

ISSN 1516-8840

Novembro, 2010

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Embrapa Clima Temperado

Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento

Documento 326

Protocolos de micropropagação de plantas II: amoreira-preta

Leonardo Ferreira Dutra

Natália Dias Gomes da Silva

Kerlley Cristina de Assis Mayer

Antonio Fernando Pacheco Nino

Francisco Osmi Xavier da Silva

Francisco Carlos Budjarck Vieira

Embrapa Clima Temperado

Pelotas, RS

2010

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado
BR 392 Km 78
Caixa Postal 403, CEP 96010-971- Pelotas, RS
Fone: (53) 3275-8199
Fax: (53) 3275-8219 – 3275-8221
Home Page: www.cpact.embrapa.br
e-mail: sac@cpact.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: Ariano Martins de Magalhães Júnior
Secretária - Executiva: Joseane Mary Lopes Garcia
Membros: Márcia Vizzotto, Ana Paula Schneid Afonso, Giovani Theisen, Luis Antônio Suíta de Castro, Flávio Luiz Carpena Carvalho, Christiane Rodrigues Congro, Regina das Graças Vasconcelos dos Santos.
Suplentes: Isabel Helena Vernetti Azambuja e Beatriz Marti Emygdio.

Supervisão editorial: Antônio Luiz Oliveira Heberlê
Revisão de texto: Bárbara Chevallier Cosenza
Normalização bibliográfica: Fábio Lima Cordeiro
Editoração eletrônica e arte da capa: Manuela Meurer Doerr (estagiária)

1ª edição
1ª impressão (2010): 50 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei N° 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Embrapa Clima Temperado

Protocolos de micropropagação de planta II: amoreira-preta / Leonardo Ferreira Dutra... [et al.] – Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010.
21 p. – (Embrapa Clima Temperado. Documentos,326).

ISSN 1516-8840

1. Amora – Mudas – Plantio. 2. Micropropagação. 3. Produção – Material de Propagação – Qualidade. I. Dutra, Leonardo Ferreira. II. Série.

CDD 634.713

Autores

Leonardo Ferreira Dutra

Eng. Agrôn., D.Sc.

Pesquisador da

Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS,

leonardo.dutra@cpact.embrapa.br

Natália Dias Gomes da Silva

Graduanda em Ciências Biológicas,

Bolsista PIBIC/CNPq,

Embrapa Clima Temperado/ Anhanguera

Educacional, Pelotas, RS,

nataliadiasgomes@hotmail.com

Kerlley Cristina de Assis Mayer

Eng. Agrôn., M.Sc. em Agronomia

Bolsista DTI-2 / CNPq,

Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS,

kerlleyca@hotmail.com

Antonio Fernando Pacheco Nino

*Assistente de pesquisa da
Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS,
nino.antonio@cpact.embrapa.br*

Francisco Osmi Xavier da Silva

*Assistente de pesquisa da
Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS,
osmi.silva@cpact.embrapa.br*

Francisco Carlos Budjiarck Vieira

*Assistente de pesquisa da
Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS,
carlos.vieira@cpact.embrapa.br*

Apresentação

A amoreira-preta foi introduzida no Brasil na década de 1970 pela Embrapa Clima Temperado. Atualmente, a área cultivada já ultrapassa os 250 ha, com produção superior a 700 toneladas.

Como esta espécie é propagada principalmente por meio de estacas de raiz, rebentos e hastes novas, existe elevado índice de disseminação de pragas e doenças. Uma possibilidade para contornar este problema é a micropropagação, técnica que, via cultura de meristemas ou ápices caulinares, proporciona a obtenção de mudas isentas de contaminação por vírus, fungos, bactérias e nematoides.

O protocolo de micropropagação de amoreira-preta já está estabelecido e é utilizado amplamente. No entanto, não há uma publicação explicando o procedimento detalhadamente.

Neste sentido, como o Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado tem micropropagado a amoreira-preta desde os anos 1980, o objetivo desta publicação é descrever o protocolo de micropropagação passo a passo desta espécie, visando enriquecer a literatura existente e dar subsídios à produção de mudas via cultura de tecidos.

Waldyr Stumpf Junior
Chefe Geral
Embrapa Clima Temperado

Sumário

Introdução.....	9
Protocolos de Micropropagação de Plantas II: Amoreira-preta.....	9
Protocolo	11
Origem do material vegetal:.....	11
Plantas a campo:	11
Plantas estabelecidas in vitro:.....	15
Referências	19

Protocolos de Micropropagação de Plantas II: Amoreira-preta

Leonardo Ferreira Dutra

Natália Dias Gomes da Silva

Kerlley Cristina de Assis Mayer

Antonio Fernando Pacheco Nino

Francisco Osmi Xavier da Silva

Francisco Carlos Budjiarck Vieira

Introdução

O cultivo da amoreira-preta teve início no Brasil na década de 1970, quando as primeiras mudas procedentes da Universidade de Arkansas foram introduzidas pelo Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (CPACT) da Embrapa, em Pelotas, Rio Grande do Sul.

A área cultivada com amoreira-preta vem crescendo nos últimos anos. Em 2003, a produção brasileira foi de 1.300 toneladas em uma área de 110 hectares, dentre as pequenas frutas, perdendo apenas para a cultura do morangueiro (PAGOT; HOFFMANN, 2003). Já em 2007 a área cultivada foi de 250 ha, com uma produção de 780 toneladas, das quais cerca de 15% foram exportados e o restante da produção foi processado e utilizado para consumo no mercado interno, sendo principalmente a cultivar Tupy (STRIK et al., 2007).

A produtividade da amoreira-preta para regiões de clima temperado pode chegar a 5 mil kg ha⁻¹, 7,5 mil kg ha⁻¹ e 12 mil kg ha⁻¹ para o primeiro, segundo e terceiro ano de produção, respectivamente (SANTOS et al. 1997; ANTUNES, 2002; ATTILIO, 2009).

A propagação da amoreira-preta dá-se principalmente por meio de

estacas de raiz, rebentos e hastes novas (ANTUNES, 1999). No entanto, o índice de disseminação de pragas e doenças via estaquia de raízes e enraizamento de estacas é relativamente elevado (AUGUSTO, 2001). Uma possibilidade para contornar este problema é a micropropagação, que, além de produzir grande número de mudas em espaço e tempo reduzidos, pode proporcionar que estas estejam isentas de contaminação por vírus, fungos, bactérias e nematoides (EUROPEAN, 2004).

A técnica de micropropagação utilizada para a produção de plantas matrizes ou de mudas de amoreira-preta isentas de viroses é a cultura de meristemas. Além do aspecto fitossanitário, a micropropagação possibilita produzir mudas com características genéticas idênticas às da planta-matriz, permitindo a clonagem de genótipos selecionados, com alta qualidade genética. Como as mudas produzidas são uniformes em relação às suas características genéticas, são facilitados o manuseio e os tratos culturais (AUGUSTO, 2001).

De acordo com Ramirez Del Castillo e Angarita Zerda (1990), a micropropagação a partir de clones selecionados poderia levar a um aumento de produção, atendendo à demanda crescente da fruta de amora-preta.

Vários trabalhos têm sido realizados com micropropagação de amoreira-preta, sendo o estabelecimento feito por meio de segmentos nodais ou meristemas (VILLA et al., 2006; 2010; AUGUSTO, 2001; OLIVEIRA et al., 2008). No entanto, embora a micropropagação de amoreira-preta seja há bastante tempo conhecida e utilizada, não há uma publicação explicando o protocolo passo a passo, o que tem levado à realização de trabalhos onde são testadas várias formulações de meios de cultura, tanto em relação à variação de concentrações de soluções utilizadas quanto a concentrações de fitorreguladores (VILLA et al., 2006; 2010; PIO et al., 2004).

O Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado tem micropropagado a amoreira-preta desde 1988, via cultura de meristemas, tendo estabelecido o protocolo abaixo descrito:

Protocolo

Origem do material vegetal:

Para produção de mudas de amoreira-preta, as fontes de explantes podem ser plantas matrizes mantidas a campo, em casa de vegetação ou já cultivadas in vitro. Na Embrapa Clima Temperado não têm sido utilizadas plantas em casa de vegetação para obtenção dos explantes.

Plantas a campo:

Em plantas matrizes mantidas a campo (Figura 1A), são retiradas brotações novas como fonte de explantes (Figura 1B), porções terminais são coletadas com cerca de 5 cm a 10 cm de comprimento, as folhas são retiradas (Figura 1C), e as brotações, acondicionadas em recipiente com água destilada e devidamente identificado (Figura 1D).

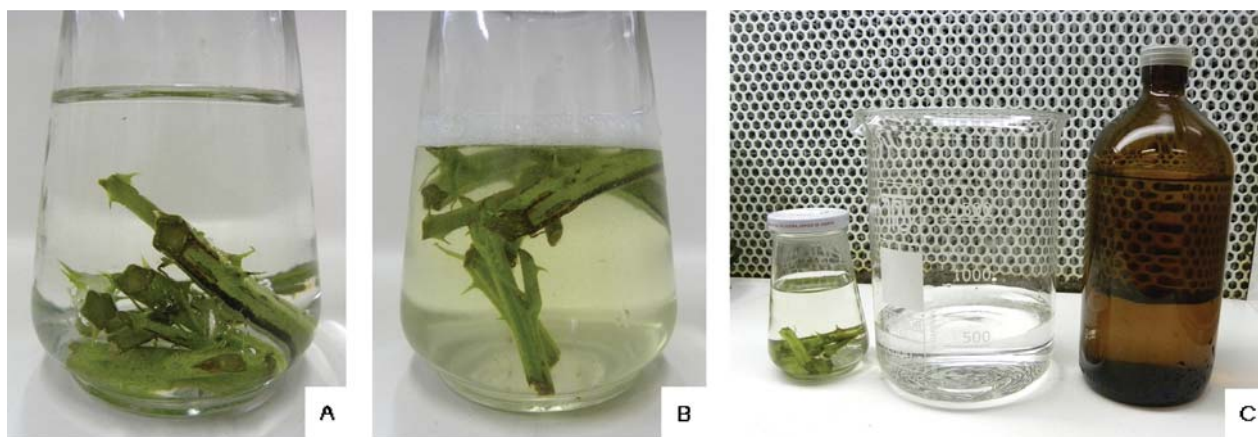


Fotos: Kerlley Cristina de Assis Mayer.

Figura 1: Plantas matrizes de amoreira-preta a campo (A); brotações utilizadas como fonte de explantes (B); brotações sem folhas (C); explantes em água destilada (D).

Após a coleta, os explantes passam pelo processo de assepsia em

laboratório. Inicialmente, permanecem imersos em recipiente contendo álcool 70% por 10 segundos (Figura 2A), e posteriormente por 10 minutos em solução de hipoclorito de sódio 1% adicionando-se três gotas de detergente comercial, em constante agitação, para auxiliar a diminuição da tensão superficial (Figura 2B). Finalmente, os explantes são lavados em câmara de fluxo laminar, por três vezes, com água destilada e autoclavada (Figura 2C).



Fotos: Kerlley Cristina de Assis Mayer.

Figura 2: Processo de assepsia. Explantes em álcool 70% (A); explantes em hipoclorito de sódio 1% (B); tríplex lavagem em câmara de fluxo laminar (C).

A micropropagação de amoreira-preta no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado é iniciada utilizando-se o ápice caulinar (meristema) como explante inicial. A extração do ápice caulinar com 0,2 mm a 0,3 mm é realizada com auxílio de pinça, bisturi e utilizando-se lupa estereoscópica (Figura 3). Estes são imediatamente inoculados em meio de cultura composto pelos sais e vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 1 mg L⁻¹ de BAP (6-Benzilaminopurina), 0,01 mg L⁻¹ de ANA (Ácido Naftaleno Acético), 0,1 mg L⁻¹ de GA3 (Ácido Giberélico), 30 g L⁻¹ de sacarose e 7,5 g L⁻¹ de ágar, o pH do meio de cultura é ajustado em 5,9 antes da autoclavagem. A composição do meio MS está apresentada na Tabela 1.

Depois de inoculados, os ápices são transferidos para sala de crescimento com temperatura 25 ± 3°C e permanecem no escuro por 2 a 3 dias, para diminuir

o processo oxidativo. Posteriormente, são submetidos à luminosidade ($45\text{--}55\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) e fotoperíodo de 16 horas. O desenvolvimento dos ápices caulinares até o primeiro subcultivo ocorre no período de 50 a 60 dias.

Tabela 1. Composição do meio de cultura MS.

NOME COMPOSTO	FÓRMULA	CONCENTRAÇÃO FINAL (g L ⁻¹)
Nitrato de amônio	NH ₄ NO ₃	1,65
Nitrato de potássio	KNO ₃	1,90
Sulfato de magnésio	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,37
Sulfato de manganês	MnSO ₄ ·H ₂ O	0,0169
Sulfato de zinco	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,0086
Sulfato de cobre	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,00025
Cloreto de cálcio	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,441
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	0,0062
Fosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	0,17
Iodeto de potássio	KI	0,00083
Molibdato de sódio	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,025
Cloreto de cobalto	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,000025
Sódio EDTA	Na ₂ .EDTA	0,03725
Sulfato de ferro	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,02785
Cloridrato de tiamina	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS	0,0005
Cloridrato de piridoxina	C ₈ H ₁₁ NO ₃ HCl	0,0005
Ácido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	0,0005
Glicina	C ₂ H ₅ O ₂ N	0,002
Mio-inositol	C ₆ H ₆ (OH) ₆	0,1
Sacarose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	30
Ágar		7,5

Fonte: Murashige & Skoog (1962).



Foto: Natália Dias Gomes da Silva.

Figura 3: Excisão de ápices caulinares de amoreira-preta.

Plantas estabelecidas in vitro:

As plantas que já se encontram in vitro são multiplicadas (Figura 4) em meio de cultura composto pelos sais e vitaminas do meio MS, suplementado com 1 mg L^{-1} BAP, 30 g L^{-1} de sacarose e $7,5 \text{ g L}^{-1}$ de ágar. O pH do meio de cultura é ajustado em 5,9, antes da autoclavagem. A multiplicação é realizada até a obtenção da quantidade de plantas desejada e o tempo médio entre as repicagens de gemas apicais e axilares é de aproximadamente 20 dias, sendo que posteriormente passarão para a fase de enraizamento. A taxa de

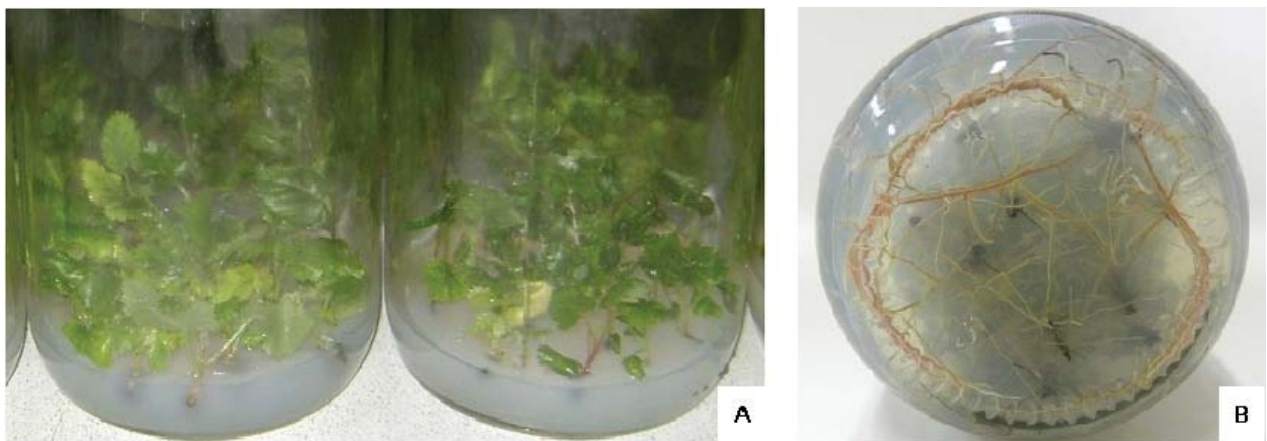
multiplicação normalmente obtida em plântulas de amoreira-preta em cada subcultivo é de 5 a 7 em média, dependendo da cultivar.



Fotos: Kerlley Cristina de Assis Mayer.

Figura 4: Multiplicação in vitro de amoreira-preta.

Na fase de enraizamento, os explantes são transferidos para meio MS com metade da concentração dos sais e vitaminas, suplementado com $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA, 30 g L^{-1} de sacarose e $7,5 \text{ g L}^{-1}$ de ágar. Durante esta fase, os explantes são novamente expostos a condições de escuro (Figura 5A), onde permanecem por quatro dias. Concluído este período as plântulas retornam para intensidade luminosa $45\text{-}55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas, por mais 20 dias (Figura 5B).



Fotos: Natália Dias Gomes da Silva.

Figura 5: Explantes de amoreira-preta, inoculados em meio para o enraizamento (A). Plantas de amoreira-preta enraizadas in vitro (B).

Com esta etapa do processo de micropropagação concluída, os explantes são cuidadosamente lavados em água corrente para a total remoção do meio de cultura (Figura 6), estando prontos para passarem pela etapa de aclimatização.



Foto: Kerlley Cristina de Assis Mayer.

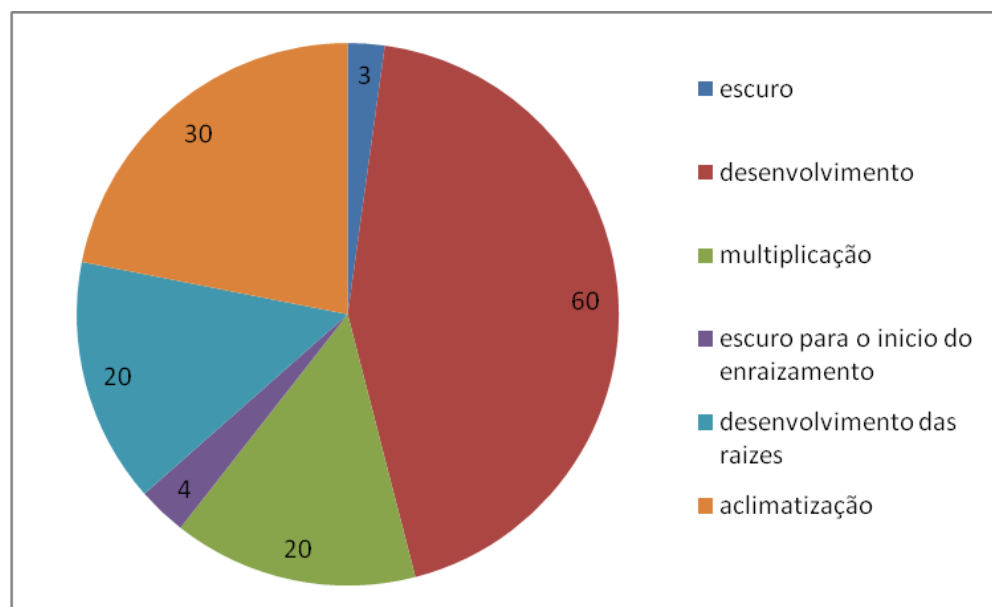
Figura 6: Remoção do meio de cultura em água corrente.

As plantas são transplantadas para bandejas de isopropileno com 72 células (Figura 7), tubetes ou sacos plásticos e mantidos em casa de vegetação. O tempo médio para aclimatização é de 30 dias, com percentual de sobrevivência superior a 95%. Decorrido o período de aproximadamente 140 dias, as mudas estão aptas para o plantio (Figura 8).



Foto: Kerlley Cristina de Assis Mayer.

Figura 7: Plantas transplantadas para bandejas em casa de vegetação.



Elaboração: Natália Dias Gomes da Silva

Figura 8: Tempo, em dias, necessário para o processo de produção de mudas de amoreira-preta.

Referências

ATTILIO, L. B., BOLIANI, A. C.; TARSITANO, M. A. A. Custo de produção de amora-preta em região tropical. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 4, p. 1042-1047, 2009.

ANTUNES, L. E. C. Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 151-158, 2002.

ANTUNES, L. E. C. **Aspectos fenológicos, propagação e conservação pós-colheita de frutas de amoreira-preta (*Rubus* spp.) no sul de Minas Gerais**. 1999. 129f. Tese (Doutorado em Agronomia, Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

AUGUSTO, C. S. S. **Micropropagação da amoreira-preta cv. Brazos**. 2001. 115f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. **Certification schemes**: pathogen-tested material of *Rubus*. Paris, 2004. 9p.

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 de; NINO, A. F. P.; FERREIRA, L. V. Potencial de multiplicação in vitro de cultivares de amoreira-preta. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 585-589, 2008.

PAGOT, E.; HOFFMANN, A. Produção de pequenas frutas no Brasil. . In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS, 1., 2003, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. p. 31 - 32. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 37)

PIO, L. A. S.; VILLA, F.; DUTRA, L. F.; TEODORO, G. S.; PASQUAL, M. Micropropagação de Amoreira-preta 'Cherokee' I. Efeito de Cinetina e GA3. In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 2.; ENCONTRO DE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 1., 2004, Pelotas. **Resumos...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. p. 237-240. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 123).

RAMIREZ DEL CASTILLO, A.; ANGARITA ZERDA, A. Estudios preliminares para la propagación clonal in vitro de mora (*Rubus glaucus* L.). **Agronomía Colombiana**, Bogotá, v. 7, n. 1-2, p. 17-25, 1990.

SANTOS, A. M.; RASEIRA, M. C. B.; MADAIL, J. C. M. **Amora-preta**. 2. ed. Brasília: Embrapa-SPI, 1997. 61 p. (Embrapa-SPI. Coleção Plantar, 33).

STRIK, B. C. et al. Worldwide blackberry production. **Hortechology, Alexandria**, v. 17, n. 2, p. 205-213, 2007.

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

VILLA, F.; PASQUAL, M.; SOUZA L. G.; VILELA X. M. S. Meios de cultura e reguladores de crescimento na multiplicação in vitro de amoreira-preta. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 11, n. 2, p. 109-117, 2010.

