

COMUNICAÇÃO

CLORETO DE SÓDIO E ÁCIDO NAFTALENOACÉTICO NO ENRAIZAMENTO DE MICROESTACAS DE AMOREIRA-PRETA cv. BRAZOS *in vitro*

Sodium chloride and naphthaleneacetic acid on *in vitro* rooting of blackberry cv. Brazos

Fabiola Villa¹, Moacir Pasqual², Leila Aparecida Salles Pio³, Grazielle Sales Teodoro⁴

RESUMO

A micropropagação de amoreira-preta (*Rubus* sp.) é utilizada, principalmente, para a obtenção de plantas livres de vírus e num curto espaço de tempo. No presente trabalho foram testadas diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) e do ácido naftalenoacético (ANA) adicionados ao meio de cultura *in vitro* de amoreira-preta. O meio foi constituído de sais MS, acrescidos de 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar, e o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C e 1 atm por 20 minutos. Os tratamentos consistiram em concentrações de NaCl (0; 25; 50; 75 e 100 mg L⁻¹) e de ANA (0; 0,1; 0,5; 1,0 e 1,5 mg L⁻¹), em todas as combinações possíveis e da amoreira-preta cv. Brazos. Segmentos nodais, oriundos de plântulas preestabelecidas *in vitro* foram excisados e introduzidos em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio de cultura. Posteriormente, os tubos foram transferidos para sala de crescimento a 25 ± 2°C, irradiância de 35 mmol.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, utilizando-se 4 repetições com 12 plântulas cada. O experimento foi avaliado após 70 dias de cultivo *in vitro*. O desenvolvimento *in vitro* da cv. Brazos foi favorecido nos tratamentos com 50-75 mg L⁻¹ de NaCl e 1,0-1,5 mg L⁻¹ de ANA, enquanto melhor resultado de enraizamento foi obtido no tratamento com 100 mg L⁻¹ de NaCl e 1,5 mg L⁻¹ de ANA.

Termos para indexação : Meio MS, micropropagação, NaCl, ANA, *Rubus* sp..

ABSTRACT

The blackberry (*Rubus* sp.) micropropagation is used, mainly for obtaining virus-free plants in short period of time. In the present work different concentrations of sodium chloride (NaCl) and naphthaleneacetic acid (NAA) were tested added to *in vitro* culture medium of blackberry cv. Brazos. The culture medium consisted of MS salts, with 30 g L⁻¹ sucrose 6 g L⁻¹ agar and pH adjusted to 5.8 before the sterilization at 121°C and 1 atm for 20 minutes. The treatments consisted of NaCl (0; 25; 50; 75 and 100 mg L⁻¹) and NAA (0; 0.01; 0.5; 1.0 and 1.5 mg L⁻¹) concentrations, in all possible combinations. Nodal segments, originating from plants established *in vitro* were excised and introduced in tubes containing 15 mL of culture medium. After that, the tubes were transferred to growth room at 25 ± 2°C, irradiance of 35 mmol m⁻² s⁻¹ and photoperiod 16 hours. A completely randomized block design with four replicates and 12 plants per replicate was used. The experiment was evaluated after 70 days of *in vitro* cultivation. The *in vitro* development of the cv. Brazos was favored in the treatments with 50 to 75 mg L⁻¹ NaCl and 1.0 to 1.5 mg L⁻¹ NAA, while the best rooting results were obtained using 100 mg L⁻¹ NaCl and 1.5 mg L⁻¹ NAA.

Index terms: Culture medium MS, micropropagation, NaCl, NAA, *Rubus* sp., cv. Brazos.

(Recebido em 11 de janeiro de 2006 e aprovado em 2 de abril de 2008)

No Brasil, aproximadamente nove milhões de hectares são afetados pela presença de sais, cobrindo sete Estados. A maior área afetada está localizada no Estado da Bahia (44% do total), seguido pelo Estado do Ceará, com 25% da área total do País afetada pela salinidade (Gheyi & Fageira, 1997). Nestas áreas, o aumento da concentração de sais de sódio decorre da drenagem deficiente de áreas irrigadas e do uso de água de má qualidade na irrigação O

excesso desses sais no solo afeta suas propriedades físicas e químicas do solo, pois o Na⁺ aumenta a espessura da dupla camada iônica difusa, proporcionando a expansão das argilas e, conseqüentemente, reduzindo a porosidade e a permeabilidade (Fassbeider & Bornemuza, 1987).

A presença de excesso de sais de sódio no solo também provoca a redução generalizada do crescimento das plantas cultivadas com sérios prejuízos para a atividade

¹Engenheira Agrônoma, Doutora, Pós-Doutoranda em Fitotecnia – EPAMIG/Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – Bairro Vargedo – 37517-000 – Maria da Fé, MG – fvilla2003@libero.it

²Engenheiro Agrônomo, Doutor – Departamento de Agricultura/DAG – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – mpasqual@ufla.br.

³Engenheira Agrônoma, Pós-doutoranda em Fitotecnia – Departamento de Agricultura, Laboratório de Cultura de Tecidos – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG

⁴Mestre em Ecologia – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG

agrícola. A redução no crescimento é consequência de respostas fisiológicas, incluindo modificações no balanço de íons, potencial hídrico, nutrição mineral, fechamento estomático, eficiência fotossintética e alocação e utilização de carbono (Flower et al., 1986; Bethke & Drew, 1992).

A salinidade na rizosfera acarreta redução na permeabilidade das raízes para água, dando origem ao estresse hídrico. Em consequência, as plantas fecham os estômatos para reduzir as perdas de água por transpiração, o que constitui uma das causas do reduzido crescimento das espécies sob condições de estresse salino (Leary, 1971). Além desse fato, o NaCl afeta a síntese e a translocação para a parte aérea da planta de hormônios sintetizados nas raízes, indispensáveis para o metabolismo foliar (Prisco, 1980).

Atualmente, o Brasil está presente na lista dos países maiores produtores de amoreira-preta (*Rubus* sp.) (Strik et al., 2007). Contudo, o cultivo dessa espécie apresenta grandes possibilidades de expansão, em razão da utilização de novas fronteiras agrícolas, de variedades mais promissoras, de novas tecnologias, do aumento do poder aquisitivo da população, da possibilidade de produção em praticamente todo o ano e plantio irrigado onde ocorrem frequentes problemas decorrentes do acúmulo de sais no solo (Prisco, 1980). Apesar do aumento da área plantada no Sul do País, não há registro de estudos sobre o efeito do sódio (Na) e cloro (Cl) no comportamento de rosáceas e no seu crescimento, particularmente em condições *in vitro*.

As auxinas controlam processos distintos, tais como crescimento e alongação celular, sendo muito utilizadas na cultura de tecidos para promover entre outros, a suspensão de células ou órgãos, bem como para regular a morfogênese, especialmente associadas com citocininas (Grattapaglia & Machado, 1998). As auxinas sintéticas mais comumente usadas na micropropagação de amoreira-preta são a ANA (ácido naftaleno-acético) e o AIB (ácido indolbutírico) (Pasqual et al., 1991, 1997; Caldas et al., 1998).

Diversos trabalhos com solução nutritiva têm evidenciado o efeito negativo dos íons Na e Cl, que contribuem para a salinidade do solo, sobre processos fisiológicos importantes para o crescimento das plantas (Yahya, 1998; Cruz et al., 2006). Os efeitos desses íons estão relacionados ao efeito osmótico, o qual induz condição de estresse hídrico às plantas e ao efeito tóxico direto, principalmente sobre os sistemas enzimáticos e de membranas. O estresse salino, afetando explantes *in vitro* também tem sido estudado em frutíferas, como bananeira (Ulisses et al., 2000), abacaxizeiro (Piza al., 2003) e em mandioca (Lima et al., 1998).

Neste trabalho, objetivou-se estudar os efeitos do estresse salino associado ao ANA sobre o enraizamento *in vitro* de amoreira-preta cv. Brazos.

Segmentos nodais de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Brazos com 2,5 cm de comprimento, oriundos de brotações preestabelecidas *in vitro* foram excisados e introduzidos em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio de enraizamento. Esse meio foi constituído de sais MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar, e o pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 121°C e 1 atm por 20 minutos. Posteriormente, os tubos de ensaio contendo os explantes foram transferidos para sala de crescimento, onde as condições de cultivo foram mantidas a 25 ± 2°C, irradiância de 35 µmol.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas diárias.

Os tratamentos consistiram nas combinações de 0; 25; 50; 75 e 100 mg L⁻¹ de NaCl (na proporção de 5 vezes a concentração de Na e Cl do meio MS) e de 0; 0,1; 0,5; 1,0 e 1,5 mg L⁻¹ de ANA adicionadas ao meio de cultura MS, de modo que todas as combinações das concentrações foram testadas.

Ao final de 70 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliados número de folhas e de raízes por explante, comprimento da parte aérea, peso da matéria fresca e seca da parte aérea e peso fresco de calos. Os dados foram analisados por meio do software Sisvar (Ferreira, 2000), utilizando regressão polinomial para as variáveis NaCl e ANA. Foram utilizadas quatro repetições de doze tubos de ensaio, cada um com um ramo, num delineamento experimental casualizado.

Verificou-se interação significativa para o peso da matéria fresca da parte aérea, comprimento da parte aérea, peso fresco de calos e número de raízes. Não houve diferença significativa para número de folhas (Tabela 1).

Mesmo na presença do sal, a amoreira-preta desenvolveu-se, sendo que em 50 mg L⁻¹ de NaCl associado à 1 mg L⁻¹ de ANA, foi verificado maior comprimento da parte aérea (7,71 cm) (Figura 1).

Em goiabeiras, quando cultivadas em solos contendo 60 mg L⁻¹ de NaCl com 180 e 360 dias de estresse, verificaram-se reduções na altura de 10% e 80%, respectivamente, em relação ao controle (Patil et al., 1984). Desai & Singh (1980) verificaram também em goiabeiras cultivadas em solução nutritiva com 30 e 60 mg L⁻¹ de NaCl, reduções de 22% no comprimento das plantas.

Em goiabeiras, quando cultivadas em solos contendo 60 mg L⁻¹ de NaCl com 180 e 360 dias de estresse, verificaram-se reduções na altura de 10% e 80%, respectivamente, em relação ao controle (Patil et al., 1984). Desai & Singh (1980) verificaram também em goiabeiras cultivadas em solução nutritiva com 30 e 60 mg L⁻¹ de NaCl, reduções de 22% no comprimento das plantas.

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) de brotações *in vitro* de amoreira-preta. UFLA, Lavras, 2005.

Fontes de Variação	Quadrados Médios					
	GL	NF	CPA	NR	PFPA	PFCA
ANA	4	15, 1143*	18,1204*	0,4598*	0,00725*	0,0204*
NaCl	4	4,3008 ^{n.s.}	0,7499 ^{n.s.}	0,0272 ^{n.s.}	0,00254*	0,0005 ^{n.s.}
ANA x NaCl	16	3,4688 ^{n.s.}	2,2109*	0,0913*	0,00151*	0,0011*
Resíduo	75	2,5591	1,1449	0,047	0,00031	0,0003
CV (%)		15,55	16,72	12,08	2,22	2,41

* significativo a 5% de probabilidade.

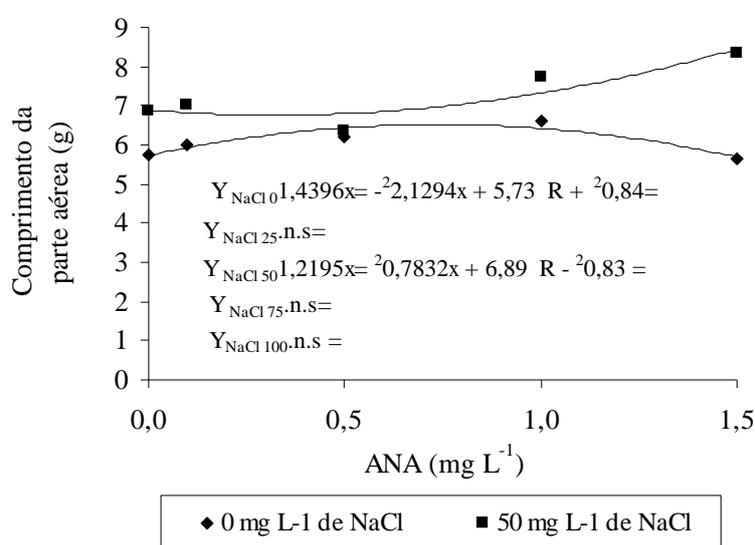


Figura 1 – Comprimento da parte aérea (cm) em brotações de amoreira-preta cv. Brazos, com diferentes concentrações de NaCl e ANA. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Mesmo na presença do cloreto de sódio, um aumento no peso fresco da parte aérea foi observado, com o incremento de concentrações de ANA. Maior peso fresco da parte aérea (0,86 g) foi encontrado quando se adicionou ao meio 1,5 mg L⁻¹ de ANA, associada a 50 mg L⁻¹ de NaCl (Figura 2). Essa concentração de ácido naftaleno acético é considerada elevada para amoreira-preta, pois vários autores citam a utilização de concentrações até 1,0 mg L⁻¹ desse fitormônio (Skirvin et al., 1981; Krikorian, 1991; Pasqual et al., 1991). Porém, associado ao cloreto de sódio, é ideal para proporcionar melhor desenvolvimento à planta.

Mesmo na ausência da auxina, verificou-se a formação de calos friáveis na base dos explantes. Com

incremento das doses de ANA, ocorreu aumento do peso fresco de calos (Figura 3). Maior peso fresco de calos (0,82 g) foi obtido com a adição de 1,5 mg L⁻¹ de ANA ao meio de cultivo, associada à 50 e 75 mg L⁻¹ do sal.

Em todos os tratamentos, foi verificada a presença de raízes. Isto comprova que, mesmo na presença do NaCl, a amoreira-preta conseguiu emitir raízes, evidenciando assim que o sistema radicular dessa frutífera mostrou-se tolerante ao estresse salino. Esse estresse não afetou o crescimento celular e a expansão das raízes dessa espécie corroborando Prisco (1980). Maior número de raízes (1,79) foi obtido na presença de 1,5 mg L⁻¹ de ANA e 100 mg L⁻¹ de NaCl (Figura 4).

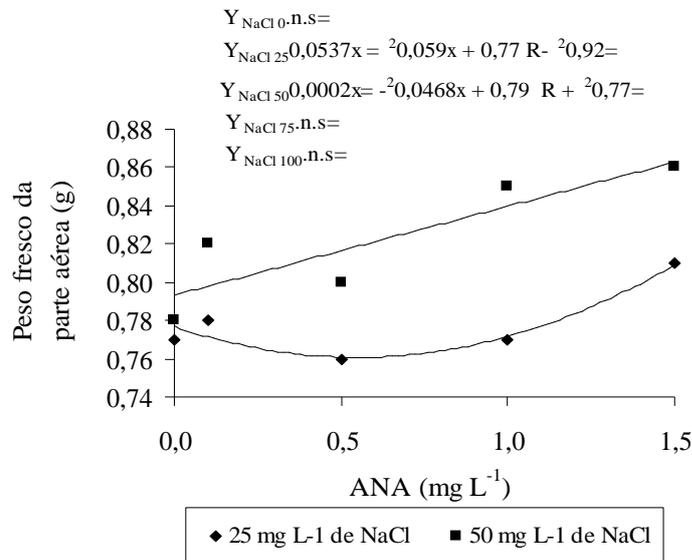


Figura 2 – Peso fresco da parte aérea em brotações de amoreira-preta cv. Brazos, com diferentes concentrações de NaCl e ANA. UFLA, Lavras, MG, 2005.

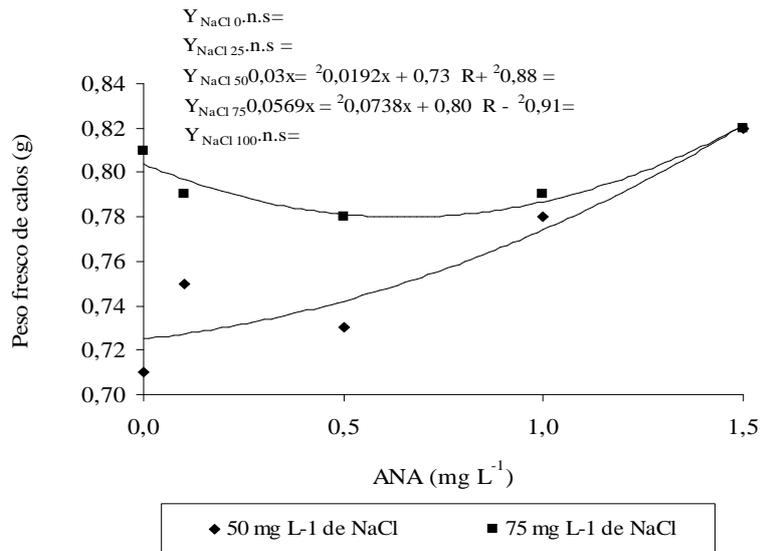


Figura 3 – Peso fresco de calos (g) em brotações de amoreira-preta cv. Brazos, com diferentes concentrações de NaCl e ANA. UFLA, Lavras, MG, 2005.

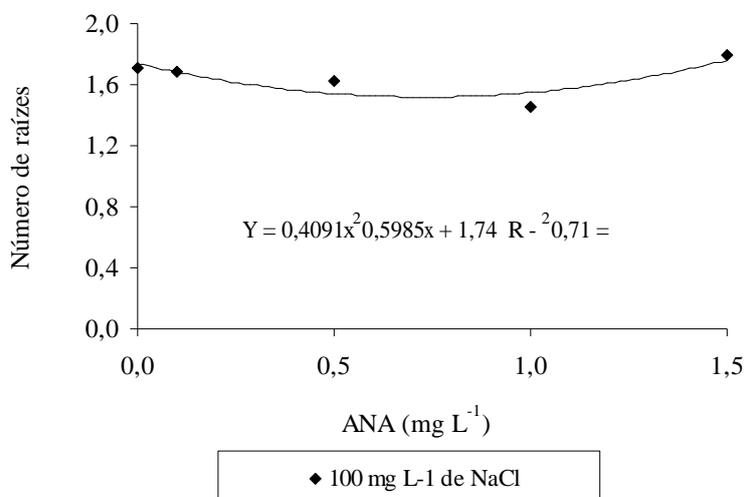


Figura 4 – Número de raízes em brotações de amoreira-preta cv. Brazos, com diferentes concentrações de NaCl e ANA. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Melhores resultados para a micropropagação da cv. Brazos são obtidos com o meio MS acrescido de 50 a 75 mg L⁻¹ de NaCl e 1,0 a 1,5 mg L⁻¹ de ANA.

Melhor formação do sistema radicular da amoreira-preta *in vitro* foi verificado em meio salino contendo 100 mg L⁻¹ de NaCl e 1,5 mg L⁻¹ de ANA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BETHKE, C.P.; DREW, C.M. Stomatal and nonstomatal components to inhibition of photosynthesis in leaves of *Capsicum annum* during progressive exposure to NaCl salinity. **Plant Physiology**, Bethesda, v.99, p.219-226, 1992.
- 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, DF: Embrapa/CNPq, 1998. v.1, p.87-132.
- CRUZ, J.L.C.; PELACANI, C.R.; COELHO, E.F.; CALDAS, R.C.; ALMEIDA, A.Q.; QUEIROZ, J.R. Influência da salinidade sobre o crescimento, absorção e distribuição de sódio, cloro e macronutrientes em plântulas de maracujazeiro-amarelo. **Bragantia**, Campinas, v.65, n.2, p.275-284, 2006.
- DESAI, U.T.; SINGH, R.M. Growth of guava plants (*Psidium guajava* L.) as affected by salinity. **Indian Journal of Horticulture**, Bangalou, v.5, p.3-6, 1980.
- 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, SP. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p.255-258.
- FASSBEIDER, H.W.; BORNEMUZA, E. **Química de suelos de América Latina**. 2.ed. San José: II CA, 1987. 420p.
- FLOWER, T.J.; HAJIBAGHERI, M.A.; CHIPSON, N.J.W. The mechanism of salt tolerance in halophytes. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.28, p.89-121, 1986.
- GHEYI, H.; FAGEIRA, N.K. Efeitos dos sais sobre as plantas. In: _____. **Manejo e controle da salinidade na agricultura irrigada**. Campina Grande: UFCG, 1997. p.125-131.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa/CNPq, 1998. v.1, p.183-260.
- KRIKORIAN, A.D. Médios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. (Eds.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. p.41-776.

- LIMA, G.P.P.; FERNANDES, A.A.H.; CATÂNEO, A.C.; CEREDA, M.P.; BRASIL, O.G. Alterações na atividade da peroxidase e do conteúdo de carboidratos em mandioca cultivada *in vitro* sob estresse salino. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.55, n.3, p.413-417, 1998.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- O'LEARY, J.W. High humidity overcomes lethal levels of salinity in hydroponically grown salt-sensitive plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.42, p.717- 721, 1971.
- PASQUAL, M.; PEIXOTO, P.H.P.; SANTOS, J.C.; PINTO, J.E.P.B. 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.
- PASQUAL, M.; RAMOS, J.D.; HOFFMANN, A.; CARVALHO, G.R. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações: meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 127p.
- PATIL, P.K.; PATIL, Y.K.; GHONSIKAR, C.P. Effect of soil salinity on growth and nutritional status of guava (*Psidium guajava* L.). **International Journal of Tropical Agriculture**, Haryana, v.2, n.4, p.337-344, 1984.
- PIZA, I.M.T.; LIMA, G.P.P.; BRASIL, O.G. Atividade da peroxidase e níveis de proteínas em plantas de abacaxizeiro micropropagadas em meio salino. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.9, n.4, p.361-366, 2003.
- PRISCO, J.T. Alguns aspectos da fisiologia do “stress” salino. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.3, p.85-94, 1980.
- 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.
- STRIK, B.C.; CLARK, J.R.; FINN, C.E.; BAÑADOS, M.P. Worldwide blackberry production. **HortTechnology**, Alexandria, v.17, p.205-213, 2007.
- ULISSES, C.; CAMARA, T.R.; WILLADINO, L.; MEUNIER, I.; ROCHA, P.S.G.; ALBUQUERQUE, C. Seleção *in vitro* de gemas de bananeira ‘Nanicão’ tolerantes à salinidade. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.57, p.667-670, 2000.
- YAHYA, A. Salinity effects on growth and on uptake and distribution of sodium and some essential mineral nutrients in sesame. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.21, n.7, p.1439-1451, 1998.