

Multiplicação *in vitro* de duas frutíferas de clima temperado sob influência do carvão ativado e do BAP.

Ribeiro, Márcia de Nazaré Oliveira¹; Villa, Fabíola¹; Pasqual, Moacir²; Assis, Franscinely Aparecida³; Silva, Andrieli Leão Pereira⁴; Santos, Jean Carlos de Souza⁴.

¹Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia (DAG), UFLA, Lavras, MG, e-mail: mrribeiro@ufla.br; ²Professor Titular 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

INTRODUÇÃO

No Brasil, a amoreira-preta vem sendo cultivada por pequenos produtores do Rio Grande do Sul (principal produtor brasileiro), Santa Catarina e Paraná, objetivando a exportação dos frutos (Antunes & Raseira, 2004). O Sul de Minas Gerais tem apresentado elevado potencial para esta fruta e um aumento na área plantada, destacando-se o município de Caldas. A cultura da videira (*Vitis* spp. L.), pela sua extensa área plantada no Brasil e pelo seu potencial de utilização, constitui uma importante fruteira de clima temperado, ocupando o terceiro lugar quanto ao valor de produção.

A propagação da amoreira-preta se faz através de estacas de raízes, ou ainda por brotos (rebentos), originados de plantas cultivadas e estacas herbáceas (Antunes & Raseira, 2004). Além destes, com a micropropagação, é possível obter plantas livres de vírus, geneticamente uniformes e em curto espaço de tempo (6 meses), sendo assim uma alternativa viável.

As citocininas são utilizadas para quebrar a dormência apical dos brotos, e aumentar a taxa de multiplicação. Dentre os reguladores de crescimento comumente usados no cultivo *in vitro* da videira estão a citocinina BAP, em concentrações que variam de 0,5 mg L⁻¹ e 2,0 mg L⁻¹. A adição de auxinas ao meio de cultura não é recomendada, pois estes provocam a formação indesejável de raízes e calos, além de reduzirem o número de brotações produzidas por explante (Gray & Fisher, 1986).

Peixoto & Pasqual (1992), obtiveram maiores taxas de multiplicação e crescimento dos segmentos nodais de 'P1103', com o emprego de 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ de BAP e na ausência de ANA. Para a amoreira-preta, os reguladores de crescimento comumente usados no cultivo *in vitro* são a 6-benzilaminopurina (BAP) e o ácido indolbutírico (AIB) (Donnelly et al., 1986).

O carvão ativado normalmente é adicionado ao meio de cultura em concentrações que variam de 0,2% a 3% (Beyl, 2000), porém sua presença pode promover ou inibir o crescimento *in vitro*, dependendo da espécie e tecido utilizado. Vários são os trabalhos que citam a utilização de carvão ativado na micropropagação de espécies frutíferas tais como videira, ameixeira, framboeseira, morangueiro e macieira. O presente trabalho objetivou avaliar o efeito de concentrações de carvão ativado e do BAP na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta cv. Ébano e do porta-enxerto de videira 'P1103'.

MATERIAL E MÉTODOS

Segmentos nodais de plantas de amoreira-preta (*Rubus* spp.) cv. Ébano e do porta-enxerto de videira (*Vitis* spp. L.) 'P1103', com 2 cm, de plantas preestabelecidas *in vitro* foram excisados e introduzidos em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio constituído dos sais minerais do meio MS e de metade dos sais do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), respectivamente, combinados com cinco concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) e cinco de carvão ativado (0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 g L⁻¹). O pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem e solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar (Merck®).

Posteriormente foram transferidos para sala de crescimento a 27 ± 1°C, irradiância de 35 μ mol.m⁻².s⁻¹ fornecida por tubos fluorescentes de 20W (Osram®), luz do dia especial e fotoperíodo de 16 horas, permanecendo nestas condições por 70 dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições constituídas de três explantes. As variáveis analisadas para o porta-enxerto de videira foram número de folhas, comprimento da parte aérea e peso da matéria fresca e seca da parte aérea e, para a amoreira-preta cv. Ébano foram avaliados o número de folhas, número de raízes, comprimento da maior raiz, comprimento da parte aérea, peso da matéria fresca e seca da parte aérea. Os resultados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o software Sisvar (Ferreira, 2000), sendo utilizado regressão polinomial para concentrações de carvão ativado e de BAP e nível de significância de 0,05% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se com a adição de carvão ativado ao meio de cultura, nas concentrações utilizadas, a inibição da multiplicação dos brotos, o crescimento da parte aérea e do sistema radicular do segmento nodal inicialmente inoculado das duas frutíferas de clima temperado estudadas. Não houve a formação de calos em nenhum tratamento, diferindo assim dos resultados observados em figueira cv. Roxo de Valinhos micropropagada, onde se verificou essa formação apenas na presença de 0,5 a 4,0 mg L⁻¹ de BAP (Fráguas, 2003).

Para o comprimento da parte aérea, comprimento da maior raiz, número de folhas e raízes das plantas de amoreira-preta cv. Ébano e, para o peso da matéria fresca houve interação significativa entre BAP e carvão ativado, constatando-se que os efeitos dos fatores são dependentes. Com incrementos nas concentrações de carvão ativado, verificou-se decréscimo no número de folhas das duas frutíferas estudadas de forma quadrática até certo ponto. O inverso foi observado em porta-enxerto de *Prunus persica* x *P. amygdalus*, onde maior número de folhas ocorreu com a adição de carvão ativado no meio de cultura (Sotiropoulos & Fotopoulos, 2005).

Mesmo na ausência de carvão ativado foi verificada a presença de folhas em plantas de amoreira-preta e no porta-enxerto de videira, onde seu maior número (15,168 e 5,76) deu-se com 0,5 e 2,0 mg L⁻¹ de BAP, respectivamente. Isto pode ser atribuído ao fato do carvão ativado associado ao BAP favorecerem a formação de maior número brotos, porém, de tamanho reduzido, apresentando menor número de segmentos nodais e folhas.

Em função da análise de variância para comprimento da parte aérea das plântulas do porta-enxerto de videira, não se verifica a interação entre os fatores BAP e carvão ativado. Incremento nas concentrações de carvão e de BAP acarretaram num aumento de forma quadrática no comprimento da parte aérea. O comprimento da parte aérea atingiu o valor máximo (3,02 g) com a utilização de 2,0 mg.L⁻¹ de BAP e com 3,0 g L⁻¹ de carvão ativado (3,16 g) e a partir deste ponto o regulador de crescimento BAP e/ou o carvão ativado passaram a inibir o desenvolvimento das plântulas, apresentando um decréscimo no comprimento.

Para plantas de amoreira-preta, verificou-se interação significativa entre os fatores estudados. Por meio do teste F, verificou-se resultado significativo em relação às concentrações de carvão ativado, exceto na ausência de BAP. O maior comprimento da parte aérea (6,188 cm) foi observado com 4,0 mg L⁻¹ de BAP associado a 1,0 g L⁻¹ de carvão ativado, porém, a diferença observada nos outros níveis de carvão é muito pequena. Rápida proliferação de gemas axilares de amoreira-preta cultivares Thornless Boysenberry e T. Youngberry foi obtida em meio MS acrescido de 2,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de ANA (Skirvin et al., 1981).

Vários autores relatam o efeito do carvão ativado no alongamento das brotações em diversas espécies. Kowalski & Staden (2001) citam que a utilização de 2,0 g L⁻¹ de carvão ativado no meio de cultura WPM proporcionou melhor crescimento das brotações de *Podocarpus henkelii*. Concentrações elevadas do regulador de crescimento pode ter dificultado o desenvolvimento da parte aérea, mesmo utilizando-se a maior concentração de carvão ativado, resultando em menor comprimento da parte aérea. Pasqual (2001) cita que altas taxas de citocininas podem reduzir o tamanho das brotações e estimular a ocorrência de hiperidricidade e formação de folhas anormais.

Comprimento da maior raiz de amoreira-preta foi observado mesmo na ausência de carvão ativado em todas as concentrações do regulador de crescimento. Maior comprimento (1,713 cm) foi verificado com 4,0 mg L⁻¹ de BAP associado a 3,0 g L⁻¹ de carvão.

Com o aumento das concentrações de carvão, houve acréscimo seguindo o modelo quadrático, tanto para comprimento da maior raiz quanto para seu número. Porém, para número de raízes, verificou-se maior número (1,925) com a mesma concentração de carvão para comprimento de raiz (3,0 g L⁻¹), porém com baixa dosagem do regulador (0,5 mg L⁻¹).

Esses resultados corroboram com Barbosa et al. (1992) que verificou um aumento de qualidade e quantidade de raízes formadas de figueira 'Roxo de Valinhos' com a adição de 3,0 g L⁻¹ de carvão em meio de cultura MS. Porém divergem de Fráguas (2003) quando cita que a adição de 1,0 g L⁻¹ de carvão aumentou o número de raízes em plantas de figueira da mesma cultivar multiplicadas em meio WPM.

Não se verificou interação significativa entre os fatores BAP e carvão ativado para peso fresco da parte aérea de plantas de amoreira-preta. Incremento nas concentrações de carvão ativado acarretaram numa diminuição no peso fresco das plântulas de amoreira-preta. O inverso foi observado para concentrações de BAP. O peso da matéria fresca da parte aérea atingiu o valor máximo (0,797 g) com a utilização de 2,0 mg L⁻¹ de BAP e na ausência de carvão ativado (0,812 g) e a partir deste ponto o BAP passou a inibir o desenvolvimento das plantas *in vitro*, apresentando um decréscimo no seu peso.

Por meio do teste F, verificou-se resultado significativo em relação às concentrações de carvão ativado e às de BAP para o peso da matéria fresca da parte aérea do porta-enxerto. A diferença observada nos níveis de carvão para o peso fresco da parte aérea foi muito pequena. Na análise de variância, verifica-se que, para o peso fresco e seco da parte aérea do porta-enxerto de videira, apenas a interação entre carvão e os níveis 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ de BAP foram significativos.

Verifica-se que maior peso da matéria fresca e seca da parte aérea ocorre com a 2,0 mg L⁻¹ de BAP na ausência de carvão ativado. Com o incremento das concentrações de carvão ativado houve diminuição no peso fresco e seco da parte aérea de forma quadrática, combinado com 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ de BAP. O efeito não-seletivo do carvão ativado pode proporcionar resultados negativos na micropropagação (Pan & Staden, 1998).

Na análise de variância, verifica-se que apenas a interação entre carvão e o nível 2,0 mg L⁻¹ de BAP para a amoreira-preta foi significativa. Com o incremento das concentrações de carvão ativado houve diminuição no peso seco da parte aérea de forma quadrática. Verifica-se na Figura 6B, que o maior peso seco da parte aérea de amoreira-preta (1,03 g) ocorre na ausência de carvão ativado associado a 2,0 mg L⁻¹ de BAP.

As concentrações mais elevadas do regulador de crescimento podem ter dificultado o desenvolvimento da parte aérea, mesmo utilizando-se a maior concentração do carvão ativado, resultando em menor peso da matéria fresca e seca da parte aérea. Apesar da utilização de citocinina ser essencial à multiplicação da parte aérea, o seu excesso é tóxico e pode resultar, entre outros efeitos, na redução do tamanho das folhas e encurtamento dos entrenós (Leshen, 1988).

CONCLUSÕES

A adição de carvão ativado inibe a multiplicação das brotações das duas frutíferas de clima temperado. Maior peso da matéria fresca da parte aérea das duas frutíferas estudadas foi obtido na ausência de carvão ativado e com a adição de 2,0 mg L⁻¹ de BAP. Maior número e comprimento de raízes de amoreira-preta cv. Ébano e melhor crescimento da parte aérea do porta-enxerto 'P1103' foram proporcionados com 3,0 g L⁻¹ de carvão ativado. Maior número de folhas e de raízes de amoreira-preta foi obtido com 0,5 mg L⁻¹ de BAP. Melhor meio de cultura utilizado na multiplicação das duas frutíferas de clima temperado é o meio adicionado de BAP, na ausência de carvão ativado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, L.E.C.; RASEIRA, M.C.B. **Aspectos Técnicos da Cultura da Amora-Preta**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. p.13. Embrapa Clima Temperado (Documentos, 122).

BARBOSA, W.; CAMPO-DALL'ORTO, F. A.; OJIMA, M.; MARTINS, F. P.; BOVI, V.; CASTRO, J. L. de. Produção de mudas da figueira 'Roxo de Valinhos' através da cultura *in vitro*. **O Agrônomo**, Campinas, v.44(n.1, 2, 3), p.6-18, jan./dez. 1992.

BEYL, C. A. Getting started with tissue culture - media preparation, sterile technique, and laboratory equipment. In: TRIGIANO, R. N.; GRAY, D. J. (Ed.). **Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises**. London: CRC Press, 2000, p.21-38.

DONNELLY, D. J.; STACE-SMITH, R.; MELLOR, F. C. *In vitro* culture of three *Rubus* species. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.112, p.69-75, 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. **Anais...** São Carlos: UFSCar. 2000, p.255-258.

FRÁGUAS, C. B. **Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira 'Roxo de Valinhos' em diferentes ambientes**. 2003. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GRAY, D.J.; FISHER, L.C. *In vitro* shoot propagation of grape species, hybrids and cultivars. In: ANNUAL MEETING OF THE FLORIDA STATE HORTICULTURAE SOCIETY, 98, 1985. **Proceedings ...** Gainesville: Florida State Horticultural Society, 1986, p.172-174.

KOWALSKI, B.; STADEN, J. van. Micropropagation of *Podocarpus henkelii* and *P. elongates*. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v.67, n.2, p.362-366, 2001.

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, 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.

PAN, M.J.; STADEN, J. van. The use of charcoal *in vitro* culture - A review. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.26, n.3, p.155-163, Dec. 1998.

PASQUAL, M. **Meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 74 p.

PEIXOTO, P.H.P.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* de brotações do porta-enxerto de videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, n.4, p.617-622, abr. 1992.

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.

SOTIROPOULOS, T.E.; FOTOPOULOS, S. *In vitro* propagation of the PR 204/84 peach rootstock (*Prunus persica* x *P. amygdalus*): the effect of BAP, GA(3), and activated charcoal on shoot elongation. **European Journal of Horticultural Science**, v.70, n.5, p.253-255, 2005.

PALAVRAS-CHAVE: amoreira-preta, videira, regulador de crescimento.