

Conservação *in vitro* de amoreira-preta: Crescimento lento

In vitro conservation of blackberry: Slow growth

Natália Dias Gomes da Silva¹, Leonardo Ferreira Dutra², Valmor João Bianchi¹,
Laura Reisdorfer Sommer³, Daiane Peixoto Vargas², José Antonio Peters¹

RESUMO

Em virtude da existência de vários genótipos de amoreira-preta (*Rubus* sp.), evidencia-se a necessidade do desenvolvimento de um método alternativo e complementar à conservação de germoplasma dessa espécie. Objetivou-se buscar alternativas que possibilitem o armazenamento do germoplasma de amoreira-preta, por um período de até 120 dias em temperatura de 6°C. Segmentos nodais de amoreira-preta 'Tupy' e 'Xavante' foram submetidos a baixas temperaturas (6 °C) durante 30, 60, 90 e 120 dias, em meio de cultura MS adicionado de diferentes concentrações de sacarose (15, 30 e 45 g L⁻¹) e com presença (15 g L⁻¹) ou ausência de manitol. A cada 30 dias foi avaliada a taxa de multiplicação e, após cada avaliação, os explantes voltaram à sala de crescimento, onde, após 30 dias, foi novamente avaliada a taxa de multiplicação. A presença do manitol e da sacarose no meio de cultura reduziu a taxa de multiplicação dos explantes conservados. Após o retorno à sala de crescimento, os explantes retornaram as taxas normais de multiplicação para a espécie. A exposição a baixas temperaturas é viável até 120 dias para amoreira-preta cvs. Tupy e Xavante. A taxa de multiplicação dos explantes de amoreira-preta reduziu quando os mesmos foram mantidos em baixas temperaturas, e retornaram ao normal após novo cultivo em sala de crescimento.

Termos para indexação: *Rubus*; baixas temperaturas; osmorreguladores, multiplicação, propagação vegetativa.

ABSTRACT

Due to the existence of several genotypes of blackberry, it is necessary to develop an alternative method for germplasm conservation of this species. Aimed to find alternatives that allow the storage of blackberry germplasm, for a period of 120 days at a temperature of 6 °C, nodal segments of blackberry 'Tupy' and 'Xavante' were subjected to low temperatures (6 °C) for 30, 60, 90 and 120 days in MS culture medium supplemented with different concentrations of sucrose (15, 30 and 45 g L⁻¹) in presence (15 g L⁻¹) or absence of mannitol. At 30 days interval, the rate of proliferation was assessed. After each evaluation, explants returned to the growth room, where, after 30 days, the rate of multiplication was again evaluated. The presence of mannitol and sucrose in the culture medium decreased the rate of explants proliferation. After returning to a growth room, explants returned to their multiplication rates. Exposure to low temperatures is feasible up to 120 days for blackberry cvs. Tupy and Xavante. The multiplication rate of explants of blackberry reduced when maintained at low temperatures, and returned to normal after a new culture in growth room.

Index terms: Blackberry; low temperature; osmoregulators; multiplication, vegetative propagation.

INTRODUÇÃO

A amoreira-preta (*Rubus* sp.) é uma das espécies frutíferas mais promissoras no país, apresentando boas perspectivas de cultivo e comercialização. Nos últimos anos tem se observado crescimento na área cultivada, principalmente na Região Sul do Brasil, e em algumas regiões do estado de São Paulo e Minas Gerais (Antunes et al., 2014).

A propagação desta espécie pode ser feita vegetativamente por meio de estacas de raízes ou de rebentos originados das plantas cultivadas (Pasa et al., 2012). No entanto, esta técnica apresenta algumas desvantagens, como a propagação de patógenos, com

isso, a técnica de micropropagação apresenta vantagens em relação aos métodos tradicionalmente utilizados na propagação de amoreira-preta, especialmente quanto à sanidade das mudas (Leitzke et al., 2009).

A micropropagação possibilita que sejam exploradas tanto a propagação quanto a conservação *in vitro*. Esta característica é importante, pois um dos problemas advindos do cultivo continuado dos tecidos *in vitro* é a perda de vigor dos explantes, após a permanência por longos períodos, não se apresentando mais responsivos após sucessivos subcultivos (Pasa et al., 2012). Este fato justifica a necessidade o desenvolvimento de métodos de conservação *in vitro*.

Recebido em 24 de agosto de 2015 e aprovado em 5 de maio de 2016

¹ Universidade Federal de Pelotas/UFPel, Departamento de Botânica, Pelotas, RS, Brasil

² Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, Brasil

³ Universidade Federal de Pelotas/UFPel, Pelotas, RS, Brasil

*Autor para correspondência: nataliadiasgomes@hotmail.com

Diante do potencial de cultivo de amoreira-preta, devido principalmente à produtividade desta frutífera no Rio Grande do Sul, alternativas que auxiliem na sua propagação, cultivo e preservação do germoplasma tornam-se muito necessárias. Como a amoreira-preta já possui um protocolo definido de produção de mudas via micropropagação (Oliveira et al., 2008), o desafio é conserva-las em condições *in vitro* por tempo indeterminado, tanto para reduzir o uso de mão de obra nos sucessivos subcultivos, quanto para garantir a conservação do material genético livre dos riscos presentes no processo de conservação a campo.

Nos últimos anos, as técnicas tradicionais de conservação são complementadas por métodos de conservação com ênfase na cultura de tecidos através da conservação *in vitro*. Este permite a manutenção de grande número de acessos em pequeno espaço físico, livre dos riscos existentes a campo, reduzindo os custos de manutenção e garantindo a fidelidade genética (Lédo et al., 2014).

Existem dois sistemas básicos de conservação *in vitro*: crescimento lento, por meio da limitação do crescimento para taxas mínimas; e criopreservação, mediante a supressão total do metabolismo celular (Vieira, 2000). O sistema de crescimento lento proporciona o armazenamento a curto e médio prazo, reduzindo o metabolismo da planta sem afetar sua viabilidade (Roca et al., 1991).

O crescimento lento consiste em reduzir o metabolismo vegetal por alterações no ambiente decultivo, como, decréscimo na intensidade da luz, fotoperíodo, trocas gasosas e temperatura de incubação da cultura, e por modificações no meio de cultura, por adição de reguladores vegetais, agentes osmóticos, e redução dos componentes salinos e orgânicos (Arrigoni-Blank et al., 2014).

O decréscimo da temperatura é uma das estratégias mais utilizadas para manter as plantas em crescimento lento por reduzir o metabolismo da planta, incluindo alterações no conteúdo e ação das enzimas e na composição e funcionamento das membranas celulares (Lemos et al., 2002; Lédo et al., 2007). A combinação de baixas temperaturas com a adição de reguladores vegetais ou agentes osmóticos no meio de cultura tem

sido apontada como uma alternativa eficiente para a conservação de germoplasma *in vitro*.

A conservação por meio da indução de estresse osmótico ocorre pela adição de osmorreguladores no meio de cultura, e pode ser empregada em associação ou não à outra técnica. Os principais reguladores osmóticos testados para limitar o crescimento de explantes *in vitro*, são o manitol e sorbitol, que modificam o potencial da água no meio de cultura. Outro agente osmótico utilizado é a sacarose, que adicionada ao meio de cultura, atua captando o excesso da água intracelular, por gradiente osmótico, fazendo com que o crescimento da cultura ocorra de forma mais lenta (Arrigoni-Blank et al., 2014) e assim, torna-se possível retardar a taxa de multiplicação dos explantes, aumentando o período do cultivo *in vitro*. Cabe salientar que estes resultados são os primeiros em relação de trabalhos com crescimento lento da espécie, visto que nada foi relatado na literatura.

Com isso, o presente trabalho teve como objetivo buscar alternativas que possibilitem o armazenamento do germoplasma de amoreira-preta, por um período de até 120 dias sob baixa temperatura e posterior retomadas taxas de multiplicação em condições normais de crescimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Como material vegetal utilizado foram duas cultivares amoreira-preta, Tupy e Xavante, pertencentes à coleção de germoplasma da Embrapa Clima Temperado. Os explantes foram constituídos por segmentos nodais contendo uma gema axilar, obtidas de brotações multiplicadas *in vitro* a cada 30 dias, oriundas de meristemas excisados de ramos jovens de plantas devidamente identificadas, mantidas em casa de vegetação. As culturas foram subcultivadas a cada 30 dias, até a obtenção de material suficiente para a execução do experimento.

Os explantes foram inoculados em meio de cultura composto pelos sais do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com adição de inositol (100 mg L^{-1}), ágar (7 g L^{-1}), benzilaminopurina (BAP) $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ (Pasa et al., 2012), sacarose ($15, 30, 45 \text{ g L}^{-1}$) e manitol ($0 \text{ e } 15 \text{ g L}^{-1}$). O pH do meio de cultura foi ajustado em 6,2 antes

da autoclavagem. Depois de inoculados, os explantes foram mantidos em BOD durante 30, 60, 90 e 120 dias, submetidos à densidade de fluxo de fótons de $8-10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas de luz e temperatura de $6 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Decorrido cada período de permanência nas referidas condições, foi avaliada a taxa de multiplicação dos explantes, ou seja, o quantas brotações foram oriundas de um único explante mantido sob baixa temperatura. A seguir, os mesmos foram inoculados em meio de cultura com a composição descrita anteriormente, adicionado de 30 g L^{-1} de sacarose e sem a presença de manitol, transferidos para sala de crescimento com densidade de fluxo de fótons de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas de luz e temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, para o retorno do crescimento. Decorridos 30 dias do retorno à sala de crescimento, os explantes foram novamente avaliados quanto à taxa de sobrevivência e de multiplicação.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por cinco tubos de ensaio contendo um segmento nodal com uma gema cada um. Os tratamentos foram arranjados em esquema trifatorial $4 \times 3 \times 2$, considerando o tempo de permanência *in vitro* (30, 60, 90, e 120 dias), as concentrações de sacarose (15, 30, e 45 g L^{-1}) e a presença ou ausência de manitol. O experimento foi repetido por duas vezes. Os dados obtidos foram analisados

quanto à sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, e posteriormente submetidos à análise da variância ($p \leq 0,05$). Em caso de significância estatística, compararam-se os resultados do fator tempo por regressão polinomial, do fator sacarose pelo teste Tukey, e do fator manitol pelo teste t ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve interação entre os fatores tempo x sacarose e tempo x manitol para ambas cultivares, quando em exposição a baixas temperaturas. Já, 30 dias após retorno a sala de crescimento, foi observado efeito principal do fator tempo para a taxa de multiplicação.

Para ambas cultivares a taxa de multiplicação dos explantes foi crescente quando estes estavam em exposição ao frio, tanto na presença ou ausência de manitol, no entanto, os explantes que permaneceram em meio de cultura sem manitol apresentaram maior taxa de multiplicação aos 120 dias (Figura 1 a e b).

A redução da taxa de multiplicação (Figura 2 a e b) em função da presença do manitol no meio de cultura pode ter ocorrido devido a este ser um açúcar-álcool que geralmente não é metabolizado pelas plantas e por isso é empregado para a redução do potencial hídrico do meio de cultura na conservação *in vitro* (Arrigoni-Blank et al., 2014). Entretanto, por períodos reduzidos de armazenamento em frio, a presença de manitol no meio de cultura não favoreceu a redução da taxa de

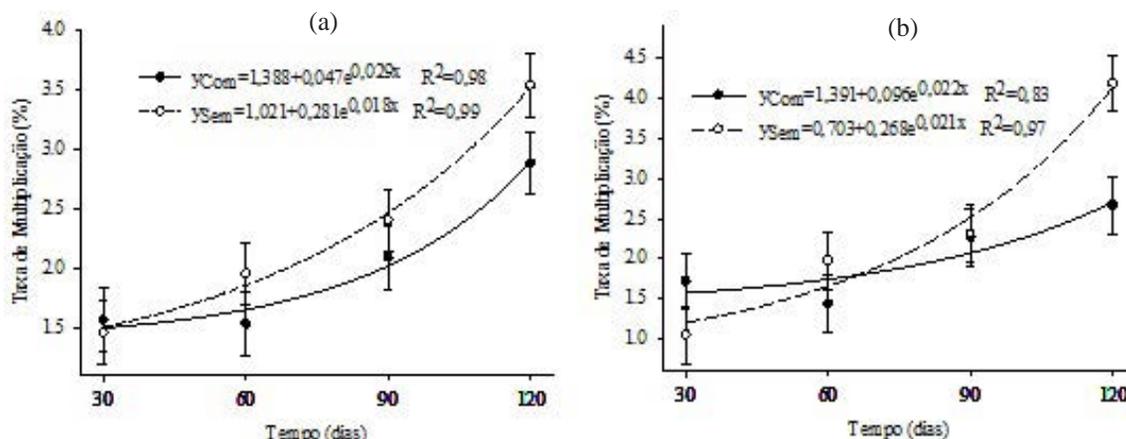


Figura 1 – Taxa de multiplicação *in vitro* de amoreira-preta (*Rubus* spp.) Tupy (a) e Xavante (b), mantidos sob temperatura de $6 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, com a presença (y_{com}) ou ausência (y_{sem}) de manitol, durante 30, 60, 90 e 120 dias. Os pontos representam as médias e as barras os respectivos intervalos de confiança.

multiplicação, devendo então, ser empregado somente quando utilizar-se períodos iguais ou superiores a 120 dias de armazenamento.

Resultados semelhantes foram encontrados com Yacon (*Smallanthus sonchifolius*), cultivados por 60 dias em baixas temperaturas em meio MS com 10, 20, 30 g L⁻¹ de manitol, onde ocorreu redução de 61,8 % na taxa de multiplicação com a presença de manitol (Skalova et al., 2012). Em hastes de batata (*Solanum tuberosum*), a presença de manitol reduziu efetivamente o crescimento das plantas, porém, apenas 37% dos explantes sobreviveram após 90 dias de cultivo (Fortes; Pereira; 2001).

A taxa de multiplicação foi crescente para a relação tempo de exposição ao frio e concentração de sacarose no meio de cultura (Figura 3a e b). A maior concentração de sacarose propiciou menor taxa de multiplicação para ambas cultivares, porém para a cv. Xavante esta concentração de sacarose não diferiu estatisticamente da concentração de 30 g L⁻¹. Com isso, é aconselhável aumentar a concentração de sacarose para explantes de amoreira-preta cv. Tupy conservados *in vitro*, visto que a concentração de 45g L⁻¹ apresentou maior redução na taxa de multiplicação que as demais concentrações testadas. Já para a cv. Xavante pode ser utilizada a concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose. Este fato é decorrente do fato de que conforme aumenta a concentração de sacarose

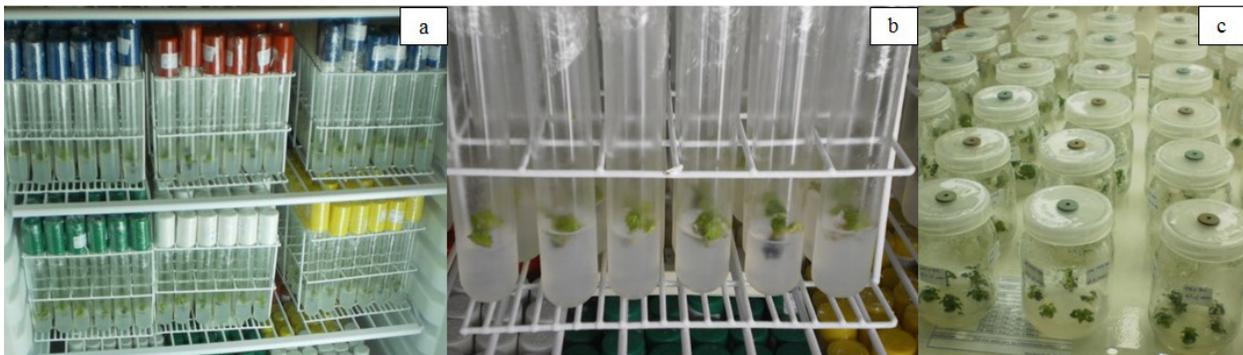


Figura 2 – Fases do processo de conservação *in vitro* de amoreira-preta. (a) Início do processo de conservação, (b) 60 dias após o estabelecimento do experimento e (c) 30 dias após o retorno a sala de crescimento.

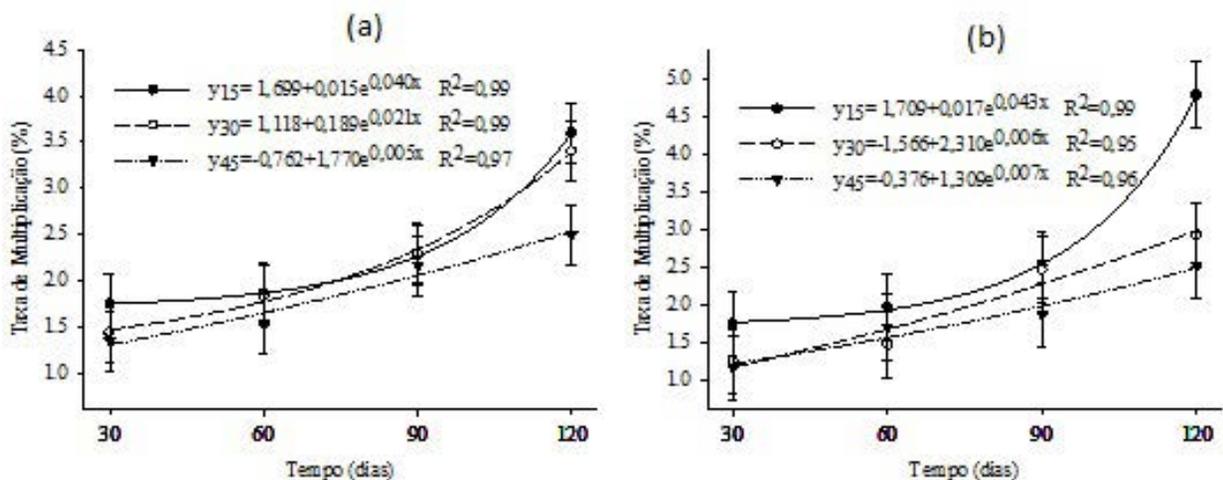


Figura 3 – Taxa de multiplicação *in vitro* de amoreira-preta (*Rubus* spp.) Tupy (a) e Xavante (b), mantidos sob temperatura de 6±1 °C, em meio de cultura com diferentes concentrações de sacarose 15 g L⁻¹ (y15), 30 g L⁻¹ (y30) e 45 g L⁻¹ (y45), durante 30, 60, 90 e 120 dias. Os pontos representam as médias e as barras os respectivos intervalos de confiança.

no meio de cultura, diminui o potencial hídrico do meio, dificultando a absorção de água e nutrientes pelos explantes, promovendo assim, a redução do crescimento do explante (Lédo et al., 2007).

Diante dos resultados encontrados no presente trabalho, os agentes osmóticos como a sacarose e o manitol podem ser acrescentados ao meio de cultura para auxiliar na redução da taxa de multiplicação, visto que os mesmos agem sobre o crescimento do explante de forma a reduzir o potencial hídrico do meio de cultura (LIMA-BRITO et al.; 2011). Além disso, o decréscimo da temperatura é uma das estratégias que utilizada juntamente com as demais citadas, mantém as plantas em crescimento mínimo, pois o frio reduz o metabolismo da planta, incluindo alterações no conteúdo e ação das enzimas e na composição e funcionamento das membranas celulares (Lemos et al., 2002; Arrigoni-Blank et al., 2014).

Decorridos 30 dias de retorno à sala de crescimento (Figura 2 c), observou-se que a taxa de multiplicação de

amoreira-preta retornou as médias descritas para as ambas cultivares testadas e, além disso, os explantes que permaneceram por maior tempo em exposição ao frio apresentaram também maiores taxas de multiplicação (Figura 4 a e b). Estes resultados indicam que mesmo os explantes de amoreira-preta que permaneceram por 120 dias em baixas temperaturas, ao retornarem à sala de crescimento não tiveram as taxas de multiplicação reduzidas, evidenciando assim a possibilidade desta técnica para a cultura de amoreira-preta por um período de até 120 dias de exposição ao frio.

Um fato importante que deve ser destacado, é que a taxa de sobrevivência dos explantes foi de 100%, ou seja, não houve morte dos explantes em nenhum dos tratamentos submetidos, evidenciando que a cultura sobrevive nestas condições. Porém, novos trabalhos devem ser realizados com a espécie, afim de verificar maiores tempos de conservação *in vitro* para cultivares de amoreira-preta.

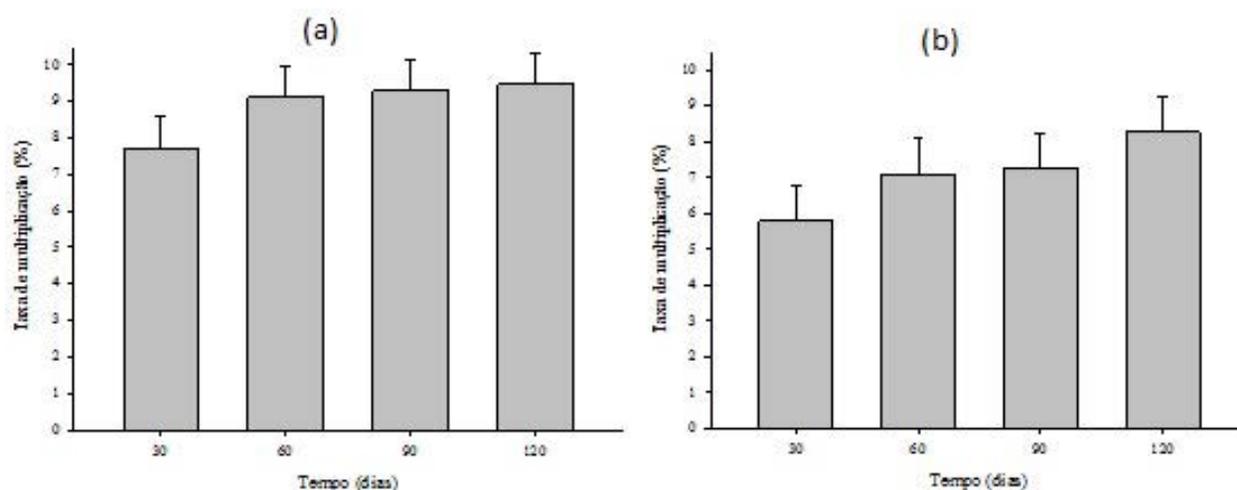


Figura 4 – Taxa de multiplicação *in vitro* de amoreira-preta (*Rubus* spp.) Tupy (a) e Xavante (b), submetidos a diferentes tempos de exposição ao frio (30, 60, 90 e 120 dias), 30 dias após retorno dos explantes à sala de crescimento. Os pontos representam as médias e as barras os respectivos intervalos de confiança.

CONCLUSÕES

A taxa de multiplicação dos explantes de amoreira-preta se reduz quando os mesmos são mantidos em baixas temperaturas, com a presença de osmorreguladores no meio de cultura. Após 30 dias de retorno a sala de crescimento os explantes obtiveram taxas normais de multiplicação.

REFERÊNCIAS

- ANTUNES, L. E. C. et al. Produção de amoreira-preta no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 36(1):100-111, 2014.
- ARRIGONI-BLAANK, M. F. et al. *In vitro* conservation of sweet potato genotypes. **The Scientific World Journal**. 2014 (1):1-7, 2014.
- FORTES, G. R. L.; PEREIRA, J. E. S. Preservação *in vitro* de batata com ácido salicílico e duas concentrações de carboidratos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 36 (10):1261-1264, 2001.
- LÉDO, A. S. et al. Efeito da sacarose e do manitol na conservação *in vitro* por crescimento lento de coqueiro anão. **Magistra**, 19(4):346-351, 2007.
- LÉDO, A. S. et al. Mannitol for coconut *ex situ* conservation by minimum growth. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 49 (2):148-151, 2014.
- LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de amora-preta 'Xavante': Efeito da concentração de sais, do tipo de explante e de carvão ativado no meio de cultura. **Ciência e Agrotecnologia**, 33: 1959-1966, 2009.
- LEMOS, E. E. P. de et al. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 37 (10):1359-1364, 2002.
- LIMA-BRITO, A. et al. Agentes osmóticos e temperatura na conservação *in vitro* de sempre-viva. **Ciência Rural**, 41(8):1354-1361, 2011.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15(3):473-497, 1962.
- OLIVEIRA, R. P.; NINO, A. F. P.; FERREIRA, L. V. Potencial de multiplicação *in vitro* de cultivares de amoreira-preta. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 30(3):585-589, 2008.
- PASA, M. da S. et al. Qualidade de luz e fitorreguladores na multiplicação e enraizamento *in vitro* da amoreira-preta 'Xavante'. **Ciência Rural**, 42 (8):1392-1396, 2012.
- ROCA, W. M.; ARIAS, D. I.; CHAVÉZ, R. Métodos de conservación *in vitro* del germoplasma. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. 969p.
- SKALOVA, I.; VIEHMANNOVA, I.; VITAMVAS, J. *In vitro* conservation of *Smallanthus sonchifolius* under slow-growth conditions. **Agricultura Tropica et Subtropica**, 45 (3):147-150, 2012.
- VIEIRA, M. L. C. Conservação de germoplasma *in vitro*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 3 (14): 18-20, 2000.