

Nova metodologia para micropropagação de framboeseira¹

Roberto Pedroso de Oliveira²
Paulo Sérgio Gomes da Rocha³
Vanessa Flores Gularte⁴
Walkyria Bueno Scivittaro²

Introdução

A framboeseira (*Rubus idaeus* L.) é uma espécie do grupo das chamadas pequenas frutas, cuja produção pode ser destinada ao mercado *in natura* ou à fabricação de polpa, purê, conserva, geléia e sucos (DONADIO et al., 1998). Trata-se de uma cultura de baixo custo de implantação e de manutenção, que demanda bastante mão-de-obra, mas que apresenta alta rentabilidade por hectare, sendo uma boa alternativa de renda para pequenas propriedades familiares das regiões de clima subtropical e temperado (OLIVEIRA et al., 2006).

A propagação da framboeseira pode ser realizada por estaquia de raízes, enraizamento de estacas e por cultura *in vitro* de tecidos, sendo este último procedimento o mais seguro para evitar contaminações por vírus,

fungos, bactérias e/ou nematóides (OLIVEIRA et al., 2009). Há 18 anos, a Embrapa Clima Temperado micropropaga framboeseiras, tendo sido produzidas milhares de mudas, as quais têm sido disponibilizadas a produtores de diferentes Estados.

O gênero *Rubus* é bastante responsivo *in vitro*, obtendo-se taxas de multiplicação satisfatórias, com valores variando de 3,0 a 7,9 por subcultivo de 30 a 45 dias, dependendo da cultivar e das condições de cultivo (ANDERSON, 1980; OLIVEIRA et al., 2009). No entanto, uma observação mais detalhada das plantas, durante o seu desenvolvimento *in vitro*, indicou a existência de sintomas de clorose internerval, confirmada, após análise química, como sendo decorrente de deficiência de ferro.

¹Trabalho de pesquisa realizado com apoio financeiro e bolsas do CNPq.

²Eng. Agrôn., Dr., Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. (rpedroso@cpact.embrapa.br) ; (wbscivit@cpact.embrapa.br)

³Bolsista Pós-doutorado CNPq.

⁴Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Católica de Pelotas, Bolsista CNPq, Pelotas, RS.

O ferro é um micronutriente essencial para a organização dos meristemas e crescimento das brotações, atuando como cofator de múltiplos elementos no sistema de transporte de elétrons, em processos enzimáticos e na eficiência fotossintética das plantas (HANSEN et al., 2006). Em cultura de tecidos, o ferro pode ser adicionado na forma quelatizada (FeDTPA, FeEDTA, FeEDDHA e FeEDDHMA) ou inorgânica (FeSO_4 ou FeCl_3), sendo utilizado, no meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), a fonte $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Este trabalho teve por objetivo ajustar a concentração de ferro no meio de cultura para otimizar a micropropagação de framboeseira.

Metodologia

O trabalho foi realizado no laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado, situado em Pelotas, RS.

Para o experimento foram utilizados explantes de 8-10 mm contendo 3-4 gemas das cultivares Heritage e Batum, provenientes de três subcultivos em meio MS completo suplementado com $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. Foram estudadas as concentrações de 0, 25, 50 e 75 mg L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ no meio MS. Em todos os tratamentos utilizou-se $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP no meio de cultura, sendo o cultivo realizado sob $20 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas. Desta forma, realizou-se três subcultivos de 45 dias (Subcultivos 4, 5 e 6), utilizando um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2 cultivares x 4 concentrações de ferro), com quatro repetições. A unidade experimental foi constituída por um frasco contendo cinco explantes. As variáveis analisadas foram: taxa de multiplicação, níveis de contaminação, vitrificação e oxidação e ocorrência de sintomas de deficiência ou toxidez de ferro. Para a determinação da taxa de multiplicação acumulada, multiplicaram-se os valores obtidos nos subcultivos 4, 5 e 6.

Os dados foram submetidos à análise de variância, comparando-se as médias do fator cultivar pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e do fator concentração de ferro no meio de cultura, por análise de regressão polinomial.

Resultados e Discussão

Nos três subcultivos iniciais em meio MS completo com $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ BAP (Subcultivos 1, 2 e 3), todas as plantas de framboeseira apresentaram sintomas de deficiência de ferro, ou seja, clorose internerval das folhas mais novas, permanecendo as nervuras das folhas com a coloração verde e o limbo, amarelo-esbranquiçado. Isto demonstra que a framboeseira é mais exigente nesse micronutriente do que a maioria das espécies. De forma geral, os sintomas visuais iniciaram na segunda semana de cultivo, intensificando-se ao longo do subcultivo.

Para as cultivares de framboeseira Heritage e Batum, o efeito da concentração de ferro do meio de cultura sobre a taxa de multiplicação foi ajustado a modelos quadráticos de regressão nos três subcultivos estudados. Na figura 1, subcultivos 5 e 6, observa-se desempenho similar das duas cultivares quanto à taxa de multiplicação nas diferentes concentrações de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, embora a 'Heritage' sempre tenha sido mais responsiva *in vitro*. Apenas no subcultivo 4 houve pequena variação nos resultados, provavelmente em função da mudança na composição do meio de cultivo. A ausência de ferro no meio ocasionou morte de todas as plantas no subcultivo seguinte, confirmando sua essencialidade (DECHEN e NACHTIGALL, 2006). Além da importância do ferro nos processos enzimáticos e de fotossíntese, a deficiência do nutriente leva à deficiência de P, S, Cu, Zn e Mn e ao aumento na concentração de Ca e K nos tecidos, afetando o desenvolvimento das plantas (SILVEIRA et al., 2007).

Com base nos resultados obtidos nos subcultivos 4, 5 e 6, determinaram-se as concentrações de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ que otimizaram a multiplicação *in vitro* da cv. Heritage (853,3 plantas) e da Batum (523,7 plantas), as quais foram: $43,4$ e $43,1 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente (**Figura 1**). Essas concentrações de ferro são bastante superiores à recomendada por MURASHIGE e SKOOG (1962) no seu meio MS, que é de $27,85 \text{ mg L}^{-1}$. Deve-se considerar, no entanto, que o meio MS foi desenvolvido visando o crescimento de calos de tabaco, tendo sido utilizado de forma quase que generalizada em cultura de tecidos de

inúmeras espécies, sem a prévia adequação e validação para a otimização do desenvolvimento *in vitro* de outras espécies. Os resultados evidenciaram a necessidade de suplementação do meio MS com ferro para a micropropagação de framboeseira.

Durante o cultivo *in vitro*, as plantas estudadas não apresentaram formação de calos, contaminação por bactérias e por fungos e nem vitrificação. Quanto à oxidação dos explantes, esta ocorreu, apenas, no tratamento MS isento de ferro, para o qual se verificou morte de todos os explantes já a partir do segundo subcultivo.

Conclusões

1. A framboeseira exigiu maior concentração de ferro do que a proposta no meio MS para o adequado desenvolvimento *in vitro*.
2. A concentração ideal de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ no meio de cultura MS para micropropagação da 'Heritage' foi de $43,4 \text{ mg L}^{-1}$ e da 'Batum' de $43,1 \text{ mg L}^{-1}$.

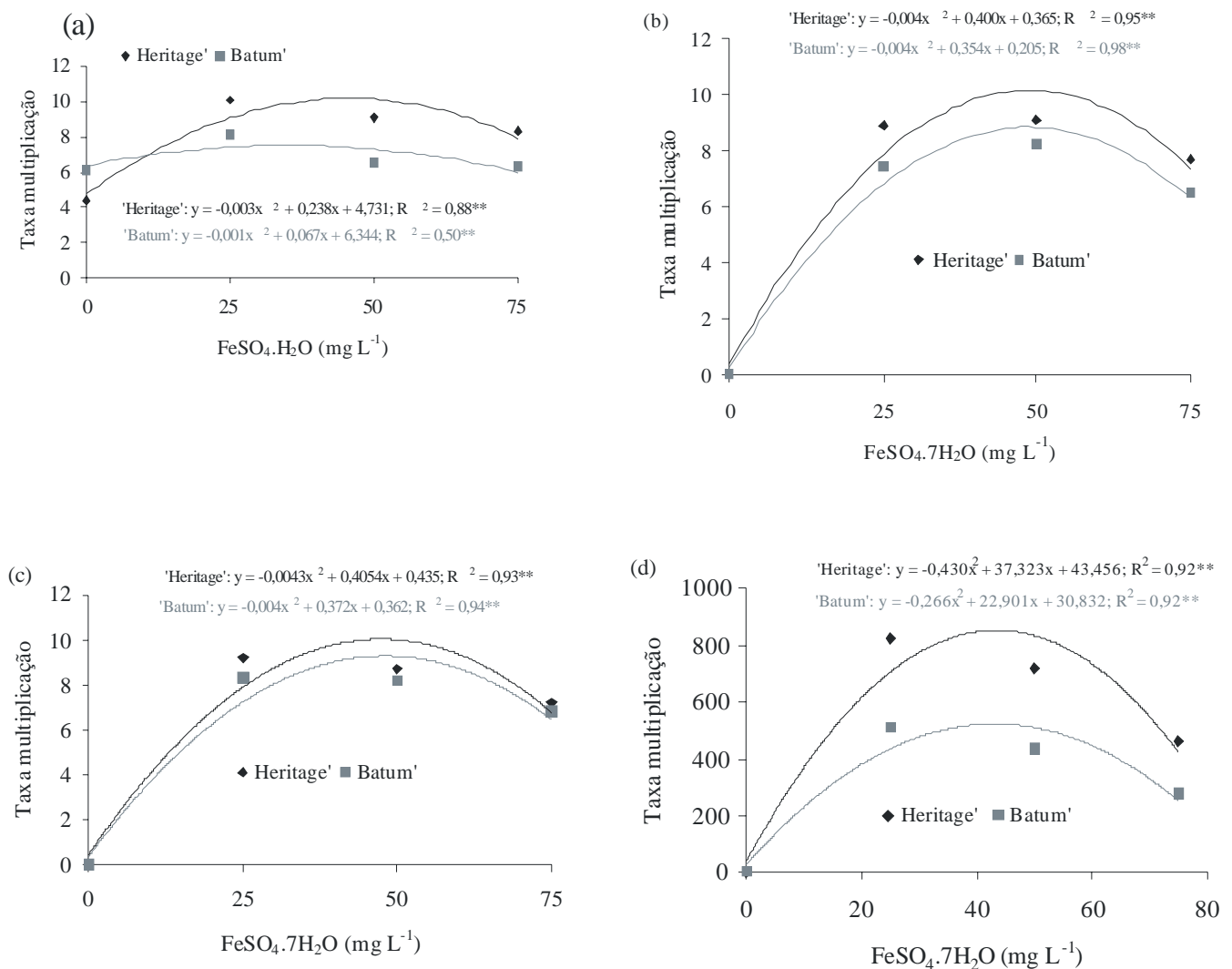


Figura 1. Taxa de multiplicação de explantes de framboeseira (*Rubus idaeus* L. cvs. Heritage e Batum) no 4º (a), 5º (b) e 6º (c) subcultivo em meio MS modificado com diferentes concentrações de ferro. Gráfico (d) refere-se à taxa média de multiplicação nos três subcultivos.

Referências

ANDERSON, W. C. Tissue culture propagation of red and black raspberries *Rubus idaeus* and *R. occidentalis*. *Acta Horticulturae*, The Hague, v. 112, p. 13-20, 1980.

DECHEN, A. R.; NACHTIGALL, G. R. Micronutrientes. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 327-354.

DONADIO, L. C.; NACHTIGALL, J. C.; SACRAMENTO, C. K. **Frutas exóticas**. Jaboticabal: Funep, 1998. 279 p.

HANSEN, N. C.; HOPKINS, B. G.; ELLSWORTH, J. W.; JOLLEY, V. D. Iron nutrition in field crops. In: BARTON, L. L.; ABADIA, J. (Ed.). **Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms**. Dordrecht: Springer, 2006. p. 23-59.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco

tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

OLIVEIRA, R. P.; NINO, A. F. P. Potencial de multiplicação *in vitro* de cultivares de framboeseira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 1, p. 280-284, 2009.

OLIVEIRA, R. P.; RASEIRA, M. C. B.; NICKEL, O.; NINO, A. F. P.; SILVA, F. O. X. **Produção de mudas certificadas de framboeseira por meio de cultura *in vitro* de tecidos**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. 42 p. (Embrapa Clima Temperado. Sistema de produção, 9).

SILVEIRA, V. C.; OLIVEIRA, A. P.; SPEROTTO, R. A.; ESPINDOLA, L. S.; AMARAL, L.; DIAS, J. F.; CUNHA, J. B.; FETT, J. P. Influence of iron on mineral status of two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 19, n. 2, p. 127-139, 2007.

Comunicado Técnico, 211

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado

Endereço: Caixa Postal 403

Fone/fax: (53) 3275-8199

E-mail: sac@cpact.embrapa.br



1ª edição

1ª impressão 2009: 50 exemplares

Comitê de publicações

Presidente: Ariano Martins de Magalhães Júnior

Secretário-Executivo: Joseane Mary Lopes

Membros: José Carlos Leite Reis, Ana Paula

Schneid Afonso, Giovani Theisen, Luis Antônio

Suita de Castro, Flávio Luiz Carpena Carvalho,

Christiane Rodrigues Congro Bertoldi e Regina das

Graças Vasconcelos dos Santos **Suplentes:** Márcia

Vizzotto e Beatriz Marti Emygdio

Expediente

Normalização bibliográfica: Regina das Graças Vasconcelos dos Santos

Editoração eletrônica: Oscar Castro

Composição e Impressão: Embrapa Clima Temperado