

ISSN 1516-8840

Novembro, 2012

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Clima Temperado
Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documento 341

Protocolos de Micropropagação de Plantas III - Framboeseira.

Leonardo Ferreira Dutra
Natália Dias Gomes da Silva
Lorena Pastorini Donini
Antonio Fernando Pacheco Nino
Francisco Osmi Xavier da Silva
Francisco Carlos Budjjarck Vieira

Embrapa Clima Temperado
Pelotas, RS
2012

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 Suita de Castro, Flávio Luiz Carpena Carvalho, Regina das Graças Vasconcelos dos Santos.
Suplentes: Isabel Helena Verneti Azambuja e Beatriz Marti Emygdio.

Supervisão editorial: Antônio Luiz Oliveira Heberlê
Revisão de texto: Ana Luiza Barragana Viegas
Normalização bibliográfica: Fábio Lima Cordeiro
Editoração eletrônica e arte da capa: Fernando Jackson

1ª edição

1ª impressão (2012): 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 plantas III: framboeseira / Leonardo Ferreira Dutra...[et al.]. -- Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2012. 21-p. -- (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 341).

ISSN 1516-8840

Framboesa – Mudas – Produção – Micropropagação – Cultura in vitro. I. Dutra, Leonardo Ferreira. II. Série.

CDD 634.711

Autores

Leonardo Ferreira Dutra

Eng. Agrônomo, D.Sc. em Agronomia,
pesquisador da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS,
leonardo.dutra@embrapa.br

Natália Dias Gomes da Silva

Bióloga, mestranda em Fisiologia Vegetal
Embrapa Clima Temperado/UFPel, Pelotas, RS,
nataliadiasgomes@hotmail.com

Lorena Pastorini Donini

Bióloga, D.Sc. em Agronomia,
bolsista DTI-1/CNPq
Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS,
lorenadonini@yahoo.com.br

Antonio Fernando Pacheco Nino

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

Apresentação

A framboeseira pertence à família das rosáceas, sendo originada de parte da Europa e da Ásia.

Embora seja uma cultura sensível às condições climáticas, com limitações de cultivo em algumas regiões, visto que necessita de elevada soma de horas de frio, algumas cultivares têm demonstrado resultados promissores.

Introduzida em Campos do Jordão/SP, na Serra da Mantiqueira, atualmente tem sido produzida no Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais em maior escala. A área cultivada atual é de 300 ha com produção aproximada de 200 toneladas.

A framboeseira é normalmente propagada vegetativamente por rebentos e estacas herbáceas ou radiculares. No entanto, somente a produção de material básico, ou mudas via cultura de tecidos, garante sua sanidade.

Embora o protocolo de micropropagação tenha sido definido desde a década de 1980 pela Embrapa Clima Temperado, não há uma descrição detalhada de como o processo é realizado. Desta forma, a Embrapa Clima Temperado disponibiliza o presente documento contendo, resumidamente, a descrição do protocolo de micropropagação de framboeseira.

Clênio Nailto Pillon
Chefe Geral
Embrapa Clima Temperado

Sumário

Protocolos de Micropropagação de Plantas III: Framboeseira.....	
1. Introdução.....	
2. Protocolo.....	
● Origem do material vegetal.....	
● Plantas mantidas no campo ou em casa de vegetação.....	
● Plantas estabelecidas in vitro.....	
Referências	

Protocolos de Micropropagação de Plantas III - Framboeseira

*Leonardo Ferreira Dutra
Natália Dias Gomes da Silva
Lorena Pastorini Donini
Antonio Fernando Pacheco Nino
Francisco Osmi Xavier da Silva
Francisco Carlos Budjjarck Vieira*

A framboeseira (*Rubus ideaus L.*) é uma das espécies pertencentes ao grupo das pequenas frutas, originária do centro e do norte da Europa e de parte da Ásia (RASEIRA et al., 2004). É considerada uma espécie com potencial para alternativa de renda principalmente para as pequenas propriedades familiares das regiões de clima temperado (OLIVEIRA et al., 2006).

A produção mundial de framboesa é de cerca de 320 mil toneladas, sendo que na América do Sul, o Chile destaca-se como o maior produtor, com cerca de 30 mil toneladas/ano (ASSOCIAÇÃO, 2012).

No Brasil, a cultura da framboeseira foi introduzida na região do Alto Mantiqueira, mais especificamente em Campos do Jordão, SP, não sendo precisa a data. Atualmente, os principais produtores no Brasil são Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais. De acordo com dados recentes (IBGE, 2010), a área cultivada está em torno de 300 ha e a produção anual em torno de 200 toneladas, sendo as cultivares Heritage e Batum as mais plantadas.

A framboeseira é considerada uma cultura com limitações técnicas

de cultivo, devido à sensibilidade da planta e do seu fruto ao clima, e isso se deve à elevada pluviosidade e umidade relativa do ar, especialmente no Sul do Brasil. Além disso, a framboeseira necessita de elevada soma de horas de frio, normalmente acima de 600h, o que limita as regiões para o cultivo. Para uma boa produção, a framboeseira requer verão relativamente fresco e inverno moderado, embora seja exigente em frio hibernal, necessitando de pelo menos 250 horas de temperaturas inferiores a 7 °C durante o período de inverno e precipitação anual entre 700 e 900 mm. Em seu habitat natural é encontrada entre 1.300 e 1.400 m de altitude, porém se adapta a altitudes de 500 a 600 m (RASEIRA et al., 2004).

Dentre as variedades de framboeseira atualmente cultivadas no Brasil destacam-se as cultivares Heritage e Autumn Bliss, ambas originárias dos Estados Unidos, destacando-se a primeira, com a maior área comercial. Também, registra-se o cultivo da variedade Autumn Batum, porém mais cultivada no sul de Minas Gerais.

Os frutos de framboesa apresentam de 10 a 20 mm de diâmetro, sendo muito utilizados no preparo de geleias, sucos, sorvetes, e para o seu consumo in natura. Seu sabor varia de doce a ligeiramente ácido e seu aroma é bastante peculiar. Botanicamente, os frutos são do tipo agregado, formados por várias drupas convexas, deprimidas e rugosas, que se destacam facilmente (INFOAGRO, 2011).

A propagação da framboeseira é normalmente feita por rebentos, estacas herbáceas ou radiculares (ALÁRCON, 2004). Entretanto,

de acordo com Oliveira et al. (2010), em comparação com as outras técnicas, a cultura in vitro de tecidos é a mais segura para produção de mudas isentas de patógenos.

Quanto ao manejo da cultura, deve-se dar atenção especial à poda e ao desbaste de hastes. Desta forma, as hastes que já frutificaram devem ser eliminadas anualmente; o desponte (poda verde) das hastes do ano com mais de 1,10 m de altura também deve ser realizado; e, para garantir frutos de maior tamanho, devem ser selecionadas de cinco a seis hastes por planta por ano. Além disso, recomenda-se renovar o pomar, em média, a cada quatro anos, para evitar que a concorrência entre hastes prejudique a produtividade e a qualidade dos frutos (RASEIRA et al., 2004; INFOAGRO, 2011).

Várias doenças têm causado prejuízos aos pomares de framboeseira. Além dos danos causados por fungos e por bactérias, as viroses têm provocado problemas sérios (HUMMER, 1996). Mais de 30 doenças virais e assemelhadas são relatadas infectando a cultura da framboeseira. Os principais danos econômicos causados pelas viroses na cultura relacionam-se à redução da produção e da qualidade dos frutos (aborto de drupas, redução de firmeza, tamanho e peso), redução da longevidade das plantas e, conseqüentemente, da rentabilidade do investimento (NICKEL, 2003).

Desta forma, a técnica da cultura de tecidos, através da cultura de meristemas, é uma alternativa para a produção de mudas de alta qualidade genética e sanitária. Esta técnica consiste na excisão de

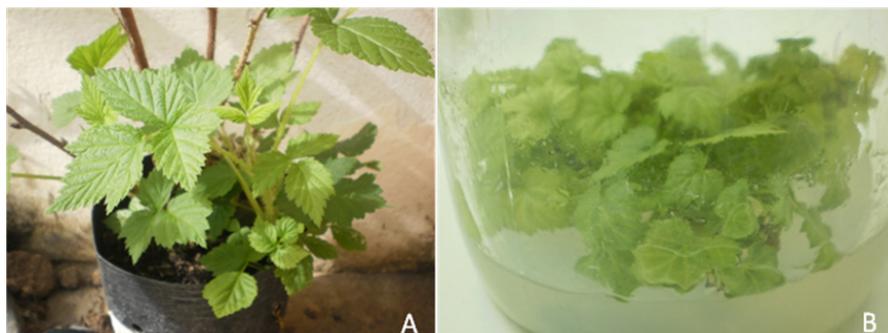
ápices meristemáticos, estrutura que possui pequenas dimensões (0,1-0,3 mm), e está anatomicamente localizada em regiões pouco vascularizadas, possibilitando assim o isolamento de vírus.

No processo normal de isolamento, a etapa de diferenciação dos meristemas varia de 45 a 60 dias, dependendo da cultivar. Após este período, o material diferenciado é transferido para meio de multiplicação, enraizamento e aclimatização. Estes processos são descritos a seguir.

Protocolo

Origem do material vegetal:

Para produção de mudas de framboeseira isentas de viroses, as fontes de explantes podem ser: plantas mantidas no campo ou em casa de vegetação (Figura 1A) ou já mantidas in vitro (Figura 1B).



Fotos: Natália Dias Gomes da Silva.

Figura 1: Plantas de framboeseira cultivadas em casa de vegetação (A) e in vitro (B).

- Plantas mantidas no campo ou em casa de vegetação:

Porções terminais de brotações de framboeseira são coletadas com aproximadamente 5 cm de comprimento (Figura 2A), as folhas são retiradas (Figura 2B), e as brotações acondicionadas em recipiente com água destilada (Figura 2C).



Fotos: Natália Dias Gomes da Silva.

Figura 2: Coleta dos explantes, oriundos da casa de vegetação, para posterior inoculação in vitro. Porção terminal da brotação (A), retirada das folhas e segmentação (B), e imersão em água destilada (C).

Posteriormente, os explantes são levados ao laboratório onde passam pelo processo de assepsia. Inicialmente, permanecem imersos em recipiente contendo álcool 70% por 10 segundos, posteriormente 10 minutos em solução de hipoclorito de sódio 1% adicionado de três gotas de detergente comercial, sob constante agitação. Finalmente, os explantes são lavados em câmara de fluxo laminar, por três vezes em água destilada e autoclavada.

O explante utilizado na micropropagação de framboeseira visando à recuperação de plantas livres de vírus é o ápice caulinar, o qual é cultivado em meio de cultura MS (MURASHIGE e 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 GA3 (ácido giberélico); 0,8 g L⁻¹ de carvão ativado; 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 descrita na Tabela 1.

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 ₇ 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).

O ápice caulinar é extraído com 0,1 a 0,3 mm, com auxílio de pinça e bisturi, utilizando-se lupa estereoscópica (Figura 3). As condições adequadas de incubação envolvem intensidade luminosa de 45-55 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 25 ± 3 °C e fotoperíodo de 16 horas. O tempo de desenvolvimento dos ápices caulinares até a primeira multiplicação é de aproximadamente 60 dias.



Foto: Natália Dias Gomes da Silva.

Figura 3: Ápice meristemático utilizado visando a produção de plantas isentas de viroses.

- Plantas estabelecidas in vitro:

As plantas que já estão in vitro são multiplicadas em meio de cultura composto pelos sais e vitaminas do meio MS, acrescidas de 1 mg L⁻¹ BAP, 50% de Ferro (p/v), 30 g L⁻¹ de sacarose e 7,5 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio de cultura é ajustado em 6,2 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 (Figura 4) é de aproximadamente 20 dias, onde posteriormente passarão para a fase de enraizamento. A taxa média de multiplicação normalmente obtida em plântulas de framboeseira por subcultivo é de cinco a sete explantes, dependendo da cultivar.



Fotos: Natália Dias Gomes da Silva.

Figura 4: Etapas da repicagem dos explantes de framboeseira. Explantes desenvolvidos (A); tufo de brotações formados a partir de apenas um segmento (B); segmentação das brotações de framboeseira cultivadas in vitro.

Durante a fase de enraizamento, os explantes são novamente transferidos de meio de cultura, passando para o 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 5), onde permanecem por quatro dias. Concluído este período, retornam para intensidade luminosa $45\text{-}55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas, por mais 30 dias. É recomendável realizar no máximo cinco repicagens, durante a fase de multiplicação, por meristema, para evitar a ocorrência de variação somaclonal, levando à obtenção de plantas distintas das originais.



Foto: Natália Dias Gomes da Silva.

Figura 5: Explantes de framboeseira submetidos ao escuro durante o enraizamento.

Com esta etapa do processo de micropropagação concluída, os explantes são cuidadosamente lavados em água corrente para a total remoção do meio de cultura, visando o processo de aclimatização.

Em casa de vegetação, as plantas são transplantadas para bandejas de isopropileno com 72 células (Figura 6) preenchidas com composto de terra (55%), esterco (30%) e vermiculita (15%). O tempo médio para aclimatização é de 30 dias, e o índice de sobrevivência das mudas é de aproximadamente 85% a 90%. Decorrido este período o material já pode ser encaminhado para o produtor para plantio a campo.



Foto: Natália Dias Gomes da Silva.

Figura 6: Aclimatização de mudas de framboeseira, oriundas da cultura de tecidos.

Referências:

ALARCÓN, J. S. M. Propagación de arándano y frambueso rojo. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS, 2., 2004, Vacaria. **Anais ...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. p. 31-38. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 44).

ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES DE PEQUENAS FRUTAS DE VACARIA. Framboesa (*Rubus Ideaus*). Disponível em: <<http://www.appefrutas.com.br/framboesa.php>>. Acesso em 21 mar. 2012.

HUMMER, K. E. Rubus diversity. **HortScience**, Alexandria, v. 31, n. 2, p.1182-1184, 1996.

IBGE. Framboesa. **Sidra**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 19 ago. 2010.

INFOAGRO. **El cultivo del frambueso**. Disponível em: <http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tradicionales/frambueso.htm>. Acesso em: 11 out. 2011.

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.

NICKEL, O. Doenças causadas por vírus em morangos, amoras-preta, framboesas e mirtilo. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS, 1., 2003, Vacaria. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. p. 41-47. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 37).

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

OLIVEIRA, R. P.; ROCHA, P. S. G.; GULARTE, V. F.; SCIVITTARO, W. B. Micropropagação de framboeseira em diferentes concentrações de ferro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 12, p. 2598-2602, 2010.

PAGOT, E. Diagnóstico da produção e comercialização de pequenas frutas. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS, 2., Vacaria. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. p. 09-18. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 44).

RASEIRA, M. C. B.; GONÇALVES, E. D. G.; TREVISAN, R.; ANTUNES, L. E. C. **Aspectos técnicos da cultura da framboeseira**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. 22 p. (Embrapa Clima Temperado. **Documentos**, 120).