

CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO INDOLBUTÍRICO E PERÍODOS DE ESCURO, NO ENRAIZAMENTO “*IN VITRO*” DE AMOREIRA-PRETA (*Rubus* sp.), CV. ÉBANO¹

ELIZETE BEATRIZ RADMANN², EMERSON DIAS GONÇALVES³, GERSON RENAN DE LUCES FORTES⁴

RESUMO - O trabalho foi realizado com o objetivo de testar a influência do AIB em condições de escuro, no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta cv. Ébano. Utilizaram-se explantes provenientes da propagação *in vitro*, os quais foram submetidos a duas concentrações de ácido indolbutírico (AIB) (0,5 e 1,0 µM) e três períodos de escuro (2; 4 e 6 dias). Os explantes foram cultivados em meio contendo sais e vitaminas de MS (Murashige & Skoog, 1962) com os sais minerais reduzidos à metade, acrescidos de mio-inositol (100 mg.L⁻¹), sacarose (30 g.L⁻¹), ágar (7g.L⁻¹) e o pH ajustado para 5,9. Os frascos contendo os explantes, após o tratamento de escuro, foram incubados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, densidade de fluxo luminoso de 31,41W.m⁻² e temperatura de 25±3°C, por 30 dias. Avaliaram-se a porcentagem de enraizamento, número e comprimento de raízes, e formação de calo na base das brotações. Após os explantes serem aclimatizados, avaliou-se a taxa de sobrevivência. Não houve diferenças significativas entre as porcentagens de enraizamento dos diferentes tratamentos. O número de raízes foi maior em meios sem ácido indolbutírico (5,5 raízes/explante). As raízes mais longas foram observadas em meios sem ácido indolbutírico e quando submetidas 2-4 dias no escuro. Ocorreu maior intensidade de formação de calo quando adicionado ácido indolbutírico ao meio de cultura. Verificou-se alta porcentagem de sobrevivência das brotações na fase de aclimatização (86 - 97%).

Termos para indexação: cultura de tecidos, propagação *in vitro*, escuro

INDOLBUTIRIC ACID CONCENTRATIONS AND DARK PERIOD ON THE *IN VITRO* ROOTING OF BLACKBERRY (*RUBUS* SP.), CV. ÉBANO

ABSTRACT - The work was carried out aiming to test the influence of IBA and darkness on the *in vitro* rooting of blackberry cv. Ébano. Explants were used from the *in vitro* proliferation and they were subjected to two IBA concentrations (0.5 and 1.0µM) and three dark periods (2, 4 and 6 days). The explants were cultivated in a medium containing MS salt and vitamins (Murashige & Skoog, 1962) being the mineral salts reduced to half strength and added with myo-inositol (100 mg.L⁻¹), sucrose (30 g.L⁻¹) and agar (7.0 g.L⁻¹). The pH was adjusted to 5.9. The flasks containing the explants after receiving the dark treatment were incubated in a growth room at 25±2°C for 30 days. The root percentage, the number and root length as well as the callus formation in the shoot base were evaluated. After the plantlets being acclimatized it was evaluated the percentage of survival. No significantly differences for rooting were observed among the treatments. The root number was higher for media without IBA (5.5 roots/shoot). The longest roots were observed in the media without IBA and subjected to 2-4 days of darkness. The addition of IBA to the medium increased the intensity of callus formation. It was observed a higher percentage of shoots survival during the acclimatization (86-97%).

Index terms: tissue culture, *in vitro* propagation, darkness

INTRODUÇÃO

A amoreira-preta é pertencente à família *Rosaceae*, gênero *Rubus*, do qual já foram constatadas mais de 400 espécies. É planta arbustiva de porte ereto, semi-ereto, ou rasteiro (Raseira, 1986).

Um dos grandes entraves para a implantação de uma nova espécie frutífera é a produção de mudas com qualidade (Peruzzo et al., 1995). A propagação da amoreira-preta é realizada principalmente por estacas de raiz e, também, de hastes novas. Recentemente, a cultura de tecidos vem sendo utilizada, permitindo a obtenção de plantas isentas de viroses e geneticamente uniformes, em curto espaço de tempo (Grattapaglia & Machado, 1998).

Pasqual et al. (1995), utilizando explantes de amoreira-preta cv. Ébano, acrescidos somente de ácido indolbutírico ou ácido naftalenoacético a 0,1 mg⁻¹ ao meio MS, obtiveram formação de mudas bem desenvolvidas e com bom enraizamento, sem ocorrer formação de calo. Porém, o aumento da concentração de AIB para 1,0 mg L⁻¹ levou à formação de pequenas raízes e grande presença de calo nestes explantes. Em contrapartida, Kiss & Zakyto (1978) obtiveram fácil enraizamento de brotos de um híbrido entre amora-preta e framboesa, utilizando 1,0mg L⁻¹ de AIB.

Outro fator que pode influenciar no enraizamento *in vitro* é a luminosidade, que nem sempre é benéfica para a indução e desenvolvimento de raízes. Em alguns tecidos, períodos de escuro promovem o enraizamento, enquanto, em outros, a luz aumenta a formação de raízes. A exposição das brotações a um período de escuro pode melhorar a

formação de raízes na fase inicial (Economou, 1987). Druart et al. (1982) e Zimmerman (1984) obtiveram 100% de enraizamento em macieira cv. Delicious, quando mantidas por uma semana no escuro e, após, transferidas para fotoperíodo de 16 horas.

Com este trabalho, objetivou-se determinar a concentração de ácido indolbutírico no meio de cultura MS e o regime de luminosidade, apropriados para a produção *in vitro* de amoreira-preta cv. Ébano.

MATERIALE MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS.

Foram utilizados explantes de amoreira-preta da cultivar Ébano. Estes foram cultivados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) com metade da concentração dos sais minerais, acrescidos de vitaminas, mio-inositol (100 mg L⁻¹), sacarose (30 g L⁻¹) e ágar (7 g L⁻¹). Ao meio, foi adicionado ácido indolbutírico nas concentrações de 0,5 e 1,0µ M. O pH foi ajustado para 5,9 antes da autoclavagem. A esterilização foi realizada em autoclave a 120°C, com pressão de 1,5 atm, por 20 minutos. Foram utilizados frascos com capacidade de 250 ml, contendo 30 ml de meio de cultivo.

As brotações utilizadas foram retiradas de explantes propagados *in vitro*, retirando-se apenas 2-3 folhas da parte basal.

Após a esterilização dos meios, realizou-se a inoculação dos explantes em câmara de fluxo laminar, colocando-se cinco explantes por frasco. Estes foram incubados em câmara de crescimento à temperatura

¹ (Trabalho 008/2002). Recebido: 31/01/2001; Aceito para publicação: 07/02/2003. Realizado no laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Fruticultura de Clima Temperado (CPACT/Pelotas-RS)

² Eng. Agr., mestranda em Agronomia, com área de concentração em Fruticultura de Clima Temperado (FAEM/UFPel), 0xx53 - 2758163 - eradmann@hotmail.com

³ Eng. Agr., doutorando em Agronomia, com área de concentração em Fruticultura de Clima Temperado (FAEM/UFPel), 0xx53 - 2758187 - emersond@ufpel.tche.br

⁴ Dr. Pesquisador Embrapa Clima Temperado (Pelotas-RS), 0xx1453 2758259 - gerson@cpact.embrapa.br

de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$, em três períodos de escuro (2; 4 e 6 dias). Em seguida, os frascos foram transferidos para condições de luz sob fotoperíodo de 16 horas, densidade de fluxo luminoso de $31,41\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$, fornecido por lâmpadas fluorescentes (40w) brancas frias.

Após o enraizamento *in vitro*, as brotações foram levadas para casa de vegetação, onde foram aclimatizadas em bandejas contendo areia e vermiculita (1:1).

As variáveis mensuradas compreenderam: porcentagem de enraizamento, número e comprimento de raízes, formação de calo na base do explante e explante, e porcentagem de plantas aclimatizadas. Independentemente da variável estudada, a avaliação procedeu-se após 30 dias.

O delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso, em esquema fatorial, com três repetições, sendo cada repetição constituída por um frasco com 5 explantes. Os fatores testados foram: concentração de AIB, com três níveis (0,0; 0,5 e $1,0\mu\text{M}$) e períodos de escuro, com quatro níveis (0; 2; 4 e 6 dias), totalizando 36 tratamentos. Os dados obtidos foram analisados pelo teste estatístico SANEST e foi realizada regressão; com transformação dos dados para porcentagem de enraizamento e de plantas aclimatizadas (arc-sen raiz quadrada da porcentagem/100), número de raiz transformada em raiz ($x+1$) e a variável intensidade de formação de calo transformada em $\log(x+1)$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise de variância, não houve diferença significativa entre os tratamentos testados, para porcentagem de enraizamento. Portanto, as diferentes concentrações de ácido indolbutírico e os diferentes períodos de escuro, bem como sua interação, não foram significativas para esta variável. No entanto, Pasqual et al. (1995) obtiveram melhor enraizamento adicionando ácido indolbutírico na concentração de $0,1\text{mg L}^{-1}$ ao meio MS, promovendo a formação de mudas bem desenvolvidas. Kiss & Zakyto (1978) também obtiveram maior enraizamento de brotações de um híbrido entre amora-preta e framboesa, utilizando $1,0\text{mg L}^{-1}$ de ácido indolbutírico. Isto, provavelmente, se deve ao fato de utilizar-se diferentes genótipos, os quais respondem melhor à adição de auxina ao meio de cultivo. Provavelmente, a cultivar estudada apresente quantidade de auxina endógena suficiente para estimular o enraizamento, não respondendo, portanto, à adição de auxina exógena (Salisbury, 1991).

Para o número de raiz por explante, apenas houve diferença significativa para o fator de concentração de AIB. O maior número de raiz por explante ocorreu sem adição de ácido indolbutírico ao meio (5,5 raízes/brotação). Possivelmente, esta cultivar apresente concentrações suficientes de auxina endógena para a formação de raízes (Figura 1). Desta maneira, qualquer adição deste regulador ao meio de cultivo diminui o enraizamento. Diversas espécies, principalmente as herbáceas, enraízam com níveis muito reduzidos de auxina ou em meio básico sem substâncias de crescimento (Anderson, 1984; Hasegawa, 1980). 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).

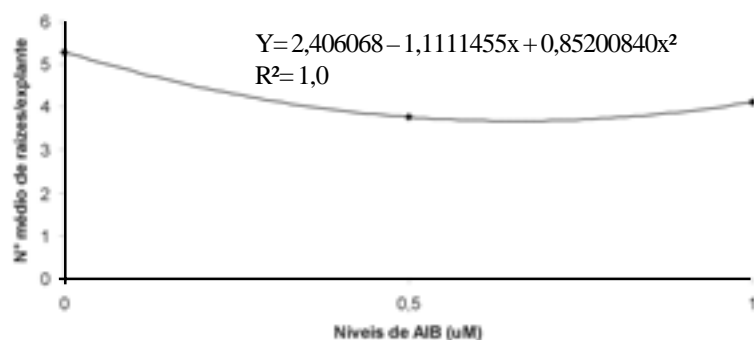


FIGURA 1 - Número médio de raízes por explante de amora-preta, submetidas a diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB). Pelotas-RS, 2000.

Quanto ao comprimento de raiz, houve diferença significativa para o fator concentração de AIB e para o fator período de escuro, mas não houve significância da interação entre os dois fatores. A ausência de AIB no meio de cultura levou à formação de raízes mais longas (Figura 2). A ausência de auxina ou seu emprego em baixas concentrações auxiliam no crescimento das raízes (Salisbury, 1991). Como as brotações da cultivar estudada não responderam à adição de auxina para a formação de raízes, conseqüentemente, a planta não responde à auxina na fase de alongação. As auxinas podem inibir o crescimento das raízes nesta fase, devido ao excesso deste regulador no meio. A inibição do crescimento em raízes pode ser causada pelo etileno, uma vez que auxinas, em geral, estimulam a produção de etileno (Salisbury, 1991).

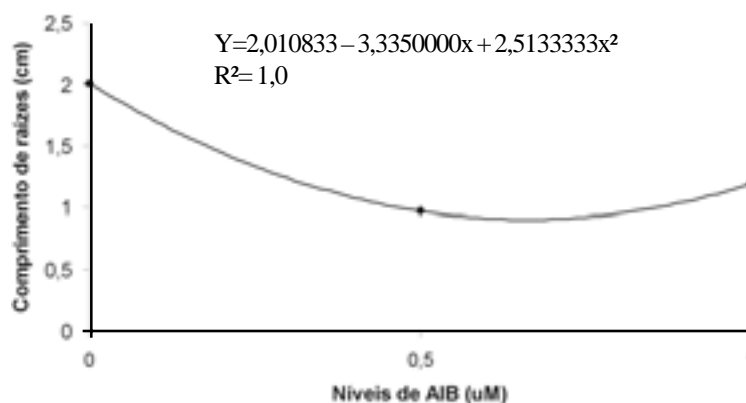


FIGURA 2 - Média do comprimento das raízes (cm) de explantes de amora-preta cv Ébano, sob diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB), após o enraizamento *in vitro*. Pelotas-RS, 2000.

Brotações submetidas a escuro, por 2 a 4 dias, obtiveram maior comprimento de raízes, em relação aos demais tratamentos realizados com escuro (Figura 3). A alta luminosidade propicia maior produção de ácido abscísico e substâncias fenólicas inibitórias do enraizamento (Anderson, 1984). Portanto, a exposição das brotações a um período de escuro é benéfica para algumas espécies (Assis & Teixeira, 1998).

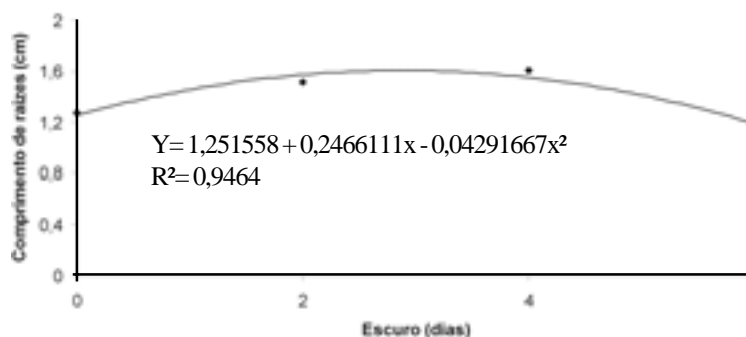


FIGURA 3 - Média do comprimento das raízes (cm) de explantes de amora-preta cv Ébano, sob diferentes períodos de escuro, após o enraizamento *in vitro*. Pelotas-RS, 2000.

Para a variável formação de calo, apenas ocorreu diferença significativa para o fator concentração de AIB. Observou-se maior intensidade de formação de calo quando se utilizou ácido indolbutírico no meio de cultura (Figura 4). Segundo Fachinello et al. (1994), no momento em que a auxina é aplicada, há aumento da concentração na base da estaca e, caso os demais requerimentos fisiológicos sejam satisfeitos, há formação do calo, resultante da ativação de células do câmbio e das raízes adventícias.

Na fase de aclimatização independente da concentração de AIB, observaram-se altas porcentagens de sobrevivência para todos os tratamentos (86 - 97%), não havendo diferença significativa entre os tratamentos. Alguns tratamentos que tiveram 100% de brotações enraizadas durante o cultivo *in vitro*, apresentando raízes ramificadas, não sobreviveram quando transplantadas para as condições *ex vitro*.

Provavelmente, isso deve-se ao longo comprimento das raízes na ocasião do transplante. Raízes mais curtas ou na forma de primórdios radiculares aceleram o pegamento da planta e evitam o envelhecimento. Além disso, estas são mais desejáveis, pois facilitam a lavagem e retirada do meio de cultura aderido, bem como a introdução da planta no substrato. Isto pode explicar o pegamento daquelas plantas que não tinham ainda suas raízes formadas durante o cultivo *in vitro* (Assis & Teixeira, 1998).

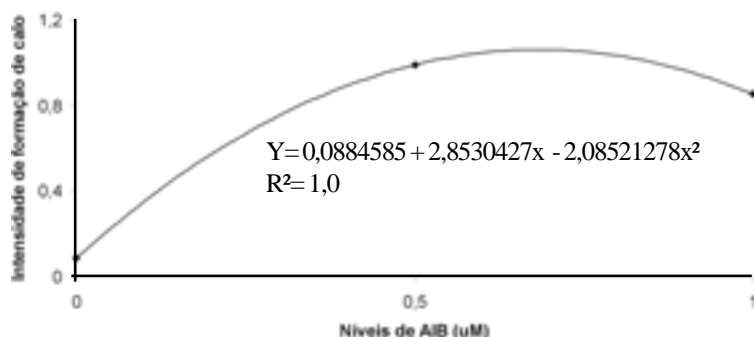


FIGURA 4- Intensidade de formação de calo na base dos explantes, após o enraizamento *in vitro*, de amora-preta cv. Ébano. Pelotas-RS, 2000.

CONCLUSÕES

Nas condições em que se desenvolveu este experimento, pode-se concluir que:

- 1) Períodos de escuro e concentrações de ácido indolbutírico não influenciam, na porcentagem de enraizamento.
- 2) Ausência de ácido indolbutírico resulta em maior número e comprimento de raiz.
- 3) Com a adição de ácido indolbutírico ao meio, ocorre a formação de calo.
- 4) Não há necessidade de tratamento *in vitro* com AIB, para brotações de amora-preta da cv. Ébano, para obter alta porcentagem de aclimatização.

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.

- ASSIS, T. F. de; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI / Embrapa-CNPq, 1998, p.261-296.
- DRUART, P.; KEVERS, C.; BOXUS, P.; GASPARD, T. *In vitro* promotion of rooting formation by apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases. **Zeitschrift Pflanzenphysiologie**, Stuttgart, v. 108, p.429-436, 1982.
- ECONOMOU, A.; READ, P.E. Light treatments to improve efficiency of *in vitro* propagation systems. **HortScience**, Alexandria, v.22 n.5, p.751-754, 1987.
- FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; FORTES, G.R. de L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 1994. 179p.
- GRATTAPAGLIA, D.; CALDAS, L. S. Micropropagação do porta-enxerto tangerina Sunki (*Citrus sunki*) a nível comercial. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 2., 1987, Brasília, DF **Resumos...** p.10, 1987.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPq, 1998, part. 2, p.183-260.
- HASEGAWA, P. M. Factors affecting shoot and root initiation from cultured rose shoot tip. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 105, p. 216-220, 1980.
- KISS, F.; ZAKYTO, J. Vegetative propagation of *Rubus* species *in vitro*. **Botanikal Koslemenye**, Budapest, v.65, p. 65-69, 1978.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p. 473-497, 1962.
- 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 temperate climate fruit trees. In: ENCUENTRO LATINOAMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 2., 1995, Puerto Iguazu, Argentina.
- PERUZZO, E.L.; DALBÓ, M. A.; PICCOLI, P. J. Amora-Preta: Variedades e propagação. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.8, n3, p 53-55, 1995.
- RASEIRA, M.C. Amora-Preta: uma nova opção. **Toda Fruta**, São Paulo, v. 1, n. 3, p. 33-34, 1986.
- SALISBURY, F. B.; ROOS, C.W. **Plant Physiology**. California: Wadsworth, 1991. cap.17, p.357-378.
- ZIMMERMAN, R.H. Factors affecting *in vitro* propagation of apple cultivars. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.131, p.171-178, 1984.