec. 1999.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.3, p.473-497, 1962.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Auxins: Growth and Tropisms. In: _____. **Plant Physiology**. California: The Benjamin/ Cummings Publishing Company, 1991. p.398-424.

WHITE, P.R. **A handbook of plant tissue culture.** Lancaster : Jacques Cotteil Press, 1963. 345p.

PALAVRAS-CHAVE : *Rubus* spp. ; reguladores de crescimento, MS, Knudson, White.