

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**



**MICROPROPAGAÇÃO FOTOAUTOTRÓFICA DE AMOREIRA-PRETA (*Rubus*
spp.) E FRAMBOESEIRA (*Rubus idaeus* L.) COM A UTILIZAÇÃO DE LUZ
NATURAL**

LUCIANE NOLASCO LEITZKE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Fruticultura de Clima Temperado).

**PELOTAS
Rio Grande do Sul – Brasil
Março de 2007**

LUCIANE NOLASCO LEITZKE

**MICROPROPAGAÇÃO FOTOAUTOTRÓFICA DE AMOREIRA-PRETA (*Rubus*
spp.) E FRAMBOESEIRA (*Rubus idaeus* L.) COM A UTILIZAÇÃO DE LUZ
NATURAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Fruticultura de Clima Temperado).

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Márcia Wulff Schuch

Co-orientador: Eng. Agr. Dr. Alan Cristiano Erig

Pelotas, 2007

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

L533m Leitzke, Luciane Nolasco

Micropropagação fotoautotrófica de amoreira-preta (*Rubus spp.*) e framboeseira (*rubus idaeus L.*) com a utilização de luz natural / Luciane Nolasco Leitzke. - Pelotas, 2007.
71f.

Dissertação (mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Fruticultura de Clima Temperado. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. - Pelotas, 2007, Marcia Wulff Schuch, Orientador; co-orientador Alan Cristiano Erig.

1. Produção de mudas 2. Xavante 3. Heritage 4. Cultura de tecidos 5. Batum I Schuch, Márcia Wulff (orientador) II .Título.

CDD 634.4

Banca Examinadora:

Presidente: Prof^a. Dr^a. Márcia Wulff Schuch

Prof^a. Dr^a. Andréa De Rossi Rufato

Prof. Dr. Leo Rufato

Prof. Dr. Luis Eduardo Corrêa Antunes

Dedico

***Este trabalho aos meus queridos pais
Rubimar e Maria Isabel e às minhas
irmãs Rosane e Elisane. Com todo o
amor e muita gratidão!***

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pelotas (UFPel), por ter me proporcionado uma nova perspectiva de vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro ao projeto.

À minha família, que revestiu minha existência de amor, carinho e dedicação, abriu as portas do meu futuro, iluminando meu caminho com a luz mais brilhante que pôde encontrar: o estudo.

À minha orientadora Prof^a Márcia Wulff Schuch, pela orientação, incentivo, auxílio, ensinamentos, confiança e amizade prestada e dispensada durante toda a realização deste trabalho, contribuindo enormemente pela minha formação.

À amiga e colega de trabalho Cláudia Roberta Damiani, amiga a quem devo muitos ensinamentos, que me ajudou durante a realização deste trabalho. Agradeço pelo carinho e atenção durante todos os dias que passamos juntas.

À amiga Andréa De Rossi Rufato, por ter me ajudado na hora em que mais precisei, agradeço pela compreensão e amizade.

Aos colegas e amigos do curso de pós-graduação, em especial a Adrise Medeiros Nunes e a Elisia Rodrigues Corrêa, pelo convívio, companheirismo, amizade, momentos de alegria e descontração vividos no decorrer do curso. Agradeço pelo carinho e atenção durante todos os dias em que passamos juntos.

À amiga Mariane D'ávila Rosenthal, pelo incentivo, preocupação, contribuição recebida sempre de boa vontade.

Ao meu namorado, Gustavo Storch, pela paciência, incentivo, compreensão no decorrer do trabalho.

Aos bolsistas Gustavo Campos Soares e Éderson Chisté pela ajuda durante a realização deste trabalho.

A todos que, embora não tenham tido seus nomes citados, direta ou indiretamente contribuíram para minha formação pessoal.

RESUMO

LEITZKE, LUCIANE NOLASCO. M.Sc., Universidade Federal de Pelotas, Março de 2007. **Micropropagação fotoautotrófica de amoreira-preta (*Rubus spp.*) e framboeseira (*Rubus idaeus* L.) com a utilização de luz natural.** Orientadora: Dr^a Márcia Wulff Schuch. Co-orientador: Dr. Alan Cristiano Erig

A cultura de tecidos é uma técnica que proporciona com sucesso a micropropagação massal de frutíferas e que já vem sendo utilizada com eficientes resultados para a produção de mudas sadias com alta qualidade. Entretanto, para que a aplicação da micropropagação na fruticultura torne-se viável comercialmente e possa competir com métodos tradicionais de propagação (estaquia, etc), é necessária a redução do custo de produção. Diante disso, o desenvolvimento de sistemas de micropropagação fotoautotrófica (produção de micropropágulos sem adição de sacarose no meio de cultura e sob condições ambientais que promovam a fotossíntese na planta) com o uso de luz natural surge como possibilidade que apresenta potencial para aumentar a eficiência da micropropagação e auxiliar na redução de seu custo. Assim, este trabalho teve como objetivo a multiplicação fotoautotrófica de amoreira-preta (*Rubus spp.*) cv. Xavante e de framboeseira (*Rubus idaeus* L.) cvs. Batum e Heritage. Dessa forma, foram realizados os estudos preliminares a fim de definir a constituição do meio de cultura que propicie os melhores resultados, tanto na multiplicação como no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta e framboesa, sob condições convencionais de micropropagação. A partir daí, foi realizado o estudo da micropropagação fotoautotrófica com o uso da luz natural, utilizando a constituição do meio de cultura que propiciou os melhores resultados. Pelos resultados obtidos, conclui-se que o meio MS adicionado de BAP na concentração de 13 μ M é o tratamento mais eficiente na multiplicação *in vitro* de explantes com folhas de amoreira-preta 'Xavante' e framboeseira 'Batum' e 'Heritage', induzindo maior número de folhas, brotações e gemas. Para o enraizamento *in vitro* de amoreira-preta 'Xavante', o meio WPM adicionado de 2,5 μ M AIB e mantido por uma semana, seguido do cultivo em meio livre de regulador é o

melhor meio de enraizamento; para framboeseira 'Batum', é necessária a adição de 6,5 μ M de AIB. Em condições fotoautotróficas o alumínio é o melhor modo de vedação dos frascos de cultivo. Para a multiplicação *in vitro* de amoreira-preta cv. 'Xavante', o melhor local de cultivo é a casa de vegetação e a adição de 22 g L⁻¹ de sacarose no meio de cultura e de 11,5g L⁻¹ para framboeseira 'Batum', mantida na sala de crescimento. Para o enraizamento *in vitro* de framboeseira cv. Batum, o algodão é o melhor modo de vedação dos frascos de cultivo; o melhor local de cultivo é a sala de crescimento, sem a adição de sacarose no meio de cultura, obtendo-se maior porcentagem de enraizamento, número de raízes por explante.

Palavras-chave: Cultura de Tecidos. Batum. Heritage. Xavante. Produção de mudas.

ABSTRACT

LEITZKE, LUCIANE NOLASCO. M.Sc., Universidade Federal de Pelotas, Março de 2007. **Photo-autotrophic micropropagation of blackberry (*Rubus* spp.) and raspberry (*Rubus idaeus* L.) by using natural light.** Orientadora: Dr^a Márcia Wulff Schuch. Co-orientador: Dr. Alan Cristiano Erig

The success of mass micropropagation of fruit trees may be reached by using plant tissues culture techniques, since this has showed efficient results on seedlings production with high quality and health. However, for the commercial viability of micropropagation application in the field of horticulture and how this might compete with traditional methods of propagation (cuttings, etc.), it is necessary to decrease production costs. Therefore, the development of photo-autotrophic micropropagation systems (production of micropropagules in sugar-free medium under environmental conditions that promote photosynthesis of the culture) with natural light appear as a possibility to improve the efficiency of micropropagation and to reduce costs. This research aimed the photo-autotrophic multiplication of blackberry (*Rubus* spp.) cultivar Xavante and raspberry (*Rubus idaeus* L.) cultivars Batum and Heritage. Preliminary experiments was carried out to define the constitution of culture medium that provides better results, as on multiplication as on *in vitro* rooting of blackberry and raspberry, under conventional conditions of micropropagation. Then, using the best constitution of culture medium, it was done the study of the photo-autotrophic multiplication by using natural light. The MS medium enriched with BAP at 13 μM was the more efficient treatment on *in vitro* multiplication of leaves of blackberry 'Xavante' and raspberries 'Batum' and 'Heritage', inducing a higher number of leaves, shoots and buds. The best rooting condition for explants of the blackberry 'Xavante' was reached by keeping the explants in WPM enriched with 2,5 μM AIB for a week followed by a regulator-free medium growth. Nevertheless, for raspberry 'Batum' rooting, it is necessary the addition of 6,5 μM AIB. Under photo- autotrophic conditions, the aluminum foil was the best sealing material for the flasks. Regarding to *in vitro* multiplication for blackberry cultivar Xavante the best growth local was in greenhouse with the addition of 22 g L⁻¹ sucrose to the medium; and for raspberry 'Batum' was at 11,5 g L⁻¹ sucrose but kept in growth room. For *in vitro* rooting of

raspberry 'Batum' cotton was the best sealing material, growth room and sugar-free medium were the best condition having a higher rooting percentage and root numbers per explants.

Keywords: Plant tissue culture, 'Batum', 'Heritage', 'Xavante', seedlings production.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Número médio de brotações de amoreira-preta cv. Xavante em função do tipo de meio de cultura, tipo de citonina e da concentração de citocinina. Pelotas, RS, 2007.....11
- Figura 2 - Número médio de folhas de amoreira-preta cv. Xavante em função do tipo de meio de cultura, tipo de citonina e da concentração de citocinina no meio de cultura. Pelotas, RS, 2007.....12
- Figura 3 - Comprimento médio das brotações de amoreira-preta cv. Xavante em função do tipo de meio de cultura, tipo de citocinina e da concentração de citocinina. Pelotas, RS, 2007.....13
- Figura 4 - Número médio de gemas (A), número médio de brotações (B) e número médio de folhas (C) de framboeseira cv. Batum em função do tipo de meio de cultura e da concentração de citocinina no meio de cultura. Pelotas, RS, 2007....15
- Figura 5 - Número médio de gemas (A) e número médio de folhas (B) de framboeseira cv. Batum em função do tipo e da concentração de citocinina no meio. Pelotas, RS, 2007.....17
- Figura 6 - Número médio de gemas (A), número médio de brotações (B) comprimento médio das brotações (C), número médio de folhas (D) de framboeseira cv. Heritage em função do tipo de meio e da concentração de citocinina no meio de cultura. Pelotas, RS, 2007.....19
- Figura 7 - Número médio de gemas (A), número médio de brotações (B) e comprimento médio das brotações (C) de amoreira-preta cv. Xavante em função da concentração de sais no meio de cultura. Pelotas, RS, 2007.....26
- Figura 8 - Número médio de folhas de amoreira-preta cv. Xavante em função da concentração de sais no meio de cultura e do tipo de explante. Pelotas, RS, 2007.....27
- Figura 9 - Número médio de raízes de amoreira-preta cv. Xavante em diferentes concentrações de sais formados e em função da concentração de carvão ativado no meio de cultura. Pelotas, RS, 2007.....28

Figura 10 - Porcentagem de enraizamento (A) e comprimento médio das raízes (B) de amoreira-preta cv. Xavante em função da concentração de carvão ativado no meio de cultura. Pelotas, RS, 2007.....	29
Figura 11 - Comprimento médio de raízes de amoreira-preta cv. Xavante em função de diferentes concentrações de AIB, Pelotas, RS, 2007.....	35
Figura 12 - Porcentagem de enraizamento de framboeseira cv. Batum em função da concentração de AIB e do tempo de cultivo das microestacas no meio de cultura. Pelotas, RS, 2007.....	37
Figura 13 - Número médio de gemas (A), número médio de folhas (B) e número médio de brotações (C) de framboeseira cv. Batum em função de diferentes concentrações de sacarose, Pelotas, 2007.....	42
Figura 14 - Peso médio da matéria fresca de framboeseira cv. Batum em função de diferentes concentrações de sacarose, Pelotas, 2007.....	43
Figura 15 - Peso médio da matéria-fresca da parte aérea (A), número médio de gemas (B), número médio de folhas (C) e comprimento médio das brotações (D) de amoreira-preta cv. Xavante em diferentes concentrações de sacarose e em função do local de incubação dos frascos com os explantes. Pelotas, RS, 2007.....	44
Figura 16 - Comprimento médio das brotações de amoreira-preta cv. Xavante em função de diferentes concentrações de sacarose e do tipo de material utilizado no fechamento dos frascos. Pelotas, RS, 2007.....	45
Figura 17 - Porcentagem de enraizamento (A) e número médio de raízes (B) de framboeseira cv. Batum em função do tipo de substrato e de diferentes concentrações de sacarose. Pelotas, RS, 2007.....	49
Figura 18 - Porcentagem de enraizamento (A) e número médio de raízes (B) de framboeseira cv. Batum em função do tipo de tampa utilizado no fechamento dos frascos e de diferentes concentrações de sacarose. Pelotas, RS, 2007.....	50
Figura 19 - Comprimento médio de raízes de framboeseira cv. Batum em função do tipo de tampa utilizado no fechamento dos frascos, do tipo de substrato utilizado para o enraizamento e da concentração de sacarose no meio de cultura. Pelotas, RS, 2007.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comprimento das brotações de framboeseira cv. Batum em função da citocinina utilizada no meio de cultivo. Pelotas, RS, 2007.....	18
Tabela 2 - Número médio de gemas, número médio de folhas e comprimento médio das brotações de framboeseira cv. Heritage em função do tipo de citocinina. Pelotas, RS, 2007.....	20
Tabela 3 - Número médio de gemas, número médio de brotações e comprimento médio das brotações de amoreira-preta cv. Xavante em função do tipo de explante utilizado. Pelotas, RS, 2007.....	27
Tabela 4 - Porcentagem de enraizamento, número de raízes e comprimento das raízes de amoreira-preta 'Xavante' em função do tipo de meio utilizado. Pelotas, RS, 2007.....	34
Tabela 5 - Comprimento das raízes de amoreira-preta 'Xavante' em função do tempo de cultivo das microestacas em meio com AIB. Pelotas, RS, 2007.....	34
Tabela 6 - Porcentagem de enraizamento, número médio de raízes, comprimento médio das raízes de framboeseira cv. Batum em função do tipo de meio de cultura e do tempo de cultivo no meio. Pelotas, RS, 2007.....	36
Tabela 7 - Número médio de gemas, número médio de folhas, número médio de brotações de framboeseira cv. Batum em função do local de incubação dos frascos e do tipo de tampa. Pelotas, RS, 2007.....	41
Tabela 8 - Peso médio da matéria fresca (mg) de framboeseira cv. Batum em função do tipo de tampa utilizado no fechamento dos frascos. Pelotas, RS, 2007.....	41
Tabela 9 - Número médio de brotações de amoreira-preta cv. Xavante em função do tipo de tampa utilizado para o fechamento dos frascos, do local de incubação dos frascos e de diferentes concentrações de sacarose no meio. Pelotas, RS, 2007.....	45
Tabela 10 - Número médio de raízes e comprimento médio de raízes de framboeseira cv. Batum em função do local de incubação dos frascos e do tipo de substrato utilizado para o enraizamento. Pelotas, RS, 2007.....	51

Tabela 11 - Peso médio da matéria-fresca (mg) de framboeseira cv. Batum em função do tipo de vedação dos frascos, local de incubação dos frascos, da concentração de sacarose e do tipo de substrato utilizado para o enraizamento. Pelotas, RS, 2007.....	53
--	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	4
METODOLOGIA GERAL.....	7
CAPÍTULO I - Influência do tipo de meio de cultura, de citocininas e concentração dos reguladores de crescimento na multiplicação <i>in vitro</i> de amoreira e framboeseira.....	8
1-INTRODUÇÃO.....	8
2-MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	10
4-CONCLUSÕES.....	21
CAPÍTULO II - Micropropagação de amoreira-preta: efeito do tipo de explante, concentração de sais e carvão ativado.....	22
1-INTRODUÇÃO.....	22
2-MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4-CONCLUSÕES.....	30
CAPÍTULO III - Tipo de meio, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento <i>in vitro</i> de amoreira e framboeseira.....	31
1-INTRODUÇÃO.....	31
2-MATERIAL E MÉTODOS.....	33

3-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4-CONCLUSÃO.....	38
CAPÍTULO IV - Uso de luz natural, efeito da concentração de sacarose e tipo de vedação dos frascos na multiplicação <i>in vitro</i> de amoreira e framboeseira.....	
1-INTRODUÇÃO.....	39
2-MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4-CONCLUSÃO.....	47
CAPÍTULO V - Enraizamento de framboeseira cv. Batum, sob condições fotoautotróficas.....	
1-INTRODUÇÃO.....	48
2-MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4-CONCLUSÃO.....	56
DISCUSSÃO GERAL.....	57
CONCLUSÕES GERAIS.....	59
REFERÊNCIAS.....	60
APÊNDICE.....	68

INTRODUÇÃO

São muitas as espécies que podem ser chamadas de pequenas frutas. Na lista dessas, podem estar incluídas amora-preta, morango, framboesa, mirtilo e physalis, que têm merecido atenção especial nos últimos anos por parte de produtores, comerciantes, consumidores e pesquisadores.

O cultivo de pequenas frutas no Brasil se iniciou com a chegada dos imigrantes alemães, que cultivavam principalmente morango e framboesa nos quintais de suas colônias, para o consumo da família. A framboesa, apesar de ter chegado ao Brasil praticamente junto com o morango, tem cultivo registrado, em escala comercial, no início da década de 90, na região de Campos do Jordão (SP), para abastecer agroindústrias, e em Vacaria, no Rio Grande do Sul.

Essas frutas têm a característica geral de exigência de muita mão-de-obra e trabalhos muito intensos, colaborando com a manutenção dos jovens no campo, principalmente, para as propriedades de agricultores familiares; há a real possibilidade de obtenção de alto retorno econômico em áreas de pequeno cultivo, num curto espaço de tempo, tendo em vista que, atualmente, a procura por essas frutas é maior que a oferta. Vários são os fatores que têm impulsionado produtores de frutas a ingressarem nesse ramo da fruticultura: dentre eles estão a difusão da informação, o interesse do consumidor, a atratividade em sabor e visual, bem como agressivas estratégias de marketing e, mais recentemente, a associação das pequenas frutas a propriedades nutricionais e terapêuticas (prevenindo problemas cardíacos, cancerígenos e retardando o envelhecimento, por exemplo) (PAGOT, 2004).

A região sul do Brasil tem grande potencial para a produção de pequenas frutas. Dentre as várias opções de espécies frutíferas com boas perspectivas de cultivo e comercialização, surge a amoreira-preta e a framboeseira.

A amoreira-preta é uma das espécies que têm apresentado sensível crescimento de área cultivada nos últimos anos no Rio Grande do Sul (principal

produtor brasileiro), com elevado potencial para os demais estados de características climáticas semelhantes. No Rio Grande do Sul, as maiores produções encontram-se nos municípios de Pelotas, Feliz, Farroupilha e Vacaria, sendo o último o maior produtor gaúcho (ANTUNES, 2006).

No Brasil, o cultivo de amora-preta só teve impulso em 1974, após a introdução de espécies americanas. A partir disso, iniciou-se o melhoramento genético, sendo desenvolvidas as primeiras cultivares brasileiras.

Atualmente, a área estimada de amora-preta no país é de 150 hectares, com produção de 1.350 toneladas/ano. A maior área está concentrada na região serrana do RS, com 90 hectares, sendo Vacaria o maior produtor brasileiro da fruta, com 60 hectares (ANTUNES, 2006). No Rio Grande do Sul, as áreas de cultivo de framboesa se restringem à região serrana, com 8,8ha, sendo que 8ha estão no município de Vacaria, e o restante em pequenos cultivos nos municípios de Antônio Prado, Farroupilha e Gramado. Nos demais estados do Brasil, sabe-se da produção de framboesas nas regiões de São Paulo e Minas Gerais (PAGOT, 2004).

Devido ao baixo custo de implantação, à manutenção do pomar e, principalmente, à reduzida utilização de defensivos agrícolas, as culturas tanto de amoreira-preta como de framboeseira apresentam-se como opção dentro da agricultura familiar. São culturas de retorno rápido, pois no segundo ano entram em produção, proporcionando ao pequeno produtor opções de renda, destinando seu produto ao mercado *in natura*, à indústria de produtos lácteos e congelados, à fabricação de geléias caseiras que, com o potencial do ecoturismo regional, torna-se bastante atraente para a agregação de valor ao produto (ANTUNES, 2006).

A propagação da amoreira-preta e da framboeseira é feita normalmente por estacas de raízes que, por ocasião do repouso vegetativo, são preparadas e enviveiradas em sacolas plásticas. Podem também ser usados brotos (rebentos) originados de plantas cultivadas, além de estacas herbáceas (ANTUNES, 1999) (RASEIRA; SANTOS; MADAIL, 1984). Outra alternativa viável é a cultura de tecidos, por meio da micropopagação, com o intuito de se obterem plantas livres de vírus em curto espaço de tempo (SANTOS; RASEIRA, 1988).

Através de técnicas como a micropopagação, o setor de mudas frutíferas tem obtido bons resultados, possibilitando, além do controle sobre a produção de mudas, um grande número de indivíduos de elevada qualidade sanitária. Dessa forma, a micropopagação torna-se uma ferramenta extremamente interessante no

setor de produção de mudas frutíferas, já que a tendência da fruticultura moderna está voltada para os plantios adensados, com a utilização de um maior número de mudas por hectare, e ao uso de mudas certificadas. Porém, a redução dos custos de produção de mudas micropropagadas é de extrema importância para que se torne viável comercialmente; daí surge o sistema de micropopagação fotoautotrófica (produção de micropropágulos com reduzida concentração de sacarose no meio de cultura) e uso de luz natural.

No entanto, para o início do processo de micropropagação, torna-se necessária a elaboração de um protocolo específico para cada cultura, que venha a suprir suas necessidades e exigências no cultivo *in vitro*.

Assim, este trabalho teve como objetivo determinar a constituição do meio de cultura que propicie os melhores resultados, tanto na multiplicação como no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta *Xavante* e framboeseira *Batum* e *Heritage*, sob condições convencionais de micropropagação. A partir dos resultados obtidos na micropropagação convencional, adaptou-se o protocolo para a micropropagação fotoautotrófica com variações da concentração de sacarose no meio de cultura e vedação dos frascos.

REVISÃO DE LITERATURA

A amoreira-preta, assim como a framboeseira, fazem parte de um grande grupo de plantas do gênero *Rubus*. Esse gênero pertence à família Rosaceae, na qual existem outros gêneros de importância (*Malus*, *Prunus*, *Pyrus*, entre outros) para a fruticultura brasileira. O gênero *Rubus* forma um grupo diverso e bastante difundido, para o qual se estima existir entre 400 e 500 espécies de framboesa e amoreira-preta na América, Europa, África e Ásia (POLING, 1996, apud ANTUNES, 2006).

A amoreira-preta é uma espécie arbustiva de porte ereto ou rasteiro, que produz frutos agregados, com cerca de 4 a 7 gramas, de coloração negra e sabor ácido a doce-ácido. A framboesa é frequentemente confundida com a amora-preta, porém há algumas diferenças que nos permitem identificá-las; a mais evidente refere-se ao fruto: enquanto o da framboesa é oco, o da amora-preta não (GLOBO RURAL, 2007). A framboeseira caracteriza-se por ser um pouco mais rasteira que a amora, e seus frutos são arredondados, constituindo-se em um fruto agregado com 75 a 80 pequenos gomos, de coloração rosa-avermelhada e sabor adocicado (TODA FRUTA, 2007)

A framboesa (*Rubus idaeus* L.) no Brasil foi introduzida na região de Campos do Jordão, SP, destinada ao abastecimento de pequenas agroindústrias da região. Essa pequena fruta tem sido a de menor oferta no mercado e também a de menor área de produção. Isso se deve basicamente a limitações técnicas e às adversidades climáticas da região, sendo a sensibilidade da planta e da fruta à alta pluviometria e umidade relativa do ar as principais limitações (PAGOT, 2004).

A cultura de tecidos é uma técnica que proporciona, com sucesso, a propagação massal de frutíferas, e já vem sendo utilizada com eficientes resultados para a produção de mudas no Brasil em outros países, como por exemplo, de mirtilo no Uruguai (CASTILLO et al., 2004). Segundo esses mesmos autores, a micropropagação permite a obtenção de uma grande quantidade de plantas utilizando pequena quantidade de material vegetal original, restringindo ou minimizando a limitação que a baixa oferta de mudas constitui para a expansão das

culturas. Em comparação com as técnicas de propagação tradicional, a micropropagação apresenta significativas vantagens, dentre as quais a possibilidade de propagar rapidamente em larga-escala novos genótipos, obter plantas livres de doenças e propagar vegetativamente espécies vegetais difíceis de serem propagadas por outros métodos.

Entretanto, para que a aplicação da micropropagação na fruticultura torne-se viável comercialmente e possa competir com métodos tradicionais de propagação (estaquia, etc), é necessária a redução do custo de produção (ALTMAN, 1999), que se deve, em grande parte, às perdas causadas pela contaminação *in vitro* e pelas desordens fisiológicas e morfológicas nas plantas, à baixa percentagem de sobrevivência no estágio de aclimatização às condições *ex vitro*, à necessidade de mão-de-obra, de certa forma especializada, para a intensiva manipulação dos frascos e das plantas (KURATA e KOZAI, 1992) e (KOZAI e KUBOTA, 2001), e, principalmente, ao elevado custo de funcionamento e manutenção das salas de crescimento com regimes de luz artificial e temperatura controlada, onde as culturas *in vitro* são normalmente incubadas (STANDAERT DE METSENAERE, 1991) (KODYM; ZAPATA-ARIAS, 1999).

Diante disso, o desenvolvimento de sistemas de micropropagação fotoautotrófica (produção de micropropágulos sem adição de sacarose no meio de cultura e sob condições ambientais que promovam a fotossíntese na planta) com o uso de luz natural surge como possibilidade que apresenta potencial para aumentar a eficiência da micropropagação e auxiliar na redução de seu custo (KUBOTA; TADOKORO, 1999).

Quando plantas são cultivadas *in vitro*, em meio de cultura sem açúcar, existe a necessidade de se aumentar a intensidade luminosa e a difusão de CO₂ e da umidade (vapor da água) em volta da planta (KOZAI e NGUYEN 2003), para promover a fotossíntese, a transpiração e o acúmulo de matéria seca (AITKEN-CHRISTIE et al., 1995, KITAYA et al., 1997). O aumento da intensidade luminosa tem-se conseguido substituindo a luz artificial pela luz natural, com a manutenção das plantas em casa-de-vegetação, ou por meio do uso de janelas externas na sala de crescimento (KODYM E ZAPATA-ARIAS 1999) ou clarabóias no telhado (KODYM et al., 2001). Na micropropagação de bananeiras, a maior taxa de multiplicação foi obtida em casa-de-vegetação e em sala de crescimento com luz natural e, por

último, em sala de crescimento convencional (KODYM; ZAPATA-ARIAS, 1999) (KODYM; ZAPATA-ARIAS, 2001).

Algumas vantagens da micropropagação fotoautotrófica associada à luz natural, em relação ao método convencional de micropropagação, incluem ganhos no crescimento das plantas, redução do risco de contaminação microbiana (em virtude da remoção da sacarose do meio de cultura), melhoria das características fisiológicas da planta (devido às condições ambientais de cultivo serem mais naturais), redução do estresse da planta durante a aclimatização (aumentando a porcentagem de sobrevivência das mudas), (HEMPEL 1994; ZOBAYED, AFREEN e KOZAI, 2000, 2001; AFREEN, ZOBAYED e KOZAI, 2002; KOZAI et al, 2003), eliminação dos custos com iluminação e redução dos custos com reparos e manutenção e, ainda, possibilidade de utilização de instalações simplificadas, reduzindo os custos das construções (KODYM; ZAPATA-ARIAS, 1999).

As pesquisas com o intuito de utilização da luz natural na micropropagação fotoautotrófica são praticamente inexistentes, apesar de haver fortes razões para sua pesquisa e implementação no Brasil, principalmente pela disponibilidade de luz natural ao longo do ano e por necessitarmos de novas tecnologias para o setor de produção de mudas (ERIG; SCHUCH, 2005).

METODOLOGIA GERAL

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micropropagação de Plantas Frutíferas e na casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), em Pelotas, RS.

As espécies estudadas foram a framboeseira cvs. Batum e Heritage e a amoreira-preta cv. Xavante. O material vegetal utilizado nos experimentos foi obtido de plantas previamente estabelecidas *in vitro*, cuja manutenção foi realizada através de repicagens.

A execução do projeto foi subdividida em duas etapas, denominadas:

* Estudos preliminares;

*Estudo da micropropagação fotoautotrófica com uso da luz natural.

Os estudos preliminares foram realizados com o objetivo de definir a constituição do meio de cultura que propicie os melhores resultados, tanto na multiplicação como no enraizamento *in vitro* das espécies de pequenas frutas, sob condições convencionais de micropropagação, isto é, em sala de crescimento no laboratório, com 16 horas de fotoperíodo, temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e densidade de fluxo de fótons do período de luz de $27\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fornecido por lâmpadas fluorescentes brancas-frias.

A partir dos resultados obtidos nos estudos preliminares, foi realizado o estudo da micropropagação fotoautotrófica com uso da luz natural. Nessa etapa, foi utilizada a constituição do meio de cultura que propiciou os melhores resultados, tanto na multiplicação como no enraizamento *in vitro*, sob condições convencionais de micropropagação, para então serem estudados outros fatores relacionados à micropropagação fotoautotrófica de amoreira-preta e framboeseira frutas, com o uso de luz natural.

CAPÍTULO I

Influência do meio de cultura, citocininas e concentração dos reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira

1. INTRODUÇÃO

Muitas espécies do gênero *Rubus*, ao qual pertencem a framboesa e a amora-preta, são originárias da região mediterrânea, têm uma longa história de cultivo e hoje encontram-se disseminadas pelo mundo (ANTUNES, 1999).

Os maiores produtores de amora-preta na América do Sul são a Argentina e o Chile (JENNINGS; MCNICOL, 1991 apud VILLA et al., 2006). O Brasil, apesar de seu grande potencial, não apresenta produção significativa dessas frutas. Os estados que se destacam na produção de amora-preta e de framboesa são: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e sul de Minas Gerais, restringindo-se, neste Estado, ao plantio na EPAMIG/Fazenda Experimental de Caldas, localizado no município de Caldas. Barbacena, Planalto de Poços de Caldas e a região da Alta Mantiqueira.

A propagação da amoreira-preta e da framboeseira é feita normalmente por estacas de raízes que, por ocasião do repouso vegetativo, são preparadas e enviveiradas em sacolas plásticas. Podem também ser usados brotos (rebentos) originados de plantas cultivadas, além de estacas herbáceas (ANTUNES, 1999); (RASEIRA; SANTOS; MADAIL, 1984). Outra alternativa viável é a cultura de tecidos, por meio da micropropagação, com o intuito de se obterem plantas livres de vírus, geneticamente uniformes e em curto espaço de tempo (SANTOS; RASEIRA, 1988).

Entretanto, a elevada variabilidade de comportamento *in vitro* obriga a se desenvolverem condições específicas de cultivo, pois nem todas as espécies do

gênero *Rubus* possuem grande coeficiente de propagação *in vitro* (LEONTIEV-ORLOV, 1989 apud VILLA et al., 2006).

Na micropropagação é realizado o cultivo de plantas ou partes de plantas, também chamados de explantes, em meio de cultura e ambiente asséptico, controlando temperatura, fotoperíodo, umidade e irradiância, em local apropriado chamado *sala de crescimento*. Dentro dessa técnica existe a fase de multiplicação, cujo principal objetivo é produzir o maior número de plantas no menor espaço de tempo (SCHUCH; ERIG, 2005).

No meio de cultura, além das formulações básicas dos meios normalmente utilizados, como o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (WPM), Wood Plant Medium, (LLOYD; MCCOWN, 1980), entre outras, a utilização de fitoreguladores é imprescindível para que se obtenha sucesso na propagação de culturas *in vitro*. O tipo de citocinina e a sua concentração são fatores que influenciam no sucesso da multiplicação *in vitro* e, segundo Grattapaglia e Machado (1998), são fatores indispensáveis no auxílio durante o processo de superação da dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares. Desse modo, ocorre um grande número de brotações por meio do crescimento de meristemas laterais (SRISKANDARAJAH; MULLINS; NAIR, 1982).

A utilização de 6-benzilaminopurina (BAP) tem revelado eficiência no processo de multiplicação tanto de estruturas aéreas como na indução de gemas adventícias em diversas espécies (HU; WANG, 1983), e vem sendo a citocinina a mais utilizada, seguida pela cinetina e isopenteniladenina (2iP). Para multiplicação em meio de cultura, em geral, suas concentrações variam de 0,1 a 5mgL⁻¹ (TOMBOLATO; COSTA, 1998).

Com o presente experimento, objetivou-se avaliar o melhor meio de cultura, o efeito das citocininas e suas concentrações na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta 'Xavante' e de framboeseira 'Batum' e 'Heritage'.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho, realizado no Laboratório de Micropropagação de Plantas Frutíferas, do Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel

(FAEM), da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), em Pelotas, RS, constituiu-se de 3 experimentos:

1º experimento: realizado com amoreira-preta 'Xavante';

2º experimento: realizado com framboeseira 'Batum';

3º experimento: realizado com framboeseira 'Heritage'.

O material vegetal utilizado no experimento foram segmentos nodais caulinares de plantas de amora-preta 'Xavante' e framboesa 'Batum' e 'Heritage', de aproximadamente 1cm de comprimento, duas gemas axilares por explante e o ápice excisado, provenientes de plantas mantidas *in vitro*. Os fatores estudados foram o tipo de meio de cultura: MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e WPM – Wood Plant Medium (LLOYD; MCCOWN, 1980), e o tipo de citocinina: Zeatina, isopenteniladenina (2iP) e 6-benzilaminopurina (BAP) em quatro diferentes concentrações no meio de cultura (0; 7,5; 15 e 22,5 μM), no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2X3X4, totalizando 24 tratamentos com quatro repetições. Cada repetição foi constituída de um frasco com cinco explantes. Utilizou-se, para o meio MS e WPM, 30g.L⁻¹ de sacarose, 100mg.L⁻¹ de mio-inositol e 6g.L⁻¹ de ágar, sendo o pH ajustado para 5,8, antes da inclusão do agar e, posteriormente autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos.

Após a inoculação, os explantes foram transferidos para a sala de crescimento com temperatura de 25 \pm 2°C, luminosidade de 27 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas, permanecendo nessas condições por 30 dias.

As variáveis-resposta analisadas foram número de brotações, gemas e folhas por explante e, ainda, o comprimento da brotação. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan e regressão polinomial, através do programa estatístico WinStat (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2002).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Experimento 1: Amoreira-preta 'Xavante'

Houve efeito significativo da interação tripla entre o tipo de meio de cultura, de citocinina e a concentração do regulador de crescimento. O número de brotações da cultivar Xavante foi estimulado pelo aumento da concentração de BAP em meio

MS. Maior número de brotações por explante foi obtido em meio MS com 13,33 μ M de BAP (Fig. 1).

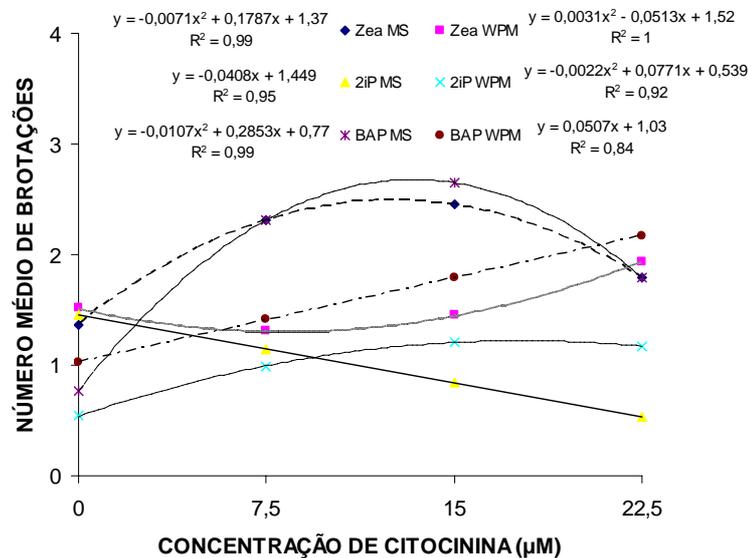


Figura 1 - Número médio de brotações de amoreira-preta cv. Xavante em função do tipo de meio de cultura, tipo de citocinina e da concentração de citocinina. Pelotas, RS, 2007.

Com o aumento das concentrações de BAP e Zeatina, em meio MS, pode-se constatar que houve um aumento no número de brotações até a concentração de 13,33 μ M e 12,6 μ M, respectivamente; logo, observa-se um decréscimo da variável analisada. Para BAP em meio WPM, observa-se uma tendência linear: aumento da concentração de BAP aumenta o número de brotações. Villa et al. (2005), trabalhando com amoreira-preta 'Ébano', observaram queda no número de brotos com maior concentração de BAP. Esses mesmos autores obtiveram maior número de brotos com a utilização de 150% de sais no meio MS. Já Brum (2001) obteve maior número de brotos em figueira cultivar Roxo de Valinhos com WPM.

Em trabalho com macieira, Yui (1990) observou melhores resultados com a aplicação de 5,0mg L⁻¹ (22,2 μ M) de BAP, comprovando que esse regulador de crescimento deve ser incorporado ao meio de cultura para estimular a taxa de multiplicação dos brotos.

Villa et al. (2006), com a utilização de 1,0mg L⁻¹ (4,4 μ M) de BAP associado a 100% de meio WPM, obtiveram maior número médio de brotos/planta em amoreira-preta cv. Brazos. Porém, esses mesmos autores, trabalhando com a cultivar Ébano

de amoreira-preta, obtiveram maior número de brotos com a utilização de 150% de sais do meio MS.

O número de folhas da cultivar Xavante de amoreira-preta foi estimulado pelo aumento da concentração de BAP e Zeatina com meio MS, observando uma interação tripla entre o tipo de meio de cultivo, tipo de citocinina e a concentração do regulador de crescimento. Maior número de folhas foi observado no meio MS com 13 μ M de BAP (Fig. 2).

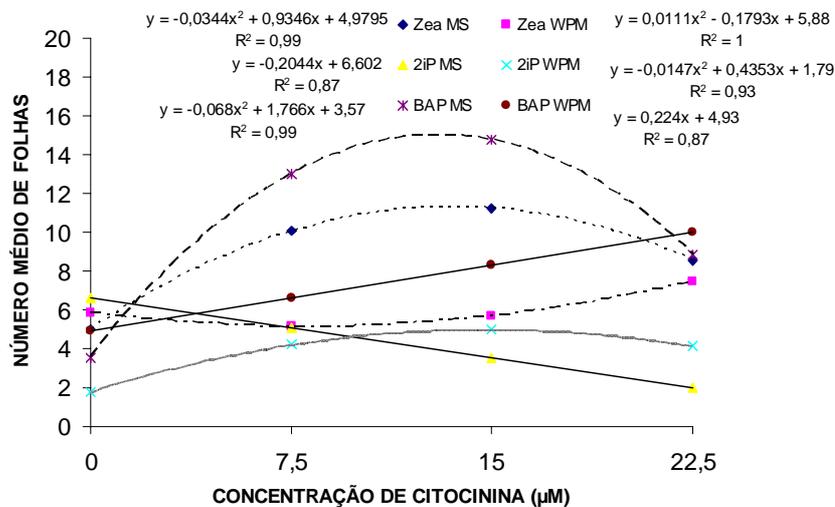


Figura 2 - Número médio de folhas de amoreira-preta cv. Xavante em função do tipo de meio de cultura, tipo de citocinina e da concentração de citocinina. Pelotas, RS, 2007.

Com o aumento das concentrações de BAP com meio MS, pode-se constatar que houve aumento no número de folhas até a concentração 13 μ M; logo, observa-se um decréscimo para a variável. Resultados semelhantes foram obtidos por Villa et al. (2005), trabalhando com amora-preta 'Ébano', que demonstrou queda no número de folhas com o aumento da concentração de BAP. Oliveira (1994), trabalhando com crisântemo, também observou queda no número de folhas com o aumento das concentrações de BAP. Isso pode ser atribuído ao fato de o regulador de crescimento BAP estimular a formação de maior número de brotos, porém de tamanho reduzido, apresentando menor número de segmentos nodais e folhas.

Para a variável comprimento médio das brotações, observa-se uma interação tripla entre o tipo de meio de cultura, tipo de citocinina e sua concentração.

Maior comprimento foi observado em meio MS, sem adição do regulador de crescimento. Com adição de 2iP com meio MS, o comportamento foi linear descendente, indicando que, com a adição da citocinina 2iP, há uma queda no comprimento das brotações. Já com meio WPM, observa-se um aumento do comprimento das brotações até a concentração de 15,5 μM de 2iP (Fig. 3).

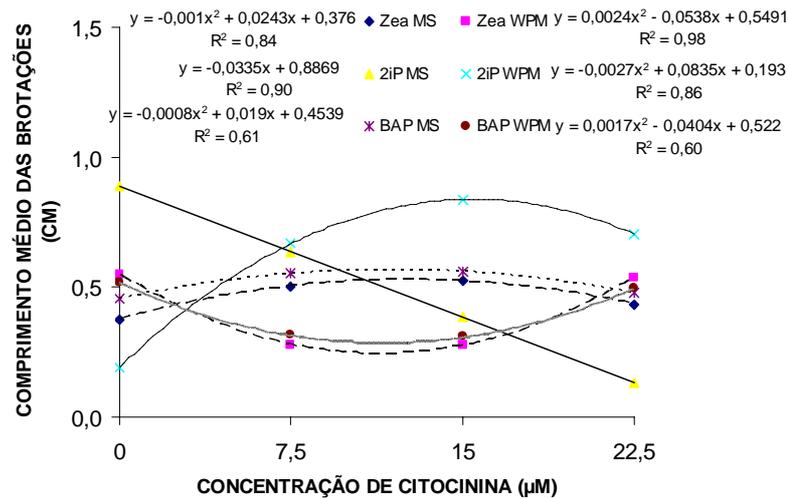


Figura 3 - Comprimento médio das brotações de amoreira-preta cv. Xavante em função do tipo de meio de cultura, tipo de citocinina e da concentração de citocinina. Pelotas, RS, 2007.

Villa et al. (2006), trabalhando com a amoreira-preta 'Ébano', obtiveram maior comprimento das brotações (2,83cm) em meio MS 50%, com 0,5 mg L⁻¹ (2,2 μM) de BAP. Na ausência dessa citocinina no meio MS 150% de sais, houve um comprimento de brotação de, 3,79 cm.

Pasqual et al. (1991) observaram que brotos mais alongados da cultivar 'Ébano' de amoreira-preta são obtidos com 1,0 mg L⁻¹ de BAP, 0,001 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftaleno acético) e que a adição de AG₃ (ácido giberélico) ao meio com 1,0mg L⁻¹ de BAP e 0,001mg L⁻¹ de ANA resulta em um significativo aumento de número de broto por gema.

Grattapaglia e Machado (1998) indicaram que a maior eficiência do BAP em relação às citocininas CIN e 2iP pode estar na capacidade dos tecidos vegetais de metabolizarem os reguladores de crescimento naturais mais rapidamente do que

reguladores de crescimento sintéticos. Segundo os autores, isso pode variar em função da espécie de planta utilizada.

George (1993) constatou em *Gerbera* que as citocininas ZEA e 2iP podem apresentar inatividade por serem rapidamente degradadas pela ação da enzima natural citocinina oxidase, pela quebra da dupla ligação da cadeia lateral da molécula. Esse fato poderia explicar os baixos índices de multiplicação alcançados nos tratamentos com essas citocininas.

Welander (1995), em trabalho de micropropagação de amoreira, também concluiu que o BAP foi superior a outras citocininas (2iP, ZEA e CIN) testadas na multiplicação. Krikorian (1991) comenta que o BAP tem sido mais utilizado atualmente que as citocininas CIN e ZEA por ser um composto mais ativo, que se encontra facilmente e com custo razoável. O autor completa, ainda, que as adenilcitocininas (ZEA e CIN, por exemplo) somente apresentaram atividade na presença de uma auxina, como o AIA, por exemplo, em pesquisas com cenoura e medula de tabaco. Esse fato pode explicar as baixas taxas de multiplicação alcançadas por essas citocininas.

3.2 Experimento 2: Framboeseira 'Batum'

Houve efeito significativo da interação entre tipo de meio de cultura e concentração de citocinina para as variáveis número médio de gemas, número médio de folhas e número médio de brotações. Não houve interação desses fatores para a variável comprimento médio das brotações.

Com o aumento das concentrações de citocinina, pode-se constatar que houve aumento para todas as variáveis citadas anteriormente. Maior média para as variáveis foi observado em meio WPM com 13 μ M de citocinina (Fig. 4).

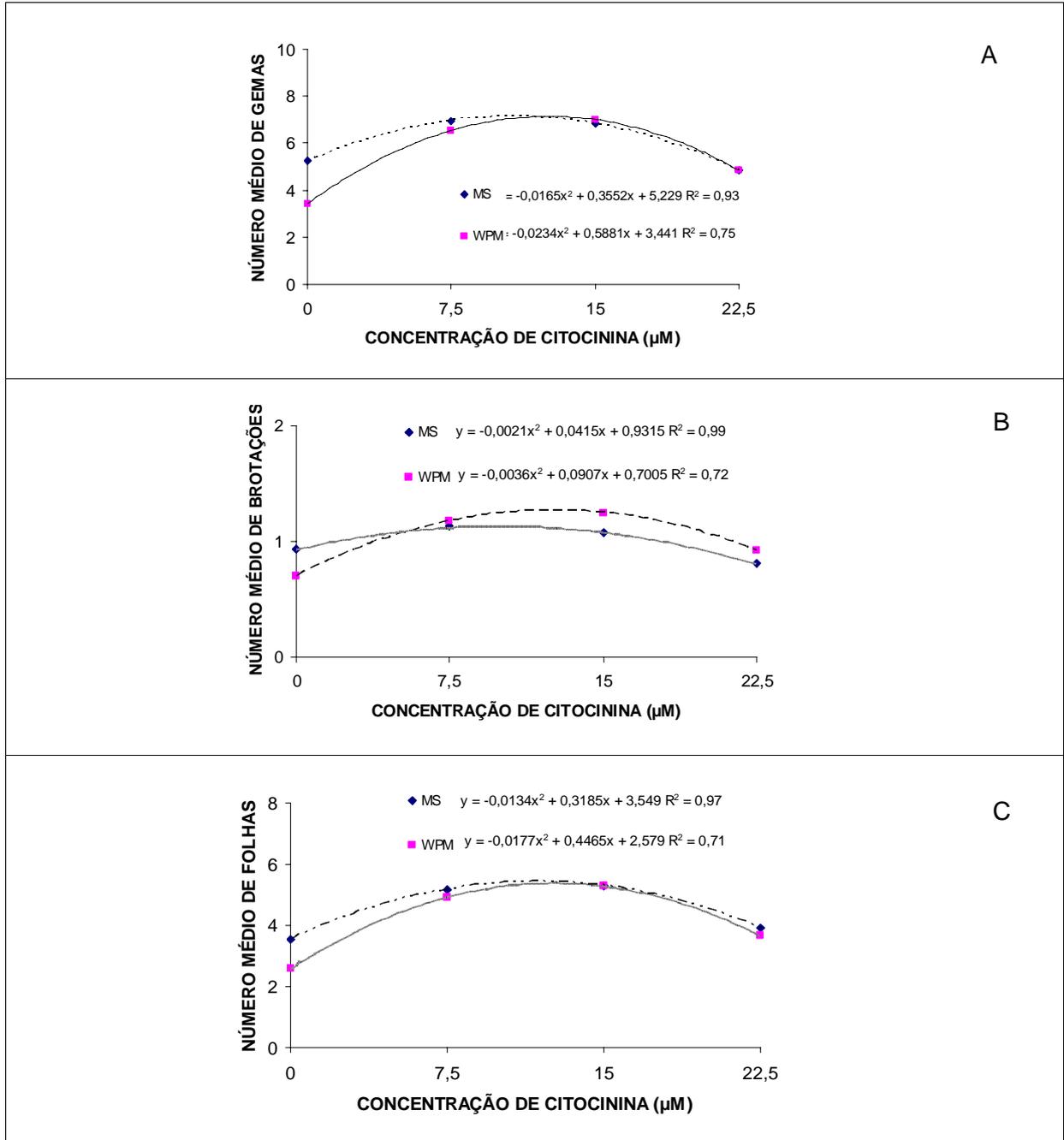


Figura 4 - Número médio de gemas (A), número médio de brotações (B) e número médio de folhas (C) de framboeseira cv. Batum em função do tipo de meio de cultura e da concentração de citocinina no meio de cultura. Pelotas, RS, 2007.

Villa et al. (2006) obtiveram maior número de brotações e comprimento das mesmas em meio WPM adicionado de $0,1\text{mg L}^{-1}$ de BAP. A utilização de WPM implicaria maior custo de semelhante volume de solução, não justificando, portanto, a utilização desse meio de custo mais elevado. Em meio MS, observam-se maiores

médias para as variáveis número de gemas, brotações e folhas com o acréscimo de 11 μ M, 10 μ M e 12 μ M de citocinina, respectivamente.

Dzazio, Biasi e Zanette (2002), trabalhando com porta-enxerto de videira '420 - A', testaram diferente meio de cultura para o alongamento e multiplicação in vitro e observaram que o meio MS com concentração normal de sais apresentou resultados inferiores para o comprimento de brotação principal, número de folhas do explante e porcentagem de gemas axilares brotados, sendo o melhor meio de cultura, o MS / 2 isento de reguladores de crescimento.

Silveira et al. (2001), verificaram que o melhor meio de cultivo para multiplicação in vitro de porta-enxertos do gênero *Prunus*: G x N₂₂ e Mr.S 2/5 foi o MS $\frac{3}{4}$ com 0,7mg L⁻¹ de BAP. Já para o 'Marianna', o melhor meio foi MS com 0,7mg L⁻¹ de BAP, e para o 'Mirabolano' foi o MS $\frac{3}{4}$ com 0,5mg L⁻¹ de BAP.

O número médio de gemas e de folhas da cultivar Batum foi estimulado pelo aumento da concentração de BAP, observando a interação entre o tipo de citocinina e sua concentração. Para a variável número de brotações não houve interação entre estes dois fatores (Fig.5).

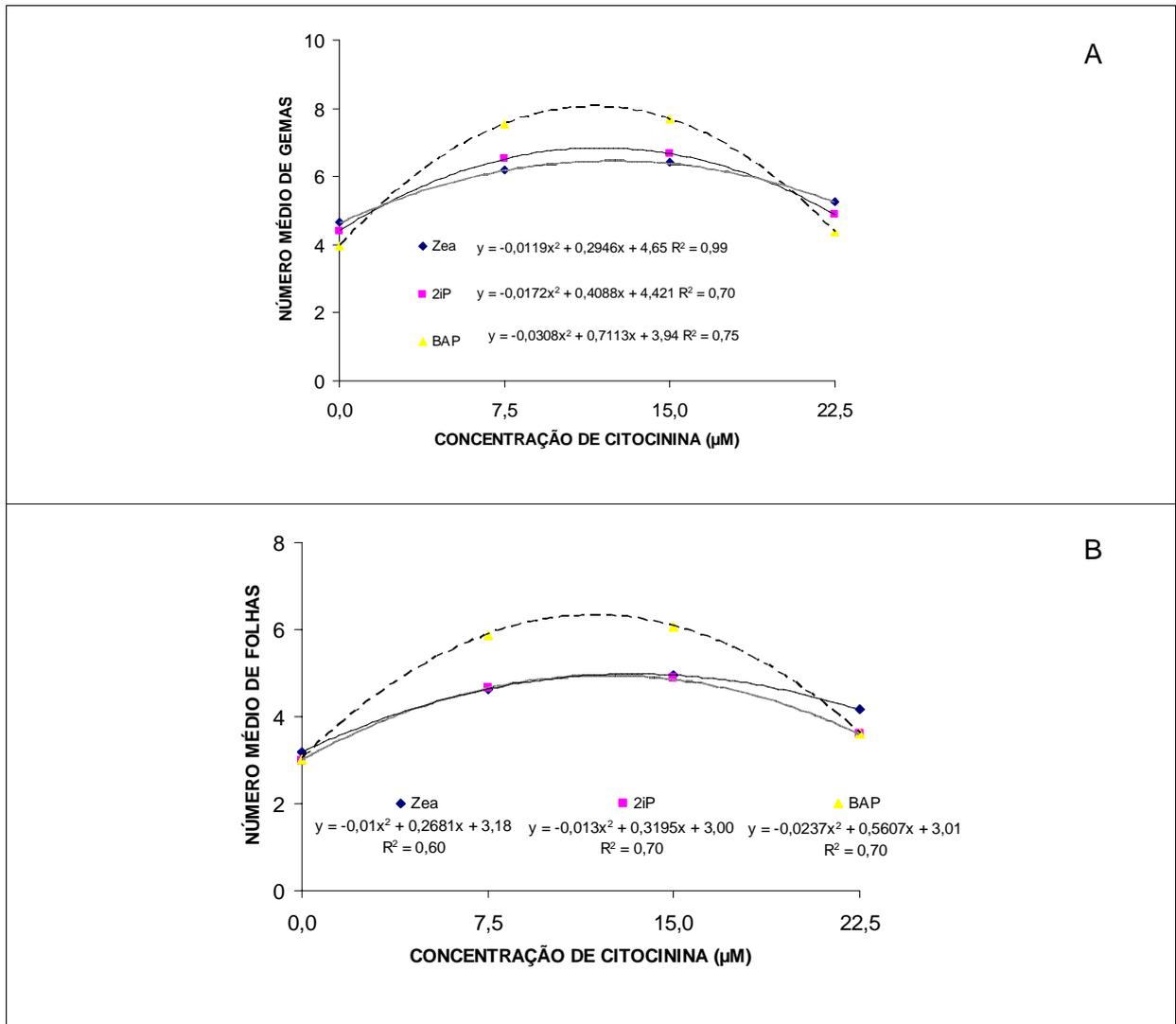


Figura 5. Número médio de gemas (A) e número médio de folhas (B) de framboeseira cv. Batum em função do tipo e da concentração de citocinina no meio de cultura. Pelotas, RS, 2007.

Maior número de gemas e de folhas foi observado com as concentrações 11,5 μM e 11,8 μM de BAP. O comportamento foi quadrático, indicando que houve aumento até o ponto de máxima, depois mostrando certo decréscimo. O resultado está de acordo com Rogalski et al. (1999) e Rogalski e Leontiev-Orlov (1999), que, na multiplicação *in vitro* de ameixeira, observaram uma diminuição do número de brotos com o aumento da concentração de BAP, e obtiveram melhor resultado na concentração de 0,1 mg L⁻¹ de BAP.

Entretanto, esses resultados diferem de Erig et al. (2002), os quais obtiveram máxima indução de multiplicação de brotações também aos 28 dias de cultivo em meio MS e na presença de BAP com concentrações de 2, 4 e 6 μM .

Leontiev-orlov et al. (2000) testaram diferentes concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* da prunáceas (*Prunus* sp.) e observaram maior multiplicação de brotos quando utilizada a concentração 0,75mg. L⁻¹ de BAP.

Rápida proliferação de gemas axilares de amoreira-preta, cultivares Thornless Boysenberry e Thornless Yongberry, foi obtida em meio MS acrescido de 2,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de ANA (SKIRVIN; CHU; GOMEZ, 1981).

Villa et al. (2005) obtiveram maior número de folhas em meio MS e 1,0 mg L⁻¹ de BAP (4,44 µM) para amoreira-preta 'Ébano', diferindo dos resultados encontrados nesse trabalho, no qual se obteve maiores número de folhas com a adição de 11,8µM de BAP.

Porém, observa-se, na tab. 1, para a variável comprimento das brotações, um efeito isolado do tipo de citocinina. Os resultados referentes à zeatina são estatisticamente superiores às demais citocininas estudadas.

Tabela 1 - Comprimento das brotações de framboeseira cv. Batum em função da citocinina utilizada no meio de cultivo. Pelotas, RS, 2007.

Tipo de citocinina	Comprimento da brotação (cm) *
Zeatina	0,8 a
2iP	0,64 b
BAP	0,55 b
CV (%)	40,72

* Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

3.3 Experimento 3: Framboeseira 'Heritage'.

Houve efeito significativo da interação entre o tipo de meio de cultura e concentração de citocinina para as variáveis número médio de gemas, número médios de brotações, número médio de folhas e comprimento médio das brotações (Fig. 6). Em meio MS, à medida que aumenta a concentração de citocinina no meio MS, observa-se aumento do número de gemas, brotações, comprimento das brotações e no número médio de folhas.

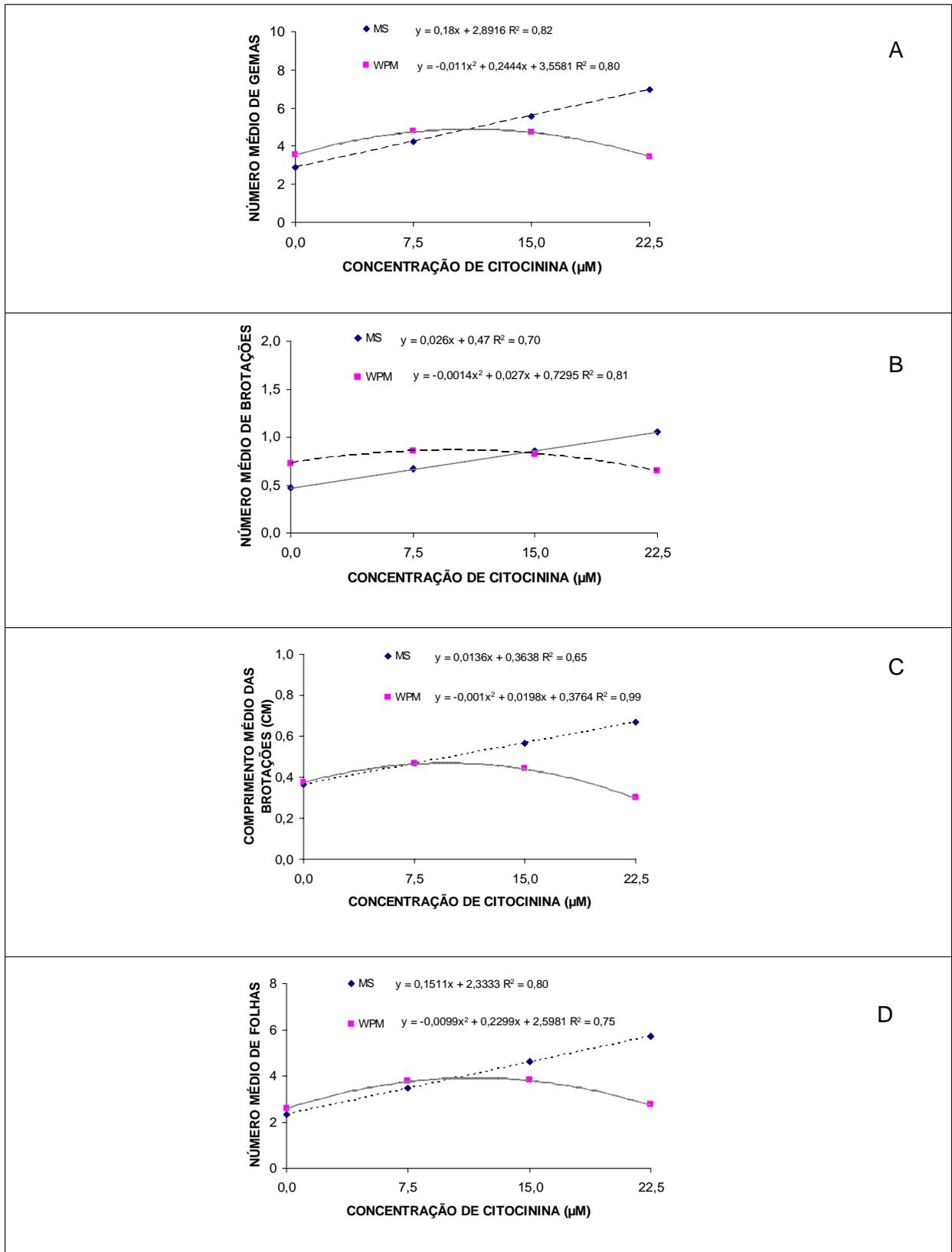


Figura 6 - Número médio de gemas (A), número médio de brotações (B) comprimento médio das brotações (C), número médio de folhas (D) de framboeseira cv. Heritage em função do tipo de meio e da concentração de citocinina no meio de cultura. Pelotas, RS, 2007.

O resultado referente à variável número de gemas, brotações e de folhas, de framboeseira cv. Heritage, em meio MS, foi representado por uma tendência linear ascendente. Com o aumento na concentração de citocinina, houve um aumento das médias das variáveis citadas. Leontiev-Orlov et al. (2000), trabalhando com multiplicação de prunáceas, obtiveram melhores resultados utilizando concentrações entre 0,25 e 0,75mg L⁻¹ de BAP (Fig. 6).

Observa-se, na tab. 2, efeito isolado do fator tipo de citocinina para as variáveis número médio de gemas, de folhas e comprimento médio das brotações.

Maiores médias foram alcançadas com a utilização de 2iP e BAP, para número médio de folhas, diferindo estatisticamente da citocinina Zeatina. Para número médio de gemas observa-se maiores médias com a utilização de 2iP e BAP; já para o comprimento das brotações observa-se maiores médias com 2iP, não diferindo da citocinina zeatina. A utilização de Zeatina ou 2iP implicaria maior custo de semelhante volume de solução em relação ao uso de BAP, não justificando, portanto, a utilização destas no meio de cultivo.

Tabela 2 - Número médio de gemas, número médio de folhas e comprimento médio das brotações de framboeseira cv. Heritage em função do tipo de citocinina. Pelotas, RS, 2007.

Tipo de Citocinina	Número médio de gemas	Número médio de folhas	Comprimento médio das brotações
2iP	5,29 a	4,14 a	0,56 a
BAP	4,71 ab	3,93 a	0,35 b
Zeatina	3,59 b	2,83 b	0,46 ab
CV (%)	26,86	26,91	48,89

* Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5%.

Resultado semelhante foi encontrado por Leontiev-orlov et al. (2000b), os quais concluíram que a presença de BAP no meio ocasiona menor comprimento médio dos brotos. Dustan et al. (1992) afirmam que a adição de BAP ao meio de cultura nem sempre proporciona adequado alongamento das brotações.

Villa et al. (2005), trabalhando com amoreira-preta 'Ébano', obtiveram, com o uso de BAP no comprimento das brotações, uma diminuição de acordo com o aumento da concentração do BAP. Esses resultados concordam com a maioria dos autores, que afirmam que esse regulador de crescimento não é responsável pelo

alongamento dos brotos (EARLE; LANGHANS, 1974); (PAIVA et al., 1997b); (TAIZ; ZEIGER, 1991).

Paiva et al. (1997a), trabalhando com *Gloxínia*, observaram também uma redução do tamanho de brotos com o aumento das concentrações de BAP, e alguns autores têm observado os mesmos resultados negativos desse regulador de crescimento no alongamento das brotações em espécies como crisântemo e morangueiro (OLIVEIRA,1994; PASQUAL et al., 2002).

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que o meio MS adicionado de 13 μ M de BAP promove a multiplicação *in vitro* de amoreira-preta 'Xavante'.

Maior número de folhas, gemas e brotações de framboesa 'Batum' e 'Heritage' foram obtidas em meio MS acrescido de 12 μ M de BAP.

Maior comprimento de brotações de framboeseira 'Batum' foi obtido com Zeatina e de 'Heritage' foi 2iP.

CAPÍTULO II

Efeito da concentração de sais, do tipo de explante, de carvão ativado na multiplicação e no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta 'Xavante'

1. INTRODUÇÃO

A amoreira-preta é uma espécie cultivada nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. O processo de micropropagação apresenta diversas vantagens em relação aos métodos tradicionalmente utilizados na propagação de amoreira-preta, especialmente quanto à maior sanidade das mudas. Uma importante etapa da micropropagação, além da multiplicação, refere-se ao enraizamento das microestacas obtidas. O enraizamento é uma etapa que define o resultado final da micropropagação, e consiste da formação de raízes adventícias nas partes aéreas.

Vários autores têm relatado a possibilidade de reduzir a concentração de sais do meio MS, para diversas espécies, visando ao melhor desenvolvimento das plantas e redução nos custos (GEORGE; SHERRINGTON, 1984). Paiva et al. (1997a) utilizaram 50% dos sais do meio MS, obtendo um bom desenvolvimento *in vitro* de gloxínia. Concentrações de sais no meio básico MS reduzidas a 1/2, 1/3 ou 1/4 possibilitaram melhor enraizamento *in vitro* de amoreira-preta, cultivar Cainguangue (DANTAS et al., 2000).

Dentre os reguladores de crescimento comumente usados no cultivo *in vitro* da amoreira-preta, estão o BAP e o ácido indol-butírico (AIB) (DONNELLY, et al., 1980).

Vários são os trabalhos que citam a utilização de carvão ativado na micropropagação de espécies frutíferas tais como ameixeira, framboeseira, morangueiro, macieira, videira, abacaxizeiro e bananeira.

Espécies lenhosas são beneficiadas com o uso de carvão ativado quando enraizadas *in vitro*. Dotada de uma alta capacidade de adsorção, essa substância tem a propriedade de modificar a composição dos meios de cultura, adsorvendo substâncias promotoras de enraizamento e também, substâncias tóxicas, fenóis e/ou quinonas, produzidas durante a autoclavagem ou liberadas de explantes cujos tecidos sofreram injúrias. Outra propriedade atribuída ao carvão ativado, como sendo benéfica ao processo de enraizamento, é quanto à redução da intensidade de luz na região de formação de raízes; porém, concentrações elevadas de carvão ativado podem até mesmo impedir o processo de enraizamento (ASSIS; TEIXEIRA, 1998).

Objetivou-se com estes trabalhos determinar o melhor tipo de explante e a melhor concentração de sais do meio de cultivo para a multiplicação *in vitro*, bem como determinar as melhores concentrações de carvão ativado e de sais do meio de cultivo para o enraizamento *in vitro* de amoreira-preta cv. Xavante.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi dividido em dois experimentos:

1º Experimento: Multiplicação *in vitro* de amoreira-preta cv. Xavante;

2º Experimento: Enraizamento *in vitro* de amoreira-preta cv. Xavante.

Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação de Plantas Frutíferas, do Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), em Pelotas, RS.

Para o primeiro experimento, utilizou-se segmentos nodais caulinares, com duas gemas e o ápice excisado, de cerca de 1cm, oriundas do cultivo *in vitro* de amoreira-preta cv. Xavante. Os fatores estudados foram: concentração dos sais do meio de cultura (50, 75, 100 e 125%) e tipo de explante (explante com folha e explantes sem folhas), no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4X2, totalizando 8 tratamentos com quatro repetições, sendo cada repetição constituída por um frasco com cinco explantes. Utilizou-se para o experimento meio

MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de 7,5 μM de BAP, 30g L^{-1} de sacarose, 100mg L^{-1} de mio-inositol e 6g L^{-1} de ágar, sendo o pH ajustado para 5,8, antes da inclusão do ágar e, posteriormente autoclavado a 121°C e 1,5atm por 20 minutos.

Após a inoculação, os explantes foram transferidos para a sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, luminosidade de $27\mu\text{mols.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. Após 30 dias foi avaliado o número de brotações, gemas e folhas por explante e o comprimento das brotações.

Para o segundo experimento foram utilizados microestacas apicais com duas folhas, de cerca de 1 a 1,5cm, obtido de plantas *in vitro* de amoreira-preta cv. Xavante. Os fatores estudados foram: concentração dos sais do meio de cultura (50, 75 e 100%) e concentração de carvão ativado no meio de cultura (0, 10 e 20 g.L^{-1}), no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3X3, totalizando 9 tratamentos com quatro repetições, sendo cada repetição constituída por um frasco com cinco explantes. Utilizou-se, para o experimento, meio MS acrescido de 3 μM de AIB, 30g. L^{-1} de sacarose, 100mg. L^{-1} de mio-inositol e 6g. L^{-1} de ágar, sendo o pH ajustado para 5,8, antes da inclusão do ágar e, posteriormente autoclavado a 121°C e 1,5atm por 20 minutos.

Após a inoculação, os explantes foram transferidos e mantidos em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, luminosidade de $27\mu\text{mols.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Após 30 dias foram avaliadas as variáveis, porcentagem de enraizamento, número de raízes e comprimento das raízes. Os dados dos dois experimentos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan, através do programa estatístico WinStat (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2002).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Experimento 1: Multiplicação *in vitro* de amoreira-preta cv. Xavante.

Através da análise de variância, pôde-se observar efeito isolado do fator concentração de sais no meio de cultura para as variáveis número de gemas, número de brotações e comprimento das brotações. Na fig. 7 observa-se um

comportamento linear ascendente para todas as variáveis citadas. O aumento na concentração de sais promoveu um aumento de número de gemas, brotações e no comprimento das brotações, discordando de Preece (1995), o qual afirma que meios baseados em formulações básicas diluídas têm possibilitado melhores resultados para a multiplicação das diversas espécies, estando mais de acordo com Zimmerman (1988), o qual afirma que as necessidades das cultivares dentro de uma mesma espécie são diferentes, havendo necessidade de modificação do meio e dose de citocinina.

Resultados semelhantes foram encontrados por Villa et al. (2005), onde o número de brotos de amoreira-preta cv. Ébano foi estimulado pelo aumento da concentração de sais de MS, maior número de brotos foi observado em meio MS 150%. Porém, no que se refere à variável comprimento de broto, foi observado melhor resultado (2,83cm) em meio MS 50%, com 0,5 mg.L⁻¹ de BAP; já na ausência dessa citocinina no meio MS 150%, houve um maior comprimento de brotações (3,79cm), concordando com os resultados obtidos neste trabalho.

Naves (2001) verificou em trabalho com bromélia-imperial um aumento no tamanho dos brotos até a concentração de 100% do meio MS. Em trabalho com café 'Catuaí', objetivando determinar o efeito de diferentes proporções de sais inorgânicos e componentes orgânicos do meio MS, Forni e Pasqual (1996) observaram que o aumento dos níveis de MS proporcionou aumento do número de brotos, número de folhas e peso da matéria-seca.

Castro, Schuch e Braga (2003), estudando a multiplicação *in vitro* de *Limonium brasiliensis*, verificou que o meio MS e 50% MS sem a presença de BAP revelou-se significativo para a variável número de brotações por explante.

Dzazio, Biasi e Zanette (2002), concluíram que o porta-enxerto de videira '420'-A pode ser multiplicado em meio MS1/2, ou seja, concentração dos sais reduzidos em 50% isento de reguladores de crescimento.

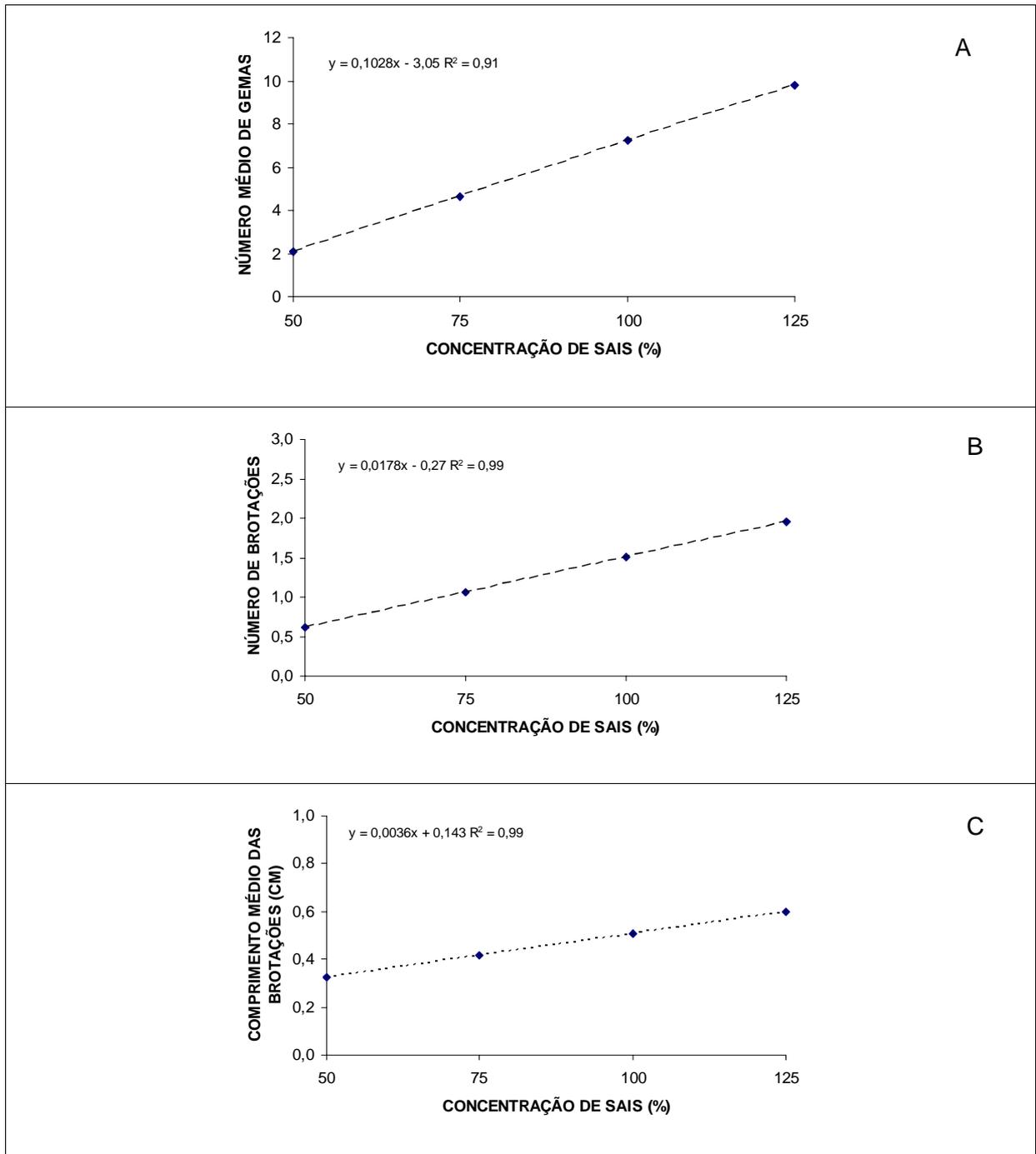


Figura 7 - Número médio de gemas (A), número médio de brotações (B) e comprimento médio das brotações (C) de amoreira-preta cv. Xavante em função da concentração de sais no meio de cultura. Pelotas, RS, 2007.

Já para a variável número médio de folhas houve efeito significativo da interação entre concentrações de sais e o tipo de explante. Na fig. 8, observa-se que o número de folhas mostrou um comportamento quadrático para o T2= explante sem folhas: houve um aumento do número de folhas até a concentração de 107% de sais, logo ocorrendo um decréscimo da variável analisada. Já para o T1= explante

com folhas a tendência foi linear ascendente: com o aumento da concentração de sais, houve um aumento do número de folhas de amoreira-preta cv. Xavante.

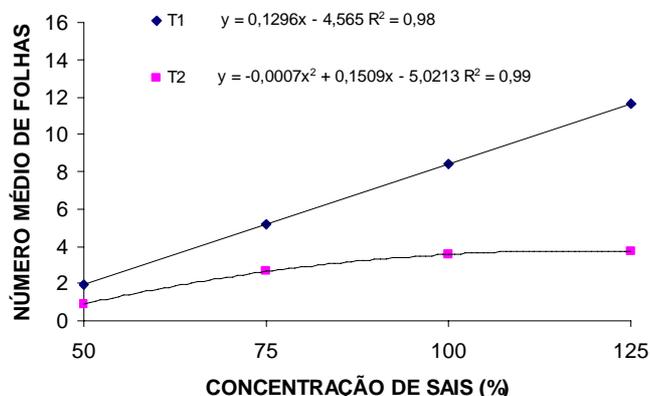


Figura 8 - Número médio de folhas de amoreira-preta cv. Xavante em função da concentração de sais no meio de cultura e do tipo de explante. Pelotas, RS, 2007.

Para as variáveis número de gemas, de brotações e comprimento das brotações, houve diferença significativa para o fator tipo de explante. Na tab. 3, observamos que o explante que continha folhas foi o que apresentou os melhores resultados. O número de folhas tem influência, principalmente, na velocidade de enraizamento e no número de raízes formadas. Cresswell e De Fossard (1974 apud ASSIS; TEIXEIRA, 1998) testaram o efeito da área foliar no enraizamento de explantes de *Eucalyptus grandis*. Foram deixadas duas folhas, uma folha, duas meias-folhas ou nenhuma folha por explante. Houve tendência de maior desenvolvimento de gemas e de sistemas radiculares em explante com maior área foliar.

Tabela 3 - Número médio de gemas, número médio de brotações e comprimento médio das brotações de amoreira-preta cv. Xavante em função do tipo de explante utilizado (T1= explante com folha; T2 = explante sem folha). Pelotas, RS, 2007.

Tipo de explante	Número médio de gemas	Número médio de brotações	Comprimento médio das brotações
T1	8,3 a	1,7 a	0,63 a
T2	3,6 b	0,88 b	0,29 b
CV (%)	26,09	20,03	50,62

* Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5%.

3.2 Experimento 2: Enraizamento *in vitro* de amoreira-preta cv. Xavante.

Houve efeito significativo de interação entre concentrações de sais e de carvão ativado no meio de cultura, para a variável número médio de raízes. Na fig. 9 observa-se que o número de raízes teve um comportamento quadrático, com 75% de sais no meio de cultura. Houve uma redução do número médio de raízes até a concentração de 14,8g de carvão ativado, logo observa-se um aumento do número médio de raízes. Quanto à utilização de 100%, teve também um comportamento quadrático; maior número médio de raízes foi observado com 5,8g de carvão ativado. Já para a concentração de 50%, observa-se um comportamento linear descendente: com aumento na concentração de carvão ativado no meio, houve uma redução no número de raízes de amoreira-preta cv. Xavante, concordando com Assis e Teixeira (1998), os quais revelam que concentração elevada de carvão ativado, para algumas espécies, pode afetar negativamente o processo de enraizamento. Dzazio, Biasi e Zanette (2002) encontraram maior número de raízes (1,97) e porcentagem de enraizamento no meio MS/2 (concentração dos sais diluídos em 50%) sem carvão ativado no meio.

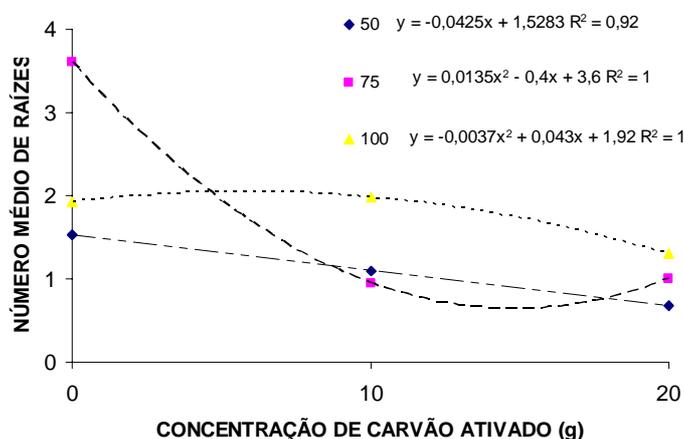


Figura 9 - Número médio de raízes de amoreira-preta cv. Xavante em função de diferentes concentrações de sais e da concentração de carvão ativado no meio de cultura. Pelotas, RS, 2007.

Para a porcentagem de enraizamento e comprimento médio das raízes de amoreira-preta cv. Xavante, uma tendência linear descendente para a utilização de carvão ativado no meio de cultura, independente da concentração de sais. Através

do aumento da concentração de carvão ativado, houve uma redução na percentagem de enraizamento e no comprimento médio das raízes. Pelos resultados obtidos, verifica-se que, para o enraizamento *in vitro* de amoreira-preta cv. Xavante, a utilização de carvão ativado no meio de cultura não favorece o enraizamento. De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), o carvão ativado em concentrações de 0,1 a 2% pode ser benéfico em alguns casos. Fisicamente, ele simula a condição de escuro, no qual as raízes normalmente se desenvolvem melhor. Quimicamente, o carvão ativado tem efeito adsorvente, retendo parte de todos os elementos que compõem o meio. Entretanto, a adição de carvão ao meio de cultivo nem sempre tem se mostrado vantajosa. Nicoloso et al. (2001) verificaram que a percentagem de enraizamento em *Pfaffia glomerata* não foi influenciada pela presença de carvão ativado no meio de cultura. Resultado semelhante foi encontrado por Erig, Schuch e Braga (2004), trabalhando com pereira cv. Carrick. Os autores verificaram que a percentagem de enraizamento foi nula, com a utilização de 1% de carvão ativado no meio de cultura.

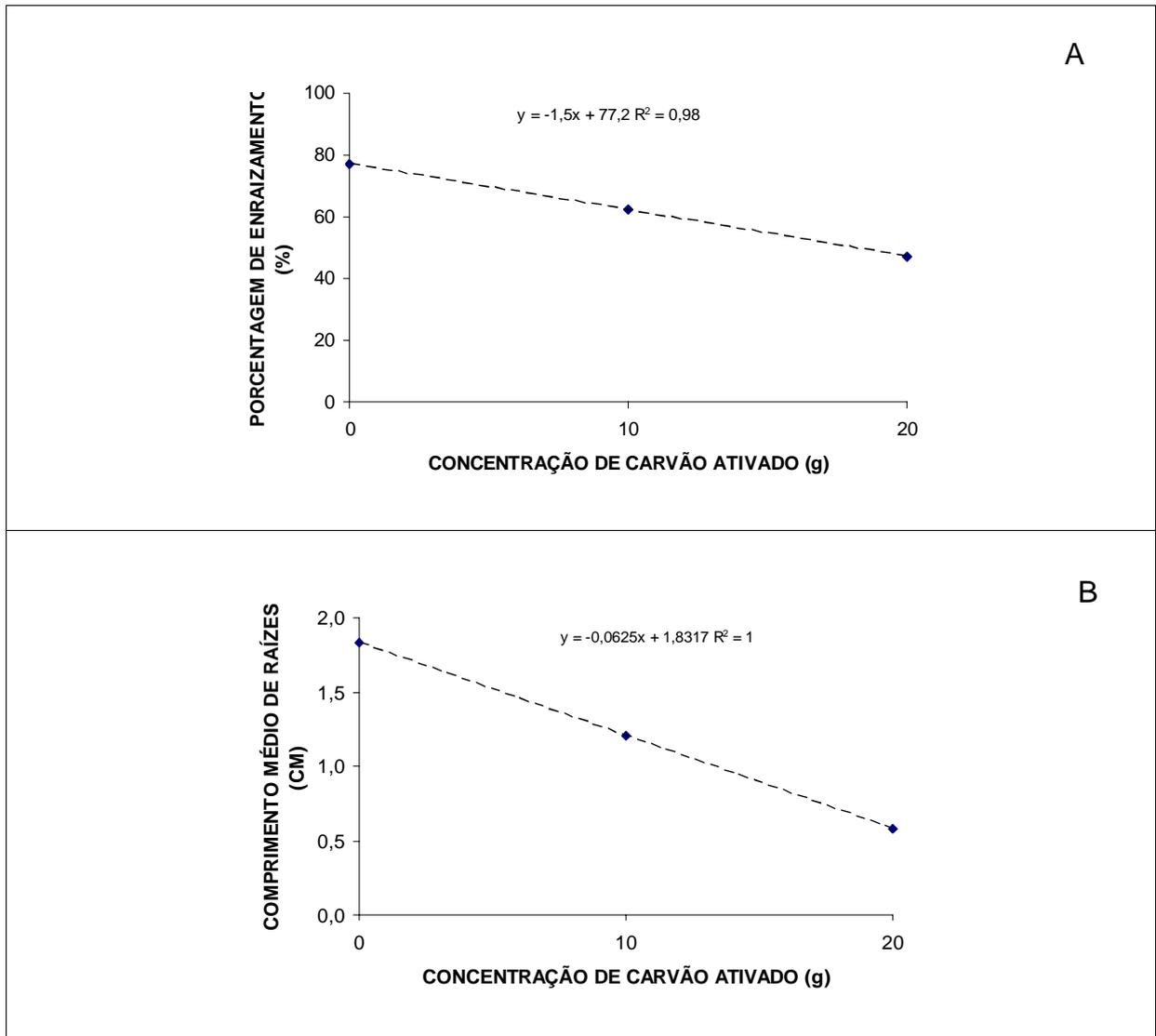


Figura 10 - Porcentagem de enraizamento (A) e comprimento médio das raízes (B) de amoreira-preta cv. Xavante em função da concentração de carvão ativado no meio de cultura. Pelotas, RS, 2007.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que os explantes mantidos com folha inoculados em meio MS com 125% dos seus sais é o melhor meio para multiplicação *in vitro* de amoreira-preta 'Xavante'.

Para o experimento de enraizamento, pode-se concluir que o tratamento com 75% de sais no meio de cultura, na ausência de carvão ativado, é o mais indicado para o enraizamento *in vitro* de amoreira-preta 'Xavante', pois obteve-se maior número médio de raízes e comprimento médio das raízes.

CAPÍTULO III

Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo da amora-preta e da framboesa representa uma ótima opção para diversificação de pequenas propriedades, por serem espécies rústicas e de alta produtividade (ANTUNES; RASEIRA, 2004) (RASEIRA et al., 2004).

As pequenas frutas ocupam espaço crescente no elenco de espécies frutíferas em várias regiões do mundo. No Brasil, amoras e framboesas despertam a atenção de produtores, por se tratarem de uma alternativa de diversificação potencialmente rentável, e de consumidores, por serem componentes de uma dieta saudável.

A amoreira-preta e a framboeseira vêm sendo cultivadas por pequenos produtores do Rio Grande do Sul (principal produtor brasileiro), Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais, objetivando a exportação dos frutos.

A propagação dessas espécies ocorre principalmente por meio de estacas herbáceas de 15 a 20 cm, rebentos e hastes novas. Embora esses métodos tradicionais sejam comumente usados, a técnica de cultura de tecido juntamente com o uso de reguladores de crescimento com meios adequados pode eventualmente tornar-se um método mais promissor de propagação (CALDWELL, 1984), permitindo a obtenção de inúmeras plantas isentas de vírus, geneticamente uniformes, em curto espaço de tempo (PASQUAL et al., 1991), representando um método alternativo de propagação vegetativa de plantas frutíferas.

Os brotos desenvolvidos no cultivo *in vitro* geralmente não apresentam raízes. Eles deverão, portanto, passar por uma fase de enraizamento em meio propício à indução de raízes, preparando as mudas para o transplante do ambiente de cultivo para o ambiente em casa de vegetação e campo (HARTMANN et al., 1997).

O controle do desenvolvimento de raízes adventícias é influenciado por diversos fatores, dentre eles os reguladores de crescimento, alguns promovendo e outros inibindo o enraizamento (ASSIS; TEIXEIRA, 1998). As auxinas compreendem uma grande família de substâncias que têm em comum a capacidade de produzir crescimento celular e também promover a divisão celular em cultura de tecidos (KRIKORIAN, 1991). As auxinas têm sido utilizadas na estimulação de raízes adventícias. Entre elas, o AIB tem sido bastante usado por não causar fitotoxicidade aos explantes em uma larga faixa de concentração e ser eficiente em uma grande variedade de espécies (HARTMANN et al., 1997).

A vantagem desse tipo de enraizamento representa o melhor controle das condições em que se trabalha e, com isso, a obtenção de um alto percentual de enraizamento, sendo uma das etapas mais difíceis de propagação. O tipo de meio de cultura, de auxina e suas concentrações são as variáveis que, em geral, mais influenciam o enraizamento, e variam conforme a espécie e a cultivar. Quando a concentração de auxina no meio é excessiva, ocorre formação de calo na base do explante, comprometendo a rizogênese e o crescimento da parte aérea. Por essa razão é, às vezes, recomendada a utilização de dois meios de cultura para a rizogênese. Primeiramente, as partes aéreas permanecem em meio com auxina, favorecendo a indução; posteriormente, são transferidas para meio sem auxina, estimulando assim a rizogênese e o crescimento das raízes. Esse processo tem sido adotado com frequência em espécies lenhosas florestais e frutíferas (FETT NETO et al., 1992). O enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de marmeleiro 'A' foi obtido por Dolcet-sanjuan et al. (1991), cultivando os brotos em meio de cultura contendo 5M de ANA durante uma semana e, em seguida, transferindo-os para meio de cultura sem auxina durante quatro semanas.

Assim, objetivou-se com este experimento determinar o melhor meio de cultivo, a melhor concentração de AIB no meio e o tempo de cultivo de microestacas para o enraizamento *in vitro* de *Rubus* spp. 'Xavante' e *Rubus idaeus* L. 'Batum'.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho, conduzido no Laboratório de Micropropagação de Plantas Frutíferas do Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), em Pelotas, RS, foi constituído de dois experimentos:

1º experimento: realizado com amoreira-preta 'Xavante';

2º experimento: realizado com framboeseira 'Batum'.

O material vegetal utilizado no experimento foram microestacas apicais de amora-preta 'Xavante' e de framboesa 'Batum', com duas folhas de aproximadamente 1 a 1,5cm de comprimento, oriundas do cultivo *in vitro*. Os fatores estudados foram o tipo de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e WPM – Wood Plant Medium (LLOYD; MCCOWN, 1980), a concentração de AIB no meio de cultura (0, 3, 6, 9, 12 μM) e o tempo de cultivo das microestacas em meio com AIB (uma semana em meio com AIB + três semanas em meio sem AIB ou quatro semanas em meio com AIB), no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2X5X2, totalizando 20 tratamentos com quatro repetições. Cada repetição foi constituída de um frasco com cinco explantes. Utilizou-se para os meios MS e WPM, 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 6 g L⁻¹ de ágar, sendo o pH ajustado para 5,8, antes da inclusão do ágar e, posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 \pm 2°C, luminosidade de 27 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas.

Após 30 dias, foram avaliadas as variáveis porcentagem de enraizamento, número médio de raízes e comprimento das raízes. Os dados dos dois experimentos foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan e regressão polinomial, através do programa estatístico WinStat (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2002).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Experimento 1: Amoreira-preta cv. Xavante

Para as variáveis porcentagem de enraizamento, número médio de raízes e comprimento médio das raízes, houve diferença significativa para o fator tipo de meio de cultura. O meio WPM foi o que apresentou as melhores médias para as variáveis analisadas (Tab. 4). No entanto, Karakullukçu, Agaoglu e Abak (1993) obtiveram 87% de enraizamento de amoreira em meio de cultura MS sem reguladores de crescimento. Centellas et al. (1999) também obtiveram enraizamento *in vitro* da macieira cv. Fred Hough em meio de cultura MS, porém com a concentração de sais reduzida para 50% e com a adição de 3 μM de AIB.

Welander (1985) e Ramirez del Castillo e Angarita Zerda (1990) obtiveram resultados positivos com a diluição dos macronutrientes no meio de cultura de enraizamento *in vitro* de *Rubus* spp. Os autores obtiveram 100% de êxito no enraizamento com os macronutrientes do meio de cultura diluídos a 1/5 e com acréscimo de AIB (0,01 mg L⁻¹).

Dantas et al. (2000), da mesma maneira, encontraram o melhor enraizamento de amoreira-preta cv. Caingangue em meio de cultura MS com a diluição de sais a 25%.

Tabela 4 - Porcentagem de enraizamento, número de raízes e comprimento das raízes de amoreira-preta 'Xavante' em função do tipo de meio de cultura utilizado. Pelotas, RS, 2007.

Tipo de meio	Enraizamento (%)	Número de raízes	Comprimento das raízes
WPM	81,5 a	3,39 a	1,47 a
MS	52 b	1,63 b	0,85 b
CV (%)	42,90	27,45	67,41

* Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Para a variável comprimento médio das raízes, houve diferença significativa para o fator tempo de cultivo das microestacas em meio com AIB (Tab. 5). Explantes que permaneceram por uma semana em meio com AIB obtiveram melhores médias em relação aos que permaneceram em meio com AIB por quatro semanas. Concordando com os resultados de Soares, Damiani e Schuch (2006), quando

transferiram os explantes de mirtilo para meio sem AIB foi observado maior comprimento das raízes.

Tabela 5 - Comprimento das raízes de microestacas de amoreira-preta 'Xavante' em função do tempo de cultivo (T1= uma semana em meio com AIB + três semanas em meio sem AIB; T2= quatro semanas em meio com AIB). Pelotas, RS, 2007.

TEMPO DE CULTIVO DAS MICROESTACAS	MÉDIAS*
T1	1,39 a
T2	0,93 b
CV (%)	67,41

* Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Para o comprimento médio das raízes, comportamento quadrático para o fator concentração de AIB (Fig. 11). Com o aumento da concentração de AIB, houve redução do comprimento das raízes, representado por uma curva quadrática até a concentração de 2,5 μ M de AIB; logo houve aumento do comprimento médio das raízes. Hoepfner, Nestby e Nybom (1996) detectaram uma associação positiva entre as baixas concentrações de reguladores de crescimento e a alta porcentagem de enraizamento de amoreira.

Radmann, Gonçalves e Fortes (2000) não observaram diferença significativa na taxa de enraizamento em amoreira-preta cv. Ébano em meio de cultura com diferentes concentrações de AIB, variando entre 0 a 1 μ M.

Ramirez del Castillo e Angarita Zerda (1990) também observaram que a ausência de reguladores de crescimento ou concentração muito baixa de auxinas são recomendadas para induzir raízes em espécies de *Rubus*. Completando, Dantas et al. (2000) obtiveram o melhor enraizamento da amoreira-preta cv. Caingangue no meio de cultura sem a auxina ANA. Hartmann et al. (1997) concluem que o tratamento com auxinas deve ser usado somente em espécies de difícil enraizamento. Quando a espécie é de fácil enraizamento, não há justificativa para o gasto adicional com auxinas.

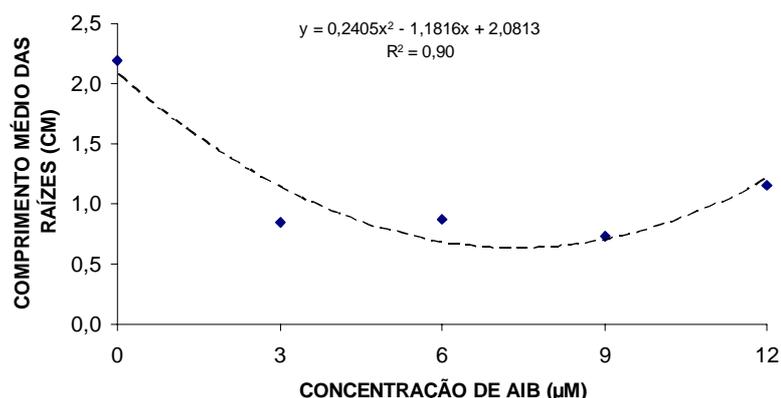


Figura 11 - Comprimento médio de raízes de amoreira-preta cv. Xavante em função de diferentes concentrações de AIB. Pelotas, RS, 2007.

3.2 Experimento 2: Framboeseira cv. Batum

Através da análise da variância, pôde-se observar que, para as variáveis porcentagem de enraizamento, número de raízes e comprimento das raízes, houve diferenças significativas para a interação entre tipo de meio e o tempo de cultivo das microestacas no meio. Independente do meio de cultura, o tempo de cultivo que propiciou melhores resultados foi aquele em que o material vegetal foi mantido por uma semana em meio de cultura com AIB (Tab. 6).

Tabela 6 - Porcentagem de enraizamento, número médio de raízes, comprimento médio das raízes de framboeseira cv. Batum em função do tipo de meio de cultura e do tempo de cultivo no meio de cultura (T1 = uma semana em meio com AIB + três semanas em meio sem AIB, T2 = quatro semanas em meio com AIB). Pelotas, RS, 2007.

Tipo de meio	Enraizamento (%)		Número médio de raízes		Comprimento médio das raízes	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2
WPM	64 aA	57 aA	1,73 aA	1,82 aA	0,593 aB	0,820 aA
MS	54 aA	9 bB	1,36 aA	0,14 bB	0,421 aA	0,09 bB
CV (%)	55,79		27,96		71,14	

* Médias seguidas da mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Villa, et al. (2005) obtiveram maior número de raízes em meio MS (50%) sem regulador de crescimento. Os meios de formulações básicas diluídas 50% têm possibilitado melhor enraizamento na cultura da macieira e também em outras culturas (DAMIANO et al., 1991 apud CENTELLAS et al., 1999).

Soares, Damiani e Schuch (2006) verificaram maiores porcentagens de enraizamento em explantes tratados com AIB por uma semana, seguido da transferência para meio livre de hormônio em mirtilo cv. Georgiagem, concordando com o resultado do presente trabalho. Mackay (1996), estudando o enraizamento *in vitro* de Texas madrone (*Arbutus xalapensis*), uma espécie ornamental da família das Ericaceae, verificou que microestacas tratadas com 6,1 μ M AIB suplementado ao meio de cultura por uma semana, seguido da transferência para meio livre de AIB por quatro semanas, apresentaram uma porcentagem de enraizamento de 83%. Ostrolukcá et al. (2004), trabalhando com diferentes cultivares de mirtilo, obtiveram cerca de 80 a 95% de enraizamento, utilizando 0,8mg.L⁻¹ de AIB adicionado ao meio de cultura. Porém, os mesmos autores ressaltam que essa porcentagem varia entre cultivares.

Observou-se um comportamento quadrático no tratamento 1 (T1), em função dos níveis de AIB, utilizados no experimento, no que diz respeito à porcentagem de enraizamento de framboeseseira cv. Batum (Fig. 12). Os melhores resultados de porcentagem de enraizamento foram obtidos até a concentração de 6,5 μ M; depois observa-se uma queda na porcentagem de enraizamento, de acordo com o aumento da concentração de AIB. Para Fachinello et al. (1994), o aumento da concentração de auxinas aplicadas nos brotos provoca efeito estimulador até um certo valor, a partir do qual acréscimos maiores têm efeito inibitório. Esse resultado reforça a afirmativa de Grattapaglia e Machado (1998) de que, quando a concentração de auxina no meio de enraizamento é excessiva, ocorre o comprometimento da rizogênese.

Já para o tratamento 2, (T2), observou-se comportamento quadrático, havendo uma queda na porcentagem de enraizamento até a concentração de 7,5 μ M, logo ocorrendo aumento da porcentagem de enraizamento, de acordo com o aumento da concentração de AIB.

García e González (1992) obtiveram 77 a 100% de enraizamento em *Rubus* sem a necessidade de adição de reguladores de crescimento para o enraizamento. Hoepfner, Nestby e Nybom (1996) também detectaram uma associação positiva entre as baixas concentrações de reguladores de crescimento e a alta porcentagem de enraizamento de amoreira.

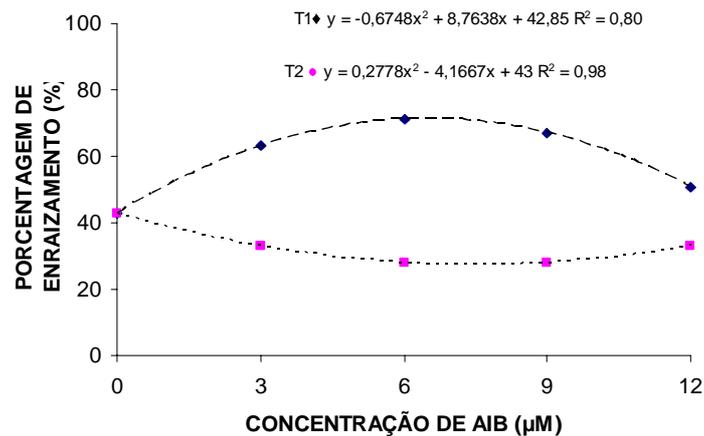


Figura 12 - Porcentagem de enraizamento de framboeseira cv. Batum em função da concentração de AIB e do tempo de cultivo das microestacas no meio, (◆T1 = uma semana em meio com AIB + três semanas em meio sem AIB, ●T2 = quatro semanas em meio com AIB). Pelotas, RS, 2007.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que o meio WPM adicionado de AIB em baixas concentrações é o melhor meio de enraizamento para amoreira-preta 'Xavante', sendo suficiente a adição de 2,5µM ao meio de cultura, mantido uma semana, seguido do cultivo em meio livre de regulador de crescimento.

Para framboeseira 'Batum', o meio MS adicionado de 6,5µM de AIB ao meio de cultura, mantido uma semana, seguido do cultivo em meio livre de regulador de crescimento é suficiente para o enraizamento *in vitro* da espécie.

CAPÍTULO IV

Uso de luz natural, concentração de sacarose e tipo de vedação dos frascos na multiplicação *in vitro* de amoreira e framboeseira

1. INTRODUÇÃO

Muitos explantes ou plantas *in vitro* possuem a habilidade de crescer de forma fotoautotrófica (sem sacarose no meio de cultura e sob condições ambiente que favorecem a fotossíntese) (KOZAI, 1991). A micropropagação fotoautotrófica de plantas, além de aumentar o crescimento dos explantes *in vitro*, também minimiza os riscos de contaminação microbiana, reduz os custos de produção, melhora as características fisiológicas da planta e facilita sua aclimatização às condições *ex vitro* (AFREEN; ZOBAYED; KOZAI, 2002).

Várias práticas têm sido testadas para promover o crescimento fotoautotrófico das plantas *in vitro* e, conseqüentemente, reduzir os custos de produção. Entre elas, destacam-se a eliminação total ou parcial da sacarose do meio de cultura (KOZAI; KUBOTA, 2001; ARIGITA et al., 2002); o aumento da concentração de CO₂ e, conseqüentemente, a redução da umidade relativa e da concentração de etileno do frasco de cultivo (KANECHI et al., 1998) (KOZAI; KUBOTA, 2001). Uma das maneiras para obter tais resultados é o uso de tampas, como algodão, alumínio, filme de PVC, e o aumento da intensidade luminosa (KANECHI et al., 1998) (KODYM; ZAPATA-ARIAS, 1999) (KOZAI; KUBOTA, 2001) (KODYM; ZAPATA-ARIAS, 2001). Também através da micropropagação fotoautotrófica é possível eliminar a sacarose no meio de cultura, o que, segundo Zobayed, Afreen e Kozai (2000, 2001) e Afreen, Zobayed e Kozai (2002), reduz o risco de contaminação

microbiana, diminui o estresse da planta durante a aclimatização e aumenta a porcentagem de sobrevivência das mudas. Por outro lado, para o crescimento *in vitro* em meio livre de açúcares, é necessário aumentar a concentração de CO₂ e aumentar a intensidade luminosa nos frascos de cultivo para promover a fotossíntese (KOZAI; KUBOTA, 2001).

O desenvolvimento de sistemas de micropropagação fotoautotrófica surge como possibilidade potencial de aumentar a eficiência da micropropagação e auxiliar na redução dos custos, viabilizando comercialmente essa forma de propagação. Dessa forma, o objetivo deste experimento foi determinar a melhor concentração de sacarose no meio de cultura, o tipo de vedação dos frascos e o local de incubação dos frascos na multiplicação *in vitro* de amora-preta 'Xavante' e framboesa 'Batum'.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no período de inverno, nos meses de julho e agosto no Laboratório de Micropropagação de Plantas Frutíferas e na casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), em Pelotas, RS. O trabalho foi dividido em dois experimentos:

1º Experimento: Multiplicação Fotoautotrófica de framboesa cv. Batum;

2º Experimento: Multiplicação Fotoautotrófica de amora-preta cv. Xavante.

Foram utilizados, para os experimentos, segmentos nodais caulinares de plantas de amoreira-preta cv. Xavante e de framboeseira cv. Batum de aproximadamente 1 cm de comprimento, com duas gemas e o ápice excisado, com folhas, oriundas do cultivo *in vitro*. Os fatores estudados foram: local de incubação dos frascos com os explantes (sala de crescimento convencional com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, luminosidade de $27 \mu\text{mols. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas e casa de vegetação de vidro com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e luz natural); concentração de sacarose no meio de cultura (0; 15 e 30 g.L^{-1}) e o tipo de vedação dos frascos de cultivo (alumínio, filme de PVC e algodão). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2X3X3, totalizando 18 tratamentos com quatro repetições. Cada repetição foi constituída de um frasco com cinco explantes. Utilizou-se meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de $7,5 \mu\text{M}$

de BAP, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 6 g L⁻¹ de ágar, sendo o pH ajustado para 5,8, antes da inclusão do ágar e, posteriormente autoclavado a 121°C e 1,5atm por 20 minutos.

Após 30 dias de multiplicação *in vitro*, foram avaliados o número de brotações, o número de gemas e o número de folhas por explante, comprimento das brotações e matéria fresca. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan, através do programa estatístico WinStat (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2002).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Experimento 1: Framboeseira cv. Batum

Houve efeito significativo da interação entre local de incubação dos frascos e tipo de tampa utilizado no fechamento dos frascos para as variáveis número de gemas, de folhas e de brotações. Na tab. 7, observa-se que, utilizando como vedação dos frascos o filme de PVC, mantidos na sala de crescimento, foram observadas maiores médias para as variáveis citadas anteriormente, não diferindo do alumínio mantido na sala de crescimento. Esse resultado é semelhante ao encontrado por Damiani e Schuch (2006), trabalhando com mirtilo cv. Geogiagem; os autores verificaram que, na sala de crescimento, com frascos vedados com filme plástico, obtiveram-se os melhores resultados para a taxa de multiplicação e número de folhas. Na micropropagação de bananeiras, explantes crescidos sob luz natural apresentaram maior taxa de multiplicação que aqueles multiplicados em sala de crescimento (KODYM; ZAPATA-ARIAS, 1999). Em plantas de tomateiro micropropagadas sob luz natural, o número de folhas foi aumentado quando comparado às crescidas em sala de crescimento (KUBOTA; TADOKORO, 1999).

Tabela 7 - Número médio de gemas, número médio de folhas, número médio de brotações de framboeseira cv. Batum em função do local de incubação dos frascos e do tipo de tampa. Pelotas, RS, 2007.

Local de incubação	Número médio de gemas			Número médio de folhas			Número médio de brotações		
	Algodão	Alumínio	Filme	Algodão	Alumínio	Filme	Algodão	Alumínio	Filme
Sala de crescimento	5,0aB	6,5aA	6,9aA	4,3aB	5,8aA	5,9aA	1,3aB	1,7aA	1,9aA
Casa de Vegetação	4,7aA	4,2bA	4,3bA	3,9aA	3,5bA	3,7bA	1,3aA	1,1bA	1,0bA
CV (%)	16,48			16,55			13,36		

* Médias seguidas da mesma letra, minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Houve um efeito isolado quanto ao tipo de tampa utilizado no fechamento dos frascos, para a variável peso médio da matéria-fresca da parte aérea (Tab. 8). Maior peso da matéria fresca foi observado com o uso do alumínio como tipo de vedação dos frascos, diferindo estatisticamente dos demais tipos de tampa, resultado semelhante ao encontrado por Damiani e Schuch (2006), que obtiveram melhor resultado com o uso de alumínio no fechamento dos frascos para mirtilo cv. Georgiagem.

O tipo de tampa utilizado tem grande influência no desenvolvimento da cultura, pois é ela que vai determinar o nível de trocas gasosas com o ambiente externo. Frascos fechados com película de PVC não têm mostrado bons resultados, ocasionando problemas de alongamento nas culturas da macieira, *Eucalyptus* e *Citrus* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Tabela 8 - Peso médio da matéria fresca (mg) de framboeseira cv. Batum em função do tipo de tampa utilizado no fechamento dos frascos. Pelotas, RS, 2007.

Tipo de Vedação	Médias
Alumínio	39,16 a
Algodão	29,00 b
Filme	28,75 b
CV (%)	50,74

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

O número médio de gemas, de folhas e de brotações da cultivar Batum foi estimulado pelo aumento da concentração de sacarose no meio de cultura, observando um efeito isolado desse fator (Fig. 13).

Com o aumento dos níveis de sacarose, pode-se constatar que houve decréscimo no número de gemas, folhas e brotações, a partir da concentração de

22,4g L⁻¹, 22,2g L⁻¹ e 19,2g L⁻¹, sacarose, respectivamente. Já Faria et al. (2004), trabalhando com *Dendrobium nobile* sob diversas concentrações de sacarose, observaram uma maior taxa de multiplicação utilizando 60g L⁻¹ de sacarose.

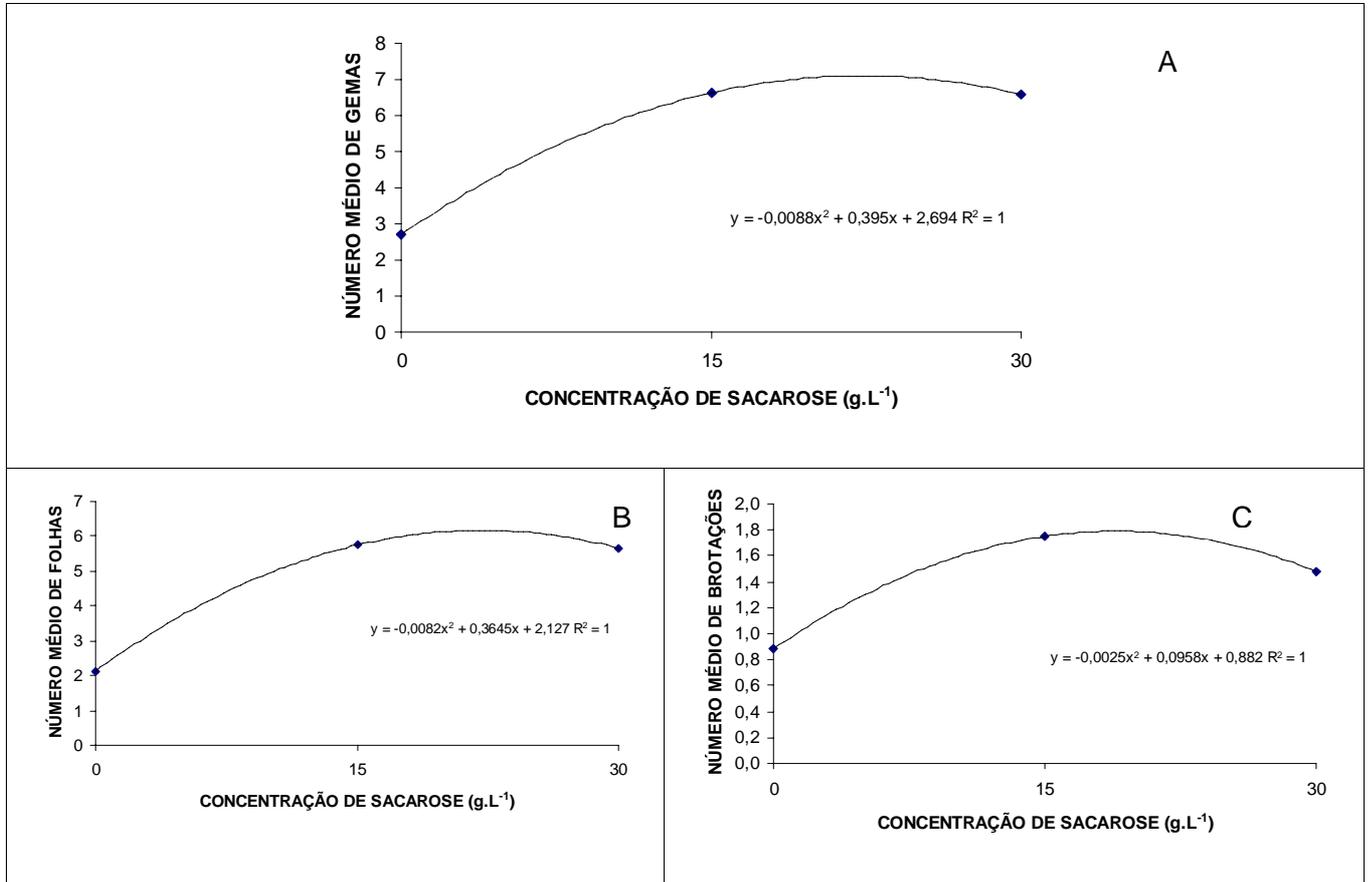


Figura 13 - Número médio de gemas (A), número médio de folhas (B) e número médio de brotações (C) de framboeseira cv. Batum em função de diferentes concentrações de sacarose (g.L⁻¹), Pelotas, 2007.

Em relação à variável peso da matéria-fresca da parte aérea, foi observado um comportamento linear ascendente: o aumento da concentração de sacarose promoveu aumento do peso da matéria-fresca da parte aérea. Verifica-se efeito isolado da concentração de sacarose no meio de cultivo (Fig. 14). Esse mesmo resultado foi obtido por Damiani e Schuch (2006), que constataram um aumento do peso da matéria fresca de mirtilo cv. Georgiagem com o aumento da concentração de sacarose no meio de cultura.

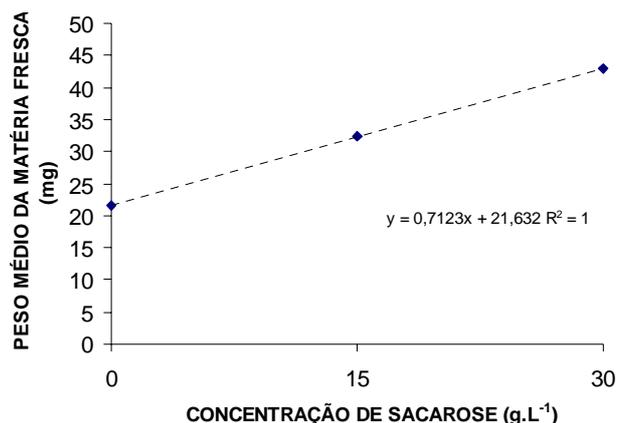


Figura 14 - Peso médio da matéria fresca de framboeseira cv. Batum em função de diferentes concentrações de sacarose, Pelotas, 2007.

3.2 Experimento 2: Amoreira-preta cv. Xavante

Os resultados referentes às variáveis peso médio da matéria-fresca da parte aérea, número de gemas, número de folhas e comprimento médio das brotações de amoreira-preta 'Xavante' foram representados por uma tendência quadrática, observando uma interação dupla entre concentração de sacarose no meio de cultura e o local de incubação dos frascos. Observa-se um aumento no número de gemas, de folhas, do peso da matéria fresca e no comprimento das brotações de explantes mantidos na casa de vegetação até certo ponto. Maiores médias para as variáveis foram observadas nas concentrações de 7,8, 9,9, 10,3 e 11,3 g L⁻¹ de sacarose, respectivamente, mantidas na casa de vegetação, logo havendo um decréscimo para as variáveis citadas anteriormente (Fig. 15). Chisté, Damiani e Schuch (2006) obtiveram maior comprimento das brotações em casa de vegetação com o aumento da concentração de sacarose com mirtilo cv. Delite, diferindo do presente trabalho.

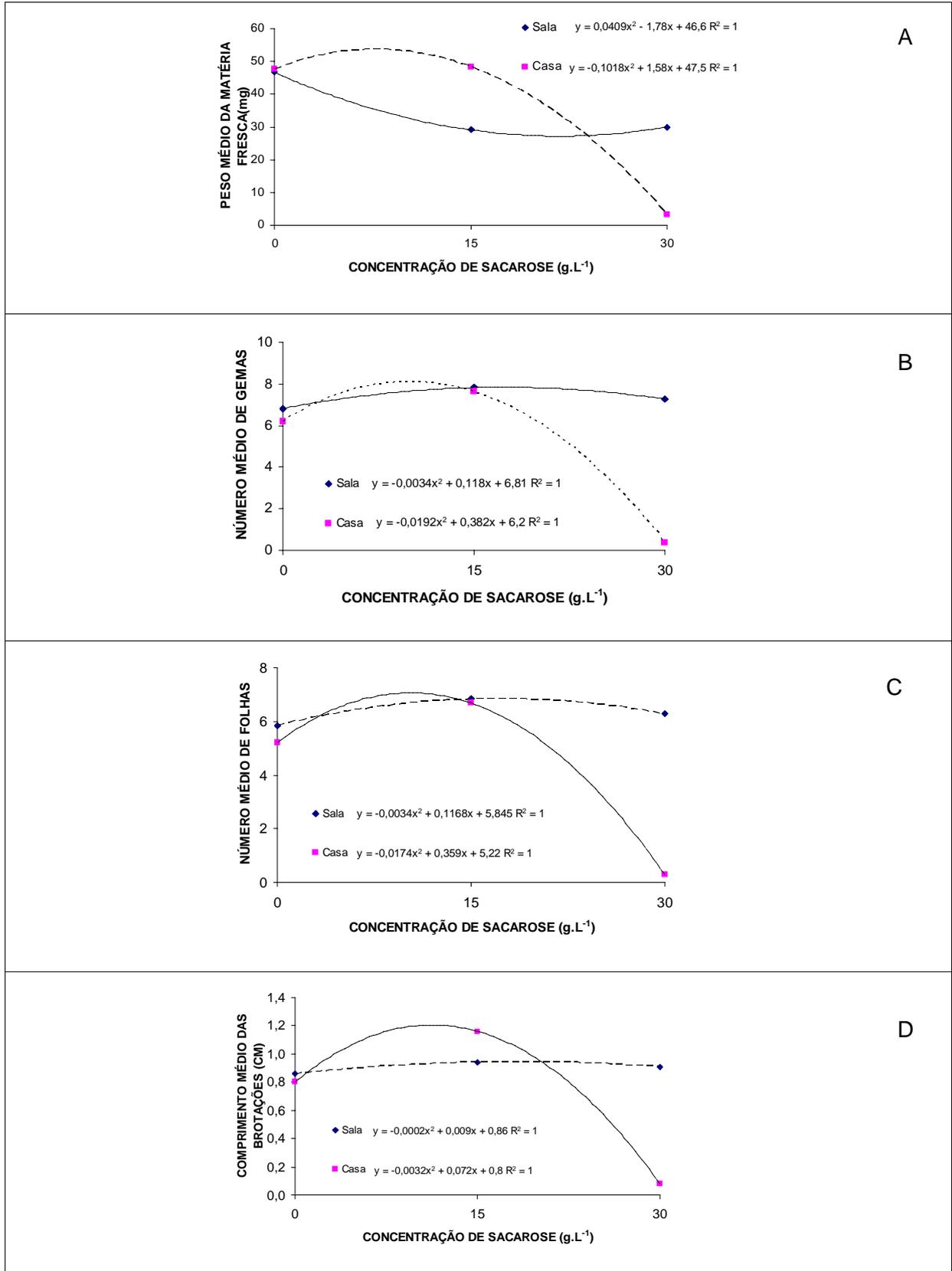


Figura 15 - Peso médio da matéria-fresca da parte aérea (A), número médio de gemas (B), número médio de folhas (C) e comprimento médio das brotações (D) de amoreira-preta cv. Xavante em diferentes concentrações de sacarose e em função do local de incubação dos frascos com os explantes. Pelotas, RS, 2007.

Houve uma interação dupla entre o tipo de tampa utilizado no fechamento dos frascos e a concentração de sacarose para a variável comprimento das brotações (Fig. 16). Maior comprimento das brotações foi observado com o uso de alumínio na vedação dos frascos combinado com 11,5 g L⁻¹ de sacarose.

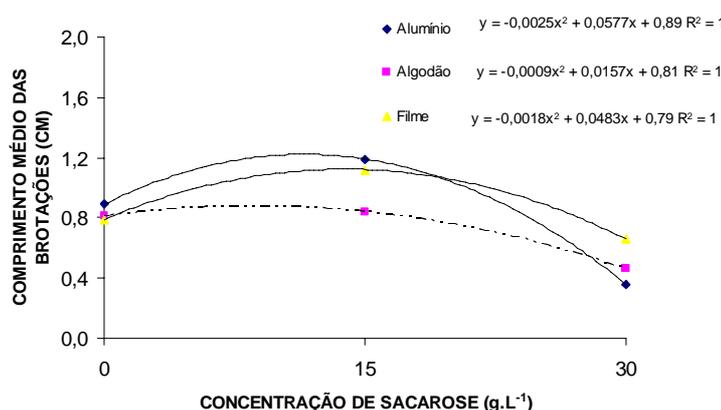


Figura 16 - Comprimento médio das brotações de amoreira-preta cv. Xavante em função de diferentes concentrações de sacarose e do tipo de material utilizado no fechamento dos frascos. Pelotas, RS, 2007.

Pode-se observar uma interação tripla entre o tipo de tampa utilizado no fechamento dos frascos, local de incubação dos frascos e concentração de sacarose, para a variável número médio de brotações (Tab. 9).

Maior número de brotações foi observado com o uso de alumínio como vedação dos frascos e mantidos na sala de crescimento com 30g L⁻¹ de sacarose. Difere do trabalho de Chisté, Damiani e Schuch (2006), onde foi observado maior número de brotações na sala de crescimento vedados com alumínio com 15g L⁻¹.

Tabela 9 - Número médio de brotações de amoreira-preta cv. Xavante em função do tipo de tampa utilizado para o fechamento dos frascos, do local de incubação dos frascos e de diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. Pelotas, RS, 2007.

Concentração de Sacarose	Tipo de Vedação					
	Algodão		Alumínio		Filme	
	Sala	Casa	Sala	Casa	Sala	Casa
0	1,65aA	1,75bA	1,40cA	1,25aA	0,95bA	1,15bA
15	1,77aB	3,40aA	4,5aA	1,93aB	3,45aA	3,30aA
30	2,46aA	0 cB	3,35bA	0 bB	3,03aA	0,25cB
CV (%)	12,21					

Médias seguidas da mesma letra, minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% probabilidade de erro.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que os melhores resultados de multiplicação *in vitro* foram obtidos em sala de crescimento, concentração de 22 g L⁻¹ de sacarose e com o uso de alumínio na vedação dos frascos para framboeseira cv. Batum.

Conclui-se que alumínio é o melhor modo de vedação dos frascos de cultivo, para multiplicação *in vitro* de amoreira-preta cv. Xavante, que o melhor local de cultivo é a casa de vegetação e que a adição de 11,5g.L⁻¹ de sacarose no meio de cultura é importante, obtendo-se maior número de gemas, de folhas, comprimento das brotações e matéria-fresca total.

CAPÍTULO V

Enraizamento de framboeseira cv. Batum, sob condições fotoautotróficas

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, as principais regiões produtoras de framboesa são o Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais, sendo que a área estimada de cultivo é de 40 hectares (PAGOT e HOFFMANN, 2002). Entre as cultivares já testadas no Brasil, destaca-se a cultivar Batum, que se caracteriza pela baixa exigência em frio, tipo remontante e com frutos de formato oval. A framboeseira apresenta boa capacidade de propagação, reproduz-se por estacas de aproximadamente 15 a 20 cm de comprimento, e também por meio de micropropagação, com o intuito de se obterem plantas livres de vírus, geneticamente uniformes e em curto espaço de tempo (RASEIRA, et al.,2004). Muitos explantes ou plantas *in vitro* possuem a habilidade de crescer de forma fotoautotrófica (sem sacarose no meio de cultura e sob condições ambientais que promovam a fotossíntese) (KOZAI, 1991). A micropropagação fotoautotrófica de plantas, além de aumentar o crescimento dos explantes *in vitro*, também minimiza os riscos de contaminação microbiana, reduz os custos de produção, melhora as características fisiológicas da planta e facilita sua aclimatização às condições *ex vitro* (AFREEN; ZOBAYED; KOZAI, 2002).

Várias práticas têm sido testadas para promover o crescimento fotoautotrófico das plantas *in vitro* e, conseqüentemente, reduzir os custos de produção. Entre elas, destacam-se a eliminação total ou parcial da sacarose do meio de cultura (KOZAI; KUBOTA, 2001) (ARIGITA et al., 2002), o aumento da concentração de CO₂ e, conseqüentemente, a redução da umidade relativa e da

concentração de etileno do frasco de cultivo (KANECHI et al., 1998) (KOZAI; KUBOTA, 2001). Uma das maneiras para obter tais resultados é o uso de tampas de materiais como algodão, alumínio e filme de PVC; e o aumento da intensidade luminosa (KANECHI et al., 1998) (KODYM; ZAPATA-ARIAS, 1999) (KOZAI; KUBOTA, 2001) (KODYM; ZAPATA-ARIAS, 2001).

O desenvolvimento de sistemas de micropropagação fotoautotrófica surge como possibilidade potencial de aumentar a eficiência da micropropagação e auxiliar na redução dos custos, viabilizando comercialmente essa forma de propagação. Dessa forma, o objetivo deste experimento foi determinar a melhor concentração de sacarose no meio de cultura, o tipo de vedação dos frascos e o local de incubação dos frascos com os explantes no enraizamento *in vitro* de framboeseira cv. Batum.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no período do inverno, no mês de agosto, no Laboratório de Micropropagação de Plantas Frutíferas e na casa de vegetação, do Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), em Pelotas, RS.

Foram utilizados para o experimento microestacas apicais de plantas de framboeseira 'Batum', de aproximadamente 1 a 1,5 cm de comprimento, com duas folhas, oriundas do cultivo *in vitro*. Os fatores estudados foram o local de incubação dos frascos com os explantes (sala de crescimento convencional com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, luminosidade de $27 \mu\text{mols.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas e casa de vegetação de vidro com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e luz natural), concentração de sacarose no meio de cultura (0; 15 e 30 g.L^{-1}), tipo de vedação dos frascos de cultivo (alumínio, filme de PVC e algodão) e tipo de substrato (ágar e vermiculita). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial $2 \times 3 \times 3 \times 2$, totalizando 36 tratamentos com quatro repetições. Cada repetição foi constituída de um frasco com cinco explantes. Utilizou-se meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de $3 \mu\text{M}$ de AIB, 100 mg L^{-1} de mio-inositol e 6 g L^{-1} de ágar, sendo o pH ajustado para 5,8, antes da inclusão do ágar e, posteriormente, autoclavado a 121°C e $1,5 \text{ atm}$ por 20 minutos.

Após 30 dias de enraizamento *in vitro*, foram avaliados o número de raízes, porcentagem de enraizamento, o comprimento das raízes e matéria fresca. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan, através do programa estatístico WinStat (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2002).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A porcentagem de enraizamento e o número de raízes da cv. Batum foram estimulados pelo aumento da concentração de sacarose no meio com vermiculita, observando uma interação entre os fatores concentração de sacarose e tipo de substrato. Maior porcentagem de enraizamento e número de raízes foram observados em meio com vermiculita com a adição de 15,8g L⁻¹ e 17,2g L⁻¹ de sacarose, respectivamente. O comportamento foi quadrático, indicando que houve um aumento da porcentagem de enraizamento e número de raízes até esses pontos calculados, depois havendo certo decréscimo (Fig. 17).

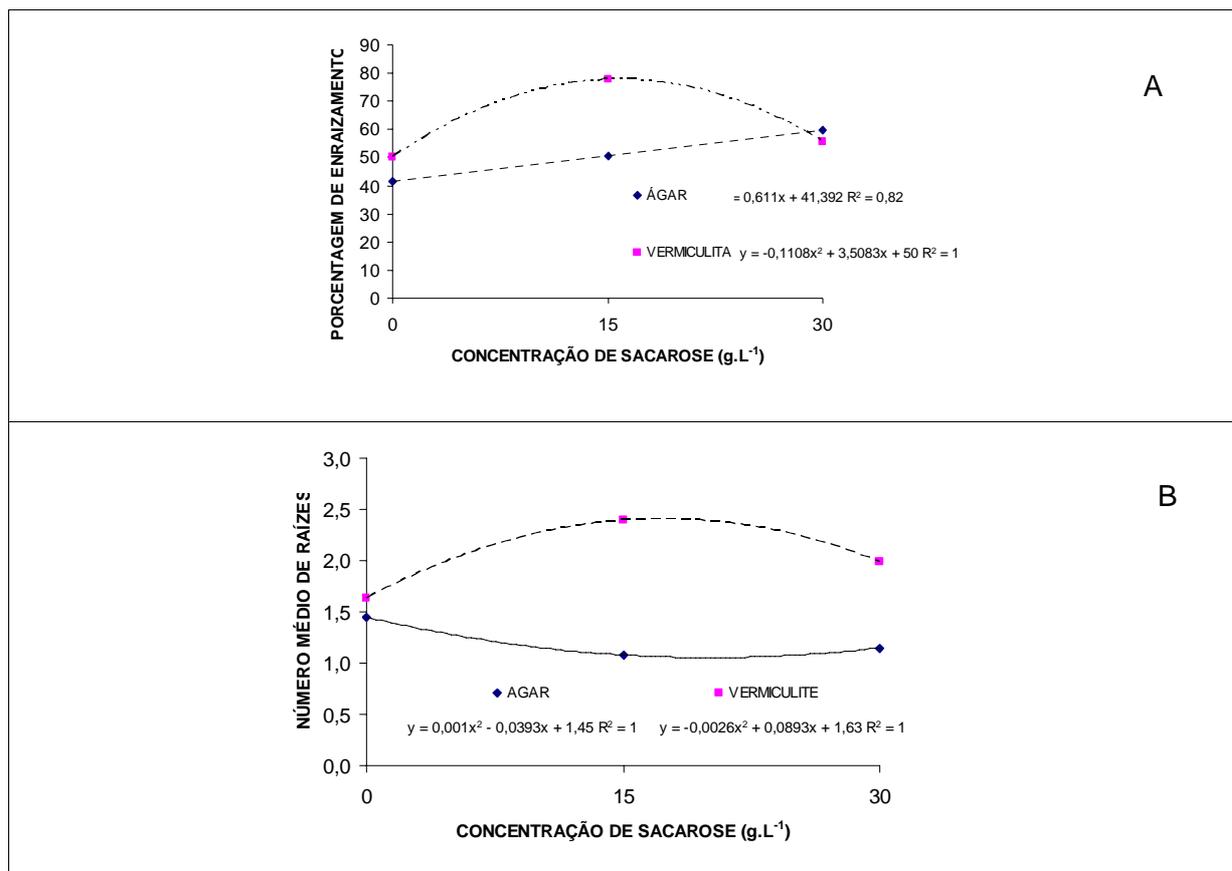


Figura 17 - Porcentagem de enraizamento (A) e número médio de raízes (B) de framboeseira cv. Batum em função do tipo de substrato e de diferentes concentrações de sacarose. Pelotas, RS, 2007.

Houve interação dupla entre tipo de tampa utilizado na vedação dos frascos e concentração de sacarose (Fig. 18).

Maior porcentagem de enraizamento e número de raízes foram observados com o uso de algodão na vedação dos frascos com 0g L⁻¹ de sacarose no meio de cultura. O comportamento foi linear descendente, com o aumento da concentração de sacarose ocorreu um decréscimo da porcentagem de enraizamento e do número médio de raízes. Faria et al. (2004) verificaram que o acréscimo de sacarose ao meio de cultura não influenciou o enraizamento *in vitro* de plantas de *Dendrobium nobile*. Do mesmo modo, Sriskandarajah e Mullins (1981) obtiveram melhores resultados no enraizamento de macieira cv. Ganny Smith com a utilização de apenas 10g L⁻¹ de sacarose.

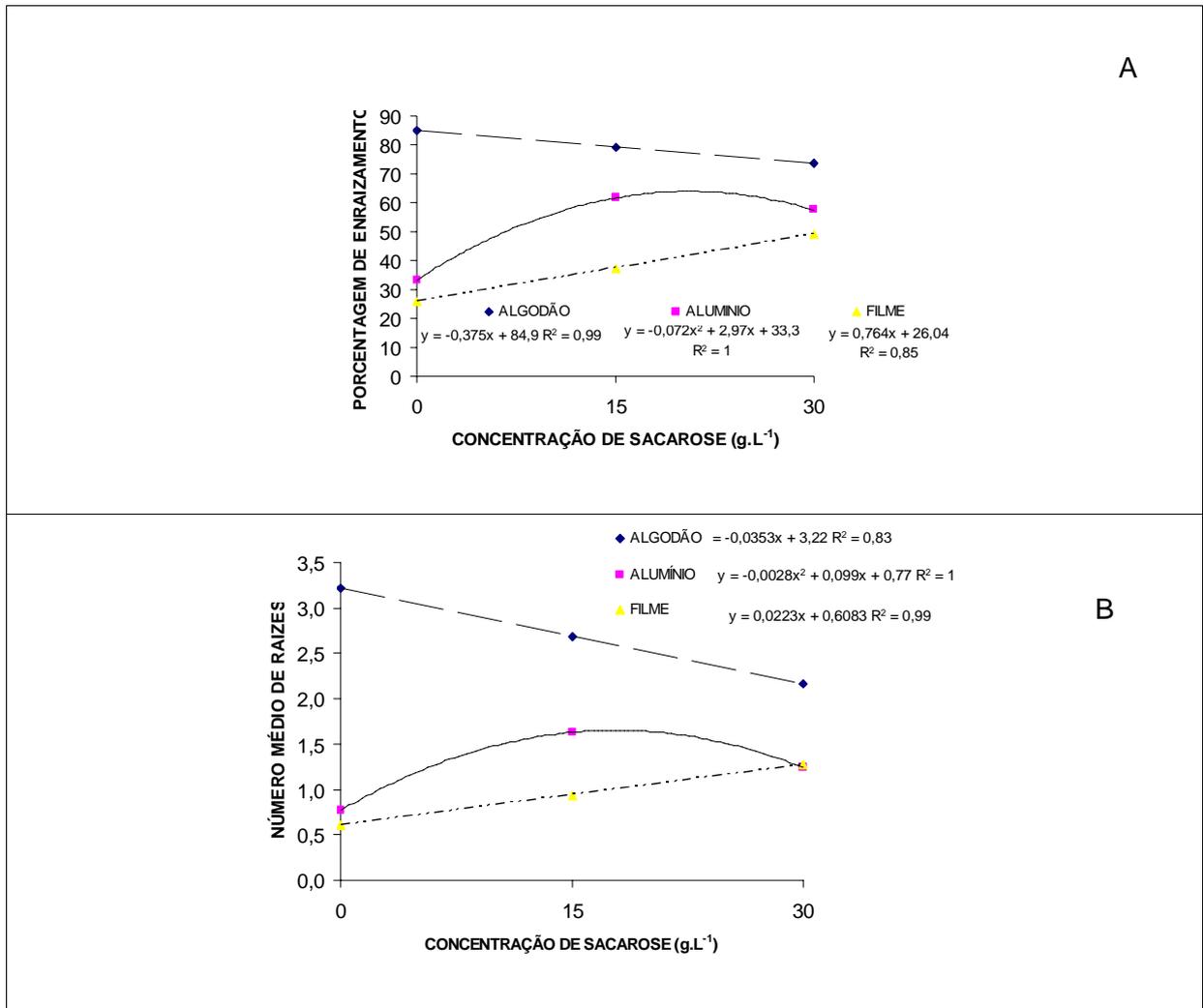


Figura 18 - Porcentagem de enraizamento (A) e número médio de raízes (B) de framboeseira cv. Batum em função do tipo de tampa utilizado no fechamento dos frascos e de diferentes concentrações de sacarose. Pelotas, RS, 2007.

Na tab. 10 observa-se uma interação dupla quanto ao local de incubação dos frascos e o tipo de substrato utilizado para o enraizamento. O uso de vermiculita propiciou maiores médias para as variáveis número de raízes e comprimento das raízes, diferindo estatisticamente do ágar, não diferindo quanto ao local de incubação dos frascos. Com isso, sugere-se o uso da casa de vegetação como local de incubação a fim de propiciar menor custo na utilização de luz.

Tabela 10 - Número médio de raízes e comprimento médio de raízes de framboeseira cv. Batum em função do local de incubação dos frascos e do tipo de substrato utilizado para o enraizamento. Pelotas, RS, 2007.

Local de incubação	Número médio de raízes		Comprimento médio das raízes	
	Vermiculita	Ágar	Vermiculita	Ágar
Sala de crescimento	1,94 aA	1,44 aB	0,76 aA	0,61 aA
Casa de vegetação	2,06 aA	1,02 aB	0,59 aB	0,80 aA
CV (%)	20,23		47,18	

* Médias seguidas da mesma letra, minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% probabilidade de erro.

Houve interação tripla entre o tipo de tampa utilizado no fechamento dos frascos, tipo de substrato para o enraizamento e concentração de sacarose (Fig. 19).

Maior comprimento de raízes foi observado com o uso de vermiculita como substrato, utilizando alumínio e algodão na vedação dos frascos e a adição de 30g L⁻¹ de sacarose. Os dados obtidos são concordantes com as afirmações de vários autores de que a presença de carboidrato é essencial para o enraizamento *in vitro* de muitas espécies (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

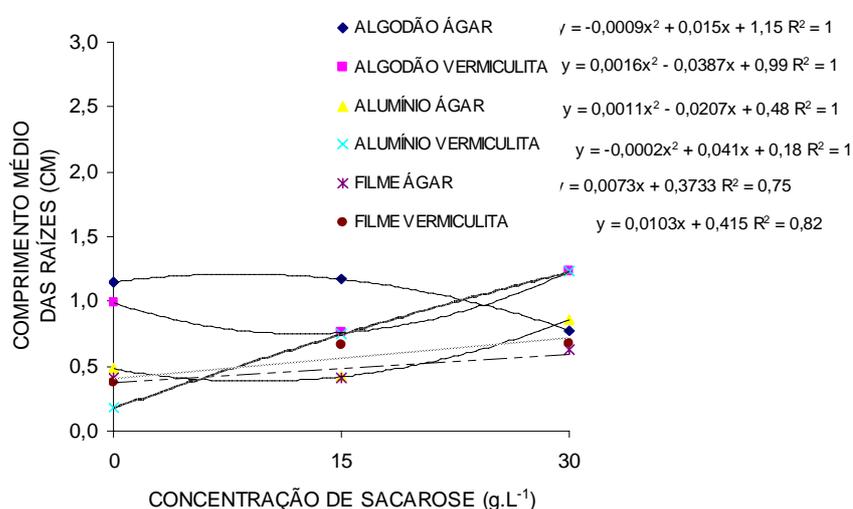


Figura 19 - Comprimento médio de raízes de framboeseira cv. Batum em função do tipo de tampa utilizado no fechamento dos frascos, do tipo de substrato utilizado para o enraizamento e da concentração de sacarose no meio de cultura. Pelotas, RS, 2007.

Através do quadro da análise de variância, pode-se observar uma interação quádrupla entre o tipo de vedação dos frascos, local de incubação, concentração de sacarose e tipo de substrato.

Maior peso da matéria-fresca foi observado com o uso de filme de PVC na vedação dos frascos, mantidos na sala de crescimento com vermiculita como substrato e a adição de 30g L^{-1} de sacarose (Tab. 11).

Tabela 11 - Peso médio da matéria-fresca (mg) de framboeseira cv. Batum em função do tipo de vedação dos frascos, local de incubação dos frascos, da concentração de sacarose e do tipo de substrato utilizado para o enraizamento. Pelotas, RS, 2007.

	ALGODÃO						ALUMINIO						FILME					
	Sala de crescimento			Casa de vegetação			Sala de crescimento			Casa de vegetação			Sala de crescimento			Casa de vegetação		
	0*	15	30	0	15	30	0	15	30	0	15	30	0	15	30	0	15	30
ÁGAR	104aA	62,3aA	45bA	32,3aA	45,3aA	55,3aA	52bA	46,7bA	70bA	116,7aA	61,7aAB	36aB	21bA	55,3bA	52bA	108,3aA	49,7aA	46,7aA
VERMICULITA	77,3aB	72,3aB	146,7aA	43,3aA	30,3aA	35,7aA	208,3aB	274,7aA	199,3aB	10bA	26,7aA	29,7aA	193,3aB	244aAB	286aA	102,3aA	26,7aB	41aAB
CV (%)	45,34																	

* Médias seguidas da mesma letra, minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de significância.

4. CONCLUSÃO

Concluiu-se que algodão é o melhor modo de vedação dos frascos de cultivo. Para o enraizamento *in vitro* de framboeseira cv. Batum, o melhor local de cultivo é a sala de crescimento sem a adição de sacarose no meio de cultura, obtendo-se maior porcentagem de enraizamento e número de raízes por explante.

DISCUSSÃO GERAL

A partir dos resultados obtidos nos experimentos preliminares de multiplicação *in vitro* de amoreira-preta 'Xavante' e framboeseira 'Batum' e 'Heritage' foi possível obter o melhor meio de cultura que promova a multiplicação *in vitro* dessas espécies. Como foi verificada a mesma tendência entre as três diferentes citocininas nos meios de cultivo, pode-se sugerir, baseando-se nos resultados obtidos, para amoreira-preta 'Xavante', que os explantes permaneçam com folhas, que seja utilizada a citocinina BAP na concentração de 13 μ M em meio MS com 125% de sais. Para framboeseira 'Batum' e 'Heritage', houve melhores resultados com a adição de 12 μ M de BAP em meio MS, visto que, para a obtenção de mesmo volume de solução, exige componentes de menor custo. A utilização de Zeatina ou 2iP implicaria maior custo de semelhante volume de solução, não justificando, portanto, a utilização destas no meio de cultivo.

A partir dos resultados obtidos nos experimentos preliminares de enraizamento *in vitro*, foi possível obter o melhor meio de cultura. Foi observada a mesma tendência para as espécies trabalhadas neste trabalho; pode-se sugerir, então, o uso do meio WPM adicionado de AIB em baixas concentrações, sendo suficiente a adição de 2,5 μ M de AIB. Concentrações maiores induziram a formação de calo na base das micro-estacas de amoreira-preta 'Xavante'; já 'Batum' exige maiores concentrações de auxina para promover o enraizamento *in vitro*, sendo necessária a adição de 6,5 μ M de AIB.

No experimento realizado com a cultivar Xavante de amoreira-preta e 'Batum' de framboeseira, a partir das avaliações, observam-se algumas diferenças quanto ao local de cultivo e o tipo de vedação dos frascos.

Quando plantas são cultivadas *in vitro*, em meio de cultura sem açúcar, surge a necessidade de se aumentar a intensidade luminosa e a difusão de CO₂ e da umidade (vapor da água) em volta da planta, para promover a fotossíntese, a

transpiração e o acúmulo de matéria seca. Explantes de framboesa mantidos na sala de crescimento, com o uso de alumínio na vedação dos frascos com a adição de 22g L⁻¹ mostraram-se melhores para a multiplicação de framboesa 'Batum'; já explantes de amoreira-preta 'Xavante' mantidas na casa de vegetação com o uso de alumínio e adição de 11,5g L⁻¹ mostraram-se melhores para a multiplicação. Para o enraizamento de 'Batum', obteve-se melhores resultados com os explantes mantidos na sala de vegetação, com algodão como vedação dos frascos e sem a adição de sacarose ao meio de cultura.

CONCLUSÕES GERAIS

- * Conclui-se que a utilização do meio MS, na concentração de 125% dos sais, adicionados de BAP na concentração de 13 μ M, é o tratamento mais eficiente na multiplicação *in vitro* de explantes com folhas de amoreira-preta 'Xavante', framboeseira cv. 'Batum' e 'Heritage', induzindo maior número de folhas, brotações e gemas.
- * Conclui-se que a utilização de 75% dos sais de MS sem a adição de carvão ativado é o tratamento mais indicado para o enraizamento *in vitro* de amoreira-preta 'Xavante'.
- * Concluiu-se que o meio WPM adicionado de AIB em baixas concentrações é o melhor meio de enraizamento, sendo suficiente a adição de 2,5 μ M ao meio de cultura e mantido por uma semana, seguido do cultivo em meio livre de regulador para amoreira-preta 'Xavante', e de 6,5 μ M de AIB para framboeseira 'Batum'.
- * Conclui-se que, em condições fotoautotróficas, o alumínio é o melhor modo de vedação dos frascos de cultivo. Para a multiplicação *in vitro* de amoreira-preta 'Xavante', o melhor local de cultivo é a casa de vegetação, e a adição de 22 g L⁻¹ de sacarose no meio de cultura para amoreira-preta 'Xavante' e de 11,5g L⁻¹ para framboeseira 'Batum', obtendo-se maior número de gemas por explante, folhas, comprimento das brotações e matéria fresca total. No entanto, para framboeseira 'Batum' o melhor local de cultivo é a sala de crescimento.
- * Concluiu-se que algodão é o melhor modo de vedação dos frascos de cultivo. Para o enraizamento *in vitro* de framboeseira 'Batum', o melhor local de cultivo é a sala de crescimento, sem a adição de sacarose no meio de cultura, obtendo-se maior porcentagem de enraizamento, número de raízes por explante.

REFERÊNCIAS

- AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A.; KOZAI, T. Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: photosynthetic ability and growth of different stage embryos. **Annals of Botany**, London, v.90, p.11-19, 2002.
- AITKEN-CHRISTIE, J. et al. (eds.) **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Dordrecht, Kluwer Academic, 1995. 574p.
- ALTMAN, A. Plant biotechnology in the 21st century: the challenges ahead. **EJB Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v.2, n.2, p.51-55, 1999. Capturado em 15 out. 2003. Online. Disponível na Internet: <http://www.ejb.org/content/vol2/issue2/full/1/>
- ANTUNES, L.E.C. **Aspectos fenológicos, propagação e conservação pós-colheita de frutas de amoreira-preta (*Rubus* spp) no sul de Minas Gerais**. 1999. 129 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.
- ANTUNES, L,E,C,; RASEIRA, M,C,B, **Aspectos Técnicos da Cultura da Amora-preta**, Pelotas, RS: Embrapa Clima Temperado, (Documento, 122), 2004, p, 54.
- ANTUNES, L.E.C. Amora-preta (*Rubus* spp). In: **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 28, n. 3, 2006.
- ARIGITA, L. et al. Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.115, p.166-173, 2002.
- ASSIS, T.F.; 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 – CNPH, 1998, v,1, p,183-260.
- GARCÍA, E. A.; GONZÁLEZ, A. M. C. Enraizamento *ex vitro* de cuatro cultivares de zarzamora (*Rubus* spp.). **Revista Chapingo**, v. 16, n. 78, p. 107-109, 1992.
- BRUM, G.R. Micropropagação da figueira (*Ficus carica* L.) 'Roxo de Valinhos'. 2001. 41 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

CALDWELL, J.D. Blackberry propagation. **HortScience**, Alexandria, 19(2), p.13-15, 1984.

CASTILLO, A.; CARRAU, J.S.F.; LEONI, C.; PEREIRA, G. Investigación en arandanos en Uruguay: propagación *in vitro* y evaluación de variedades por INIA. In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 2; ENCONTRO DE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS, 1., 2004, Pelotas. **Palestras e Resumos...** Pelotas, RS: Embrapa Clima Temperado (Documentos 124), 2004. p.225-228.

CASTRO, K.G. da S. De; SCHUCH, M.W.; BRAGA, E.J.B. Multiplicação *in vitro* de *Limonium brasiliensis* (BOISS.) Kuntze: diferentes concentrações de BAP e sais minerais no meio de cultura. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1.; 2003, Lavras. **Anais...**Lavras: UFLA, 2003.P. 132.

CENTELLAS, A.Q.; FORTES, G.R.L.; MÜLLER, N.T.G.; ZANOL, G.C.; FLORES, R.; GOTTINARI, R.A. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.2, p.181-186, 1999.

CHISTE, E. ; DAMIANI, C. R. ; SCHUCH, M.W. . Influência do Tipo de Vedação dos Frascos, Local de Crescimento e Sacarose na Multiplicação *in vitro* de Mirtilo, cultivar Delite. In: XV Congresso de Iniciação Científica e VIII Encontro de Pós-Graduação, 2006, Pelotas. **Resumos...**XV Congresso de Iniciação Científica e VIII Encontro de Pós-Graduação, 2006.

DAMIANI, C. R. ; SCHUCH, M.W. . Multiplicação Fotoautotrófica de Mirtilo, Cv. Georgiagem. In: III Simpósio Nacional do Morango II Encontro Sobre Pequenas Frutas e frutas nativas do Mercosul, 2006, Pelotas. **Resumos...** III Simpósio Nacional do Morango II Encontro Sobre Pequenas Frutas e frutas nativas do Mercosul, 2006. p. 71-78.

DANTAS, M. C. A.; CERETTA, M.; COUTINHO, F.E.; FORTES, G. R. de L. Enraizamento *in vitro* da amoreira-preta (*Rubus* sp.), cultivar Caigangue. **Agropecuária de Clima Temperado**, Pelotas, v. 3, n. 2, p. 123-130, 2000.

DOLCET-SANJUAN, R.; MOK, D.W.S.; MOK, M.C. Plantlet regeneration from cultured leaves of *Cydonia oblonga* L. (quince). **Plant Cell Reports**, New York, v.10, p.240-242, 1991.

DONNELLY, D.J.; STACE-SMITH, R.; MELLOR, F.C. In vitro culture of three *Rubus* species. **ActaHorticulturae**, Wageningen, n. 112, p. 69-75, 1980.

DZAZIO, P. M.; BIASI, L.A.; ZANETTE, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira '420-A'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – SP, v. 24, n. 3, p. 759-764, 2002.

DUSTAN, D.I.; LASHTA, D.P.; KIKCIO, S.I. et al. Factors affecting recurrent shoot multiplication *in vitro* cultures of 17 to 20 years-old douglas fir trees. **In vitro cell development biology**, Columbia, v.28, p.33-38, 1992.

EARLE, E.D.; LANGHANS, R.W. Propagation of *Crysanthemum in vitro*: II. Production, growth and flowering of plantlets from tissues culture. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 99, n. 4, p.352-358, 1974.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Micropropagação Fotoautotrófica e uso de luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, 9.961-965, 2005.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W.; BRAGA, E. J. B. Enraizamento *in vitro* de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Carrick. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, jan-fev, 2004.

ERIG, A.C.; DE ROSSI, A.; FORTES, G.R.L.de. 6-benzilaminopurina e ácido indolbutírico na multiplicação *in vitro* da amoreira - preta (*Rubus idaeus* L.), cv. Tupy. **Ciencia Rural**, vol.32 n. 5 Santa Maria, 2002.

FACHINELLO, J.C.; HOFFMMAN, A.; NACHTIGAL, J.C. KERSTEN, E.; FORTES, G.R. de L. Propagação de plantas frutíferas de clima temperado. Pelotas: UFPel, 1994. 179p.

FARIA, R.T.; RODRIGUES, F.N.; OLIVEIRA, L.V.R.; MÜLLER, C. *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.4, p.780-783, out-dez 2004.

FETT NETO, A.G. et al. Biochemical and morphological changes during *in vitro* rhizogenes in cuttings of ***Sequoia sempervirens*** (D. Don) Endl. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.140, p.720-728, 1992.

FORNI, R.C.; PASQUAL, M. Influência da citocinina BAP e concentrações dos componentes do meio 'MS' na micropropagação do café 'Catuaí'. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 20, n. 4, p. 468-474, 1996.

FRÁGUAS, C. B. **Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira "Roxo de Valinhos" em diferentes ambientes**. 2003. Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed. Edington: Exegetics, 1993. 2v.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics, 1984. 709 p.

GLOBO RURAL. A framboesa exige clima bem frio. Disponível em: http://globorural.globo.com/barra.asp?d=/edic/186/gr_responde.htm. Acesso em: 10 de fev. 2007.

GRATTAPAGLIA, D, & MACHADO, M,A, Micropropagação, In, TORRES, A,C,; CALDAS, L,S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília. ABCTP/EMBRAPA – CNPH, 1990. 433p., p. 99-169.

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 – CNPH, 1998, v,1, p,183-260.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 6. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997. p 549-622.

HEMPEL, M. From micropropagation to microponics (part II). **Practical Hydroponics & Greenhouses**, May/June, p.17-20, 1994. Capturado em 15 out. 2003. Online. Disponível na Internet:
<http://members.ozemail.com.au/~mhempel/publications/mponic2.htm>

HOEPFNER, A. S.; NESTBY, R.; NYBOM, H. Genetic deviation initiated by adventitious shoot regeneration from tissue cultured red raspberry. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 71, n. 1, p. 71-79, 1996.

HU, C.Y., WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud culture, In: EVANS, D.A., SHARP, W.R., et al. **Handbook of plant cell cultures**. New York: Macmillan, 1983. V.1, p. 177-227

KANECHI, M. et al. The effects of carbon dioxide enrichment, natural ventilation, and light intensity on growth, photosynthesis, and transpiration of cauliflower plantlets cultured *in vitro* photoautotrophically and photomixotrophically. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v.123, n.2, p.176-181, 1998.

KARAKULLUKÇU, S; AGAOGLU, Y. S.; ABAK, K. Effect of different auxin-cytokinin combinations on the *in vitro* propagation of raspberry cv. Schonemann. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 352, p. 127-132, 1993.

KITAYA, Y. et al. Visualization and analysis of air currents on plant tissue culture vessels. **Environment Control in Biology**, Oxford, v.35, n.2, p.139-141, 1997.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F.J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine'). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v.55, p.141-145, 1999.

KOZAI, T; KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v.114, p.525-537, 2001.

KOZAI, T. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (eds) **Micropropagation-technology and application**. Dordrecht, Kluwer Academic, 1991. p.447-469.

KOZAI, T.; NGUYEN, Q.T. Photoautotrophic micro-propagation of woody and tropical plants. In: JAIN, S.M.; ISHII, K. **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht, Kluwer Academic, 2003. p.757-781.

KOZAI, T.; CHUN, C.; ISLAM, A.F.M.S.; KUBOTA, C.; OHYAMA, K. **Efficient production of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) propagules and**

transplants using single node leafy cuttings in closed systems with artificial lighting. Capturado em 20 out. 2003. Online. Disponível na Internet: http://www.mykz.affrc.go.jp/workshop/ws2000/proceedings/pdf/p106_kozai.pdf

KODYM, A. et al. Cost reduction in the micropropagation of banana by using tubular skylights as source for natural lighting. ***In vitro Cellular and Developmental Biology Plant***, New York, v.37, p.237-242,2001.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F.J. Low-cost alternatives for the micropropagation of banana. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, Hague, v.66, p.67-71, 2001.

KUBOTA, C.; TADOKORO, N. Control of microbial contamination for large-scale photoautotrophic micropropagation. ***In vitro Cellular and Developmental Biology Plant***, New York, v.35, p.296-298, 1999.

KURATA, K.; KOZAI, T. (eds.) **Transplant production systems**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1992. p.299.

KRIKORIAN, A. D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In:ROCA, W. R.; MROGINSKI, L. A. **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1991. p. 41-78.

LEONTIEV-ORLOV, O.; ROGALSKI, M.; MOSSI, A. J. & CANSIAN, R. L. 6-Benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de prunáceas (*Prunus* sp.) **Revista Brasileira de Agrociência**, v.6 no 1, 42-46, jan-abr, 2000b.

LLOYD, G; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, v.30, p.421-427, 1980.

MACHADO, A., CONCEIÇÃO, A.R. Programa estatístico WinStat - Sistema de Análise Estatístico para Windows, versão 2.0. Pelotas, RS, 2002.

MACKAY, W.A. Micropropagation of Texas madrone, *Arbutus xalapensis* H.B.K. **Horticulturae Science**, vol. 31, n. 6, p. 1028-1029, 1996.

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

NAVES, V.C. **Propagação in vitro de bromélia imperial [*Ancantarea imperialis* (Carrière) Harms]**. 2001. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fititecna) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

NICOLOSO, F.T. et al. Micropropagação do Ginseng Brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.3, n.2, p.11–18, 2001.

- OLIVEIRA, P. D. **Propagação *in vitro* de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzlev.) cv. Orange Reagen**. 1994. 116 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras. 1994.
- OSTROLUCKÁ, M.G. LIBIAKOVÁ, G.; ONDRUŠKOVÁ, E.; GAJDOŠOVÁ, A. *In vitro* propagation of *Vaccinium* species. **Acta Universitatis Latviensis, Biology**, vol. 676, p. 207-212, 2004.
- PAGOT, E. Diagnóstico da produção e comercialização de pequenas frutas. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS, 2. : 2004, Vacaria, RS. **Anais...** Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, (Documentos 44), 2004. 53p.
- PAGOT, E.; HOFFMANN, A. Produção de Pequenas frutas no Brasil. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS, 1, 2002., Vacaria. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003.64p. (Embrapa Uva e Vinho. Documento, 37).
- PAIVA, P. D. O.; MAYER, M. B. D.; CAMPOS, R. J. C.; RODRIGUES, V. A.; PASQUAL, M. Propagação *in vitro* de gloxínia. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 3, n. 2, p. 29-41, 1997a.
- PAIVA, P.D.O de; JOSÉ, S.C.B.R.; PASQUAL, M.; PAIVA, R. Efeito do ácido naftaleno acético e GA3 na micropropagação de violeta. **Revista Ceres**, Viçosa, v.44, n.254, p.392-398, 1997b.
- PASQUAL, M. PEIXOTO, P.H.P. SANTOS, J.C.do ;PINTO,J.E.B.P.Propagação “*in vitro*” da amora-preta (*Rubus* sp.)cv.Ébano:uso de reguladores de crescimento.**Ciência e Prática**, Lavras,15(3),p.282-286,1991.
- PASQUAL, M.; ALVES, G.P.; DUTRA, L.F.; FINOTTI, D.R.; CHAGAS, E.A. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerina ‘Poncã’: concentrações do meio MS e da sacarose. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 49, n. 282, p. 181-189, 2002.
- PREECE, J.E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators? **Plant, Tissue Culture And Biotechnology**, Rehovot, v. 1, n. 1, p. 26-37,1995.
- RADMANN, E. B.; GONÇALVES, E. D.; FORTES, G. R. de L. Emprego de diferentes concentrações de ácido indolbutírico e do escuro no enraizamento *in vitro* de amoreira preta (*Rubus* sp.), cv. Ébano. In: ENCONTRO ESTADUAL DE BOTÂNICOS, 10, 2000, Ijuí-RS. **Livro de Resumos**. Ijuí, 2000.
- RAMIREZ DEL CASTILLO, A.; ANGARITA ZERDA, A. Estudios preliminares para la propagacion clonal *in vitro* de mora (*Rubus glaucus* L.). **Agronomía Colombiana**, Bogotá, v. 7, n. 1-2, p. 17-25, 1990.
- RASEIRA, M. do C. B.; SANTOS, A. M. dos; MADAIL, J.C.M. **Amora-preta: cultivos e utilização**. Pelotas: EMBRAPA-CNPFT, 1984. 20 P. (Circular Técnica, 11).
- RASEIRA, M.C.B.; GONÇALVES, E.D.; TREVISAN, R.; ANTUNES, L.E.C. **Aspectos Técnicos da Cultura da framboeseira**, Pelotas, RS: Embrapa Clima Temperado, (Documento, 120), 2004, p, 22.

ROGALSKI, M.; LEONTIEV-ORLOV, O. Estudo da micropropagação e morfogênese em ameixeira e pessegueiro. **Relatório Técnico-Científico PIBIC/CNPq**. Erechim. Universidade Regional Integrada do Alto-Uruguai e das Missões (URI), 1999, 151p.

ROGALSKI, M.; LEONTIEV-ORLOV, O.; MOSSI, J.A.; CANSIAN, R.L. Efeito de diferentes concentrações de benziladenina (BA) e macroíons na multiplicação *in vitro* de ameixeira (*Prunus domestica* L. – var. Kantimirovskaja) In: Congresso Nacional de Genética, 45, 1999, Gramado, RS, **Supplement Genetics and Molecular Biology – Programa e Resumos**, Gramado: SBG, 1999, p.714a.

SANTOS, A.M. dos; RASEIRA, M. do C.B. **Lançamento de cultivares de amoreira-preta**. Pelotas: EMBRAPA-CNPFT, 1988. Não paginado. (Informativo, 23).

SILVEIRA, C.A.P.; FACHINELLO, J.C.; FORTES, G.R.L. de; CITADIN, I.; RODRIGUES, A.C.; QUEZADA, A.C.; SILVA, J.B. Multiplicação *in vitro* de porta-enxerto do gênero *Prunus* sob diferentes concentrações de BAP em dois meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, V. 23, N. 3, P. 488-492, 2001.

SCHUCH, M.W.; ERIG, A.C, Micropropagação de Plantas Frutíferas, In: (autores do livro ou editores) **Propagação de plantas frutíferas**, Pelotas: UFPel (no prelo)

SKIRVIN, R. M.; CHU, M. C.; GOMEZ, E. In vitro propagation of Thornless Treiling Blackberries. **HortScience**, Alexandria, v. 16,n. 3, p. 310-312, 1981.

SRISKANDARAJAH, S.; MULLINS, M.S. Micropropagation of Granny Smith apple: factors affecting root formation in vitro. **Journal of Horticultural Science**, v.56, n.1, p.71-76, 1981.

SRISKANDARAJAH, S.; MULLINS, M. G.; NAIR, Y. Induction of adventitious rooting *in vitro* in difficult to propagate cultivars of apple. **Plant Science Letters**, Limerick, v.24, p.1-9, 1982.

SOARES, G.C. ; DAMIANI, C. R. ; SCHUCH, M.W. . Efeito do Tempo de Exposição do AIB no Meio de Cultura no Enraizamento *in vitro* de Mirtilo. In: XV Congresso de Iniciação Científica e VIII Encontro de Pós-Graduação, 2006, Pelotas. **Anais do...Pelotas**, 2006.

STANDAERT DE METSENAERE, R.E.A. Economic considerations. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (eds.) **Micropropagation**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1991. p.131-140.

SRISKANDARAJAH, S., MULLINS, M. G., NAIR, Y. Induction of adventitious rooting *in vitro* in difficult to propagate cultivars of apple. **Plant Science Letters, Limerick**, v.24, p. 1-9, 1982.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**, Redwood City California: 1991. cp.16, p.398-424.

TODA FRUTA. Características da framboesa. Disponível em:
http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=11822.
Acesso em: 10 de fev. 2007.

TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. Micropropagação de plantas ornamentais. **Boletim Técnico do Instituto Agrônomo**, Campinas, n. 174, p. 58-62, maio 1998.

VILLA, F.; ARAÚJO, A.G.de; PIO, L.A.S.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* da amoreira-preta 'Ébano' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.29, n.3, p. 582-589, 2005.

VILLA, F.; FRÁGUAS, C.B.; DUTRA, L.F.; PIO, L.A.S.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* de amoreira-preta cultivar Brazos. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.30, n.2, p. 266-270, 2006.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; ARAÚJO, A.G.de; PIO, L.A.S. Micropropagação da amoreira-preta (*Rubus* spp.) e efeito de substrato na aclimatização de plântulas. **Acta Science Agronômica**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 47/53, 2006.

WELANDER, M. *In vitro* culture of raspberry (*Rubus idaeus*) for mass propagation. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 60, n. 4, p. 493-499, 1985.

YUI, E. Multiplicação *in vitro* de porta enxerto de macieira (*Malus x domestica* Borck). Lavras, 1990. 69p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura de Lavras.

ZOBAYED, S.M.A.; AFREEN, F.; KOZAI, T. Quality biomass production via photoautotrophic micropropagation. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.530, p.377-386, 2000.

ZOBAYED, S.M.A.; AFREEN, F.; KOZAI, T. Physiology of *Eucalyptus* plantlets grown photoautotrophically in a scaled-up vessel. **In vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, New York, v.37, p.807-813, 2001.

ZIMMERMAN, R.H. Cultivo de tecidos. In: MOORE, J.N.; JANICK, J. **Métodos genotécnicos en frutales**. México: AGT, 1988. p.167-182.

Apêndice

TABELA 1A - Resumo da análise de variância para as variáveis número médio de brotações (NMB), número médio de folhas (NMF), número médio de gemas (NMG) e comprimento médio das brotações (CMB) dos explantes de amoreira-preta 'Xavante' referente ao capítulo 1. UFPel, Pelotas – RS, 2006.

Fontes	GL	NMB		NMF		NMG		CMB	
		QM	p	QM	p	QM	p	QM	p
Citocinina (A)	2	0,829372	2.175E-005	6.474028	4.081E-006	7.26091	7.579E-006	0.12806	0.0347
Concentração (B)	3	0,1900172	0,04181	1.549461	0.01825	1.28867	0.0671	0.008909	0.8641
Meio (C)	1	0,135355	0,1562	2.287853	0.02464	1.44713	0.09872	0.008626	0.6273
A x B	6	0,088675	0,2487	0.666094	0.1793	0.74597	0.2106	0.107884	0.0121
C x B	3	0,26555	0,01057	1.847062	0.008063	2.01018	0.0125	0.18266	0.8325
A x C	2	0,0414047	0,5363	0.351581	0.4486	0.45638	0.418	0.077051	0.1272
A x B x C	6	0,182444	0,01796	1.81477	0.001201	2.05872	0.00176	0.33068	2.432E-007
Resíduo	69	0,065855		0.433504		0.51659		0.036266	
CV. (%)		18.71		26.08		26.39		39.35	

TABELA 2A - Resumo da análise de variância para as variáveis número médio de brotações (NMB), número médio de folhas (NMF), número médio de gemas (NMG) e comprimento médio das brotações (CMB) dos explantes de framboeseira 'Batum' referente ao capítulo 1. UFPel, Pelotas – RS, 2006.

Fontes	GL	NMB		NMF		NMG		CMB	
		QM	p	QM	p	QM	p	QM	p
Meio (A)	1	0.004291	0.6809	0.093203	0.4626	0.16545	0.3741	0.08461	0.2877
Concentração (B)	3	0.150071	0.00112	1.47084	6.234E-005	1.78192	6.176E-005	0.14747	0.1218
Citocinina (C)	2	0.009822	0.6784	0.10937	0.5302	0.011867	0.9443	0.48641	0.0023
A x B	3	0.072436	0.0422	0.5060913	0.03809	0.86925	0.00862	0.07810	0.3719
C x B	6	0.043298	0.1292	0.406353	0.03795	0.56685	0.0189	0.1213	0.1477
A x C	2	0.0038254	0.8593	0.200914	0.3146	0.110963	0.5871	0.05552	0.4746
A x B x C	6	0.039149	0.1734	0.32576	0.0915	0.43638	0.0629	0.15638	0.0616
Resíduo	69	0.025167		0.170828		0.206743		0.07369	
CV. (%)		13.09		19.38		18.74		40.72	

TABELA 3A - Resumo da análise de variância para as variáveis número médio de brotações (NMB), número médio de folhas (NMF), número médio de gemas (NMG) e comprimento médio das brotações (CMB) dos explantes de framboeseira 'Heritage' referente ao capítulo 1. UFPel, Pelotas – RS, 2006.

Fontes	GL	NMB		NMF		NMG		CMB	
		QM	p	QM	p	QM	p	QM	p
Meio (A)	1	0.001899	0.8105	0.4627683	0.1951	0.2878916	0.3519	0.3456	0.01051
Concentração (B)	3	0.09270784	0.04482	1.323927	0.003825	1.453319	0.006576	0.1713611	0.02167
Citocinina (C)	2	0.09477092	0.06229	1.371928	0.008792	1.831105	0.005642	0.3532167	0.001608
A x B	3	0.1614034	0.003708	1.297515	0.004287	1.729897	0.002461	0.2263667	0.005857
C x B	6	0.05435475	0.1446	0.4682116	0.1266	0.6055254	0.1026	0.09356111	0.09784
A x C	2	0.02826988	0.4267	0.3700477	0.2613	0.3813001	0.3185	0.13835	0.06964
A x B x C	6	0.04831236	0.2001	0.5663452	0.06488	0.6610931	0.07502	0.07271667	0.2064
Resíduo	69	0.03278412		0.2703795		0.3277903		0.0499471	
CV. (%)		16.38		26.91		26.86		48.89	

TABELA 4A - Resumo da análise de variância para as variáveis número médio de brotações (NMB), número médio de folhas (NMF), número médio de gemas (NMG) e comprimento médio das brotações (CMB) dos explantes de amoreira-preta 'Xavante' referente ao capítulo 2. UFPel, Pelotas – RS, 2006.

Fontes	GL	NMB		NMF		NMG		CMB	
		QM	p	QM	p	QM	p	QM	p
Presença de folha (A)	1	0.683077	0.003863	133.25 28	0.0001894	6.26316	0.0003811	0.8613281	0.000704
Concentração (B)	3	1.051038	1.098E-005	102.86 11	1.36E-005	8.30283	6.228E- 007	0.5787865	0.000192
A x B	3	0.086121	0.2917	23.522 8	0.03052	0.77129	0.1186	0.0324281	0.627
Resíduo	21	0.064811		6.5349		0.35117		0.0547578	
CV. (%)		20.03		25.59				50.62	

TABELA 5A - Resumo da análise de variância para as variáveis número médio de raízes (NMR), porcentagem de enraizamento (%) e comprimento médio das raízes (CMR) dos explantes de amoreira-preta 'Xavante' referente ao capítulo 2. UFPel, Pelotas – RS, 2006.

Fontes	GL	NMR		%		CMR	
		QM	p	QM	p	QM	p
Carvão ativado (A)	2	0.6221323	0.0005663	0.41539 4	0.02227	4.851419	0.0001825
Concentração (B)	2	0.2436252	0.03022	0.27595 6	0.07017	1.465503	0.03676
A x B	4	0.245873	0.01134	0.13271 4	0.2544	0.2711528	0.5972
Resíduo	24	0.0599657 5		0.09278 9		0.3853819	
CV. (%)		17.59		32.26		51.45	

TABELA 6A - Resumo da análise de variância para as variáveis número médio de raízes (NMR), porcentagem de enraizamento (%) e comprimento médio das raízes (CMR) dos explantes de amoreira-preta 'Xavante' referente ao capítulo 3. UFPel, Pelotas – RS, 2006.

Fontes	GL	NMR		%		CMR	
		QM	p	QM	p	QM	p
Meio (A)	1	5.511282	3.205E-006	3.880256	4.112E-005	7.552205	0.0008817
Concentração (B)	4	0.0695877	0.8521	0.3629927	0.1322	5.713312	7.226E-006
Tempo cultivo(C)	1	0.4649064	0.1392	0.2254574	0.2885	4.10418	0.01223
A x B	4	0.8832837	0.3806	0.2926938	0.2172	0.137792	0.9234
C x B	4	1.5458996	0.1282	0.1259295	0.6353	0.49448	0.5259
A x C	1	0.0587594	0.596	0.0069499	0.8515	0.03362	0.8157
A x B x C	4	0.6403580	0.5463	0.06777673	0.8463	0.71797	0.333
Resíduo	57	11.781299		0.196392		0.612835	
CV. (%)		27.45		42.90		67.41	

TABELA 7A - Resumo da análise de variância para as variáveis número médio de raízes (NMR), porcentagem de enraizamento (%) e comprimento médio das raízes (CMR) dos explantes de framboeseira 'Batum' referente ao capítulo 3. UFPel, Pelotas – RS, 2006.

Fontes	GL	NMR		%		CMR	
		QM	p	QM	p	QM	p
Meio (A)	1	3.028403	6.354E-006	3.872365	1.001E-005	4.08608	2.088E-007
Concentração (B)	4	0.09659396	0.5369	0.03742218	0.9221	0.19013	0.1816
Tempo cultivo(C)	1	1.433651	0.001154	2.75964	0.0001359	0.055125	0.4959
A x B	4	0.2216587	0.1392	0.3627166	0.08026	0.254255	0.08428
C x B	4	0.277501	0.07304	0.4223144	0.04795	0.344875	0.02805
A x C	1	1.488059	0.0009477	2.090073	0.0007527	1.551245	0.0005964
A x B x C	4	0.07349223	0.6638	0.1325913	0.5273	0.165695	0.2416
Resíduo	57	0.1223772		0.1647769		0.11734	
CV. (%)		27.96		55.79		71.14	

TABELA 8A - Resumo da análise de variância para as variáveis número médio de brotações (NMB), número médio de folhas (NMF), número médio de gemas (NMG) e matéria-fresca (MF) dos explantes de framboeseira 'Batum' referente ao capítulo 4. UFPel, Pelotas – RS, 2006.

Fontes	GL	NMB		NMF		NMG		MF	
		QM	p	QM	p	QM	p	QM	p
Local (A)	1	0.66107	3.604E-005	2.55908	4.237E-005	2.870671	5.18E-005	2.587598	0.367
Sacarose (B)	2	0.79630	3.161E-008	6.65829	0	6.926344	0	28.57136	0.000403
Vedação (C)	2	0.0427837	0.2743	0.20255	0.2142	0.2764071	0.1629	11.96697	0.02817
A x B	2	0.0309146	0.3902	0.00459	0.9646	0.01766622	0.887	1.562458	0.6093
C x B	4	0.0606567	0.128	0.18814	0.2234	0.2694504	0.1367	1.63357	0.7192
A x C	2	0.1905734	0.004914	0.52147	0.02253	0.638307	0.01812	8.924041	0.06667
A x B x C	4	0.0074905	0.9189	0.21110	0.1748	0.2492527	0.1653	1.151868	0.8298
Resíduo	51	0.0322446		0.12751		0.1469553		3.12355	
CV. (%)		13.36		16.55		16.48		32.83	

TABELA 9A - Resumo da análise de variância para as variáveis número médio de brotações (NMB), número médio de folhas (NMF), número médio de gemas (NMG) e matéria-fresca (MF) dos explantes de amoreira-preta 'Xavante' referente ao capítulo 4. UFPel, Pelotas – RS, 2006.

Fontes	GL	NMB		NMF		NMG		MF	
		QM	p	QM	p	QM	p	QM	p
Local (A)		2.636184	0	7.387572	0	8.679797	0	11.68588	0.02097
Sacarose (B)		2.286108	0	6.360718	0	7.464489	0	87.40704	0
Vedação (C)		0.0208413	0.5429	0.1631186	0.1161	0.1754061	0.1188	3.160316	0.2253
A x B		2.275579	0	5.735591	0	6.936771	0	50.87097	3.141E-00
C x B		0.1264582	0.009464	0.1730226	0.06351	0.174134	0.08139	1.301743	0.6418
A x C		0.3950334	6.493E-005	0.0628558	0.4269	0.0446239	0.5717	0.09065834	0.957
A x B x C		0.1676664	0.001836	0.0176919	0.9122	0.0179666	0.9217	0.2405901	0.976
Resíduo		0.0337102		0.07261		0.0789433		2.058918	
CV. (%)		12.21		11.83		11.54		26.71	