

## Glicina e inositol no cultivo *in vitro* de duas frutíferas de clima temperado.

Almendagna, Filipe<sup>1</sup>; Villa, Fabíola<sup>2</sup>; Pasqual, Moacir<sup>3</sup>; Pio, Leila Aparecida Salles<sup>2</sup>; Assis, Franscinely Aparecida<sup>1</sup>;

<sup>1</sup>Graduando em Agronomia, UFLA, Lavras, MG, e-mail: filipealmendagna@yahoo.com.br;

<sup>2</sup>Doutoranda em Fitotecnia (DAG), UFLA, Lavras, MG, e-mail: fvilla2003@libero.it; <sup>3</sup>Professor Titular do Departamento de Agricultura (DAG), UFLA, Lavras, MG, e-mail: mpasqual@ufla.br.

### INTRODUÇÃO

A fruticultura de clima temperado apresenta grande importância no contexto da produção mundial de frutas. Algumas das frutas produzidas em maior volume em todo o mundo, tais como a macieira e a videira, são de espécies pertencentes a esta classe (Chalfun et al., 1998).

No Brasil, a amoreira-preta vem sendo cultivada por pequenos produtores, objetivando a exportação dos frutos. O Rio Grande do Sul é o principal produtor brasileiro, onde a cultivar Tupy responde por 70% da área cultivada. O Sul de Minas Gerais tem apresentado elevado potencial para esta pequena fruta, destacando-se o município de Caldas. A propagação da amoreira-preta faz-se através de estacas de raízes, brotos (rebentos) e estacas herbáceas (Antunes & Raseira, 2004).

A videira é uma espécie frutífera propagada por via vegetativa. Além destes, o cultivo *in vitro* pode ser utilizado como um processo alternativo, visando, por meio de suas técnicas, a obtenção de um grande número de mudas, geneticamente uniformes, livres de vírus e em curto espaço de tempo (Peixoto & Pasqual, 1996).

Um dos objetivos da micropropagação é a maximização da multiplicação de gemas. Muita atenção para sua obtenção tem sido dada à manipulação de substâncias de crescimento no meio de cultura (Lee e Ko, 1984). Vários meios de cultura têm sido testados e um meio específico é identificado pela composição de sais minerais, enquanto as vitaminas, os reguladores vegetais e outros suplementos orgânicos variam em concentração. A suplementação de um meio de cultura pode ser realizada pela inclusão de uma proteína hidrolisada. Qualquer efeito benéfico pode ser avaliado pela substituição desta proteína por uma mistura de aminoácidos. Os aminoácidos têm importância na amplificação das respostas morfogênicas, proporcionando maior crescimento e facilitando a diferenciação no sentido da regeneração (Pasqual, 2001).

O crescimento e a morfogenia de propágulos micropropagados podem ser melhorados com a adição de vitaminas ao meio de cultura. As exigências das células vegetais em vitaminas estão associadas ao tipo de cultura e à espécie (George, 1993). Gonzáles et al. (2000) observaram melhor estabelecimento *in vitro* de mirtilo cv. Berkeley a partir de segmentos nodais, utilizando meio WPM acrescido de vitaminas do MS. Em 4 genótipos de videira estudados verificou-se melhores resultados em meio modificado, com a diminuição de sais e vitaminas do meio de cultivo MS (Zlenko et al., 1995).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de diferentes concentrações de glicina e inositol, no cultivo *in vitro* de amoreira-preta cv. Tupy e do porta-enxerto de videira 'Kober 5BB'.

### MATERIAL E MÉTODOS

Segmentos nodais de amoreira-preta (*Rubus* sp.), cv. Tupy e do porta-enxerto de videira 'Kober 5BB' (*Vitis* spp.), com 2 cm de comprimento, oriundos de propágulos preestabelecidos *in vitro* foram excisados e introduzidos em tubo de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) e DSD1 (Silva & Doazan, 1995), respectivamente. O primeiro meio de cultura foi acrescido de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de benzilaminopurina (BAP), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar, e o pH foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 121°C e 1 atm por 20 minutos. O segundo meio de cultura foi

acrescido de 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar, e o pH foi ajustado para 6,4, antes da autoclavagem. Posteriormente, os tubos de ensaio contendo os explantes foram transferidos para sala de crescimento, onde as condições de cultivo foram mantidas a 25 ± 2°C, irradiância de 32 μ.mol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas.

O experimento com amoreira-preta (cv. Tupy) consistiu de 5 diferentes concentrações de glicina (0; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg L<sup>-1</sup>) e 5 de inositol (0, 50, 100, 200 e 400 mg L<sup>-1</sup>), em todas as combinações possíveis. O experimento com porta-enxerto de videira ('Kober 5BB') consistiu de 4 diferentes concentrações de glicina (0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>) e 4 de inositol (0, 10, 20 e 40 mg L<sup>-1</sup>), retiradas do meio MS, em todas as combinações possíveis.

Ao final de 70 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliados número de folhas, peso da matéria fresca da parte aérea, comprimento da parte aérea, número de raízes e peso fresco de calos para as duas frutíferas estudadas e somente número de brotos para a amoreira-preta e comprimento da maior raiz para o porta-enxerto de videira. Os dados foram analisados através do software Sisvar (Ferreira, 2000), utilizando regressão polinomial para concentrações de glicina e inositol. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro repetições constituídas de três explantes.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

As concentrações de inositol e glicina incorporadas ao meio de cultura MS influenciaram no número de folhas de amoreira-preta. Com o aumento nas concentrações de inositol, verificou-se um aumento no número de folhas, sendo que maior número foi observado com 400 mg L<sup>-1</sup> deste e na ausência de glicina. Foi observada interação significativa para glicina e inositol separadamente em relação ao número de folhas do porta-enxerto de videira. Esses resultados divergem daqueles verificados para número de folhas de amoreira-preta. Para o porta-enxerto de videira, pode-se observar que a quantidade de folhas aumenta gradativamente até o ponto de máxima (11,69) para 1,0 mg L<sup>-1</sup> de glicina e diminui até o ponto de máxima (12,54) para 10 mg L<sup>-1</sup> de inositol.

Observa-se que o aumento gradativo nas concentrações de inositol (retiradas do meio de cultivo MS) reduziu a emissão de novas folhas, corroborando assim com Silva (2003), que estudando o crescimento *in vitro* de um híbrido de orquídea, verificou uma redução no número de folhas emitidas em meio Knudson, com o aumento das concentrações de vitaminas do meio MS.

O inositol influenciou como catalisador metabólico no crescimento de órgãos, confirmando sua função de estimular o crescimento geral do propágulo (George, 1993). Pode-se inferir que o inositol retirado do meio MS adicionado ao meio de cultura DSD1 não é necessário para promover número de folhas do porta-enxerto de videira. Gonzáles et al. (2000) observaram melhor estabelecimento *in vitro* de mirtilo cv. Berkeley a partir de segmentos nodais, utilizando meio WPM acrescido de vitaminas do MS. Em 4 genótipos de videira estudados verificou-se melhores resultados em meio modificado, com a diminuição de sais e vitaminas do meio de cultivo MS (Zlenko et al., 1995).

Observa-se interação significativa para número de brotos de amoreira-preta, em 2,0 e 8,0 mg L<sup>-1</sup> de glicina, onde maior número foi verificado com 200 mg L<sup>-1</sup> de inositol associado a 2,0 mg L<sup>-1</sup> de glicina. Concentrações superiores a 200 mg L<sup>-1</sup> de inositol promoveram o crescimento do explante, função principal das vitaminas (George, 1993). Pode-se verificar a interação significativa para o peso da matéria fresca da parte aérea das duas frutíferas estudadas. Maior peso da matéria fresca da parte aérea de amoreira-preta e porta-enxerto de videira foi verificado com 400 e 20 mg L<sup>-1</sup> de inositol, respectivamente, com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de glicina e na sua ausência. Evidencia-se assim que, para promover peso da matéria fresca dessas duas frutíferas estudadas, a glicina do meio MS é inibitória e o inositol é benéfico.

Para a amoreira-preta foi observada influência negativa do inositol até 200 mg L<sup>-1</sup> combinado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de glicina. Com o aumento nas concentrações de inositol associado a 8,0 mg L<sup>-1</sup> de glicina, verificou-se um aumento de forma quadrática em seu

comprimento. As concentrações de 10 a 40 mg L<sup>-1</sup> de inositol e 2 mg L<sup>-1</sup> de glicina adicionadas no meio DSD1 influenciaram positivamente de forma linear o comprimento do porta-enxerto de videira. O crescimento geral dos propágulos é estimulado pelas vitaminas do meio de cultivo MS, influenciando assim como catalisadores metabólicos (George, 1993).

Pode-se observar uma interação significativa para número de raízes da amoreira-preta na ausência e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de glicina adicionada ao meio de cultivo. Maior número de raízes da cv. 'Tupy' foi verificado com 400 mg L<sup>-1</sup> de inositol associado a 1,0 mg L<sup>-1</sup> de glicina, porém resultados semelhantes foram observados na ausência e com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de glicina para essa cultivar. De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se inferir que não é necessário a utilização da glicina para obtenção de raízes nos propágulos. O número de raízes do porta-enxerto de videira 'Kober 5BB' não foi significativo para as concentrações de inositol e glicina utilizadas.

Num substrato com deficiência de nutrientes, como é o caso do meio de cultura DSD1, aumentar o comprimento das raízes é uma maneira do propágulo buscar os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento, mesmo que isto implique em gasto de reservas. As concentrações de inositol do meio MS influenciaram de maneira positiva o crescimento dessas raízes, até o ponto de máxima (3,83 cm de comprimento e 23,6 mg L<sup>-1</sup> de inositol), evidenciando-se que, para promover o crescimento médio do sistema radicular de 'Kober 5BB', o inositol adicionado ao meio de cultivo DSD1 é benéfico.

Pode-se observar interação significativa para peso fresco de calos das frutíferas estudadas, sendo que, maior peso fresco de calos de amoreira-preta foi verificado com 400 mg L<sup>-1</sup> de inositol associado a 2,0 mg L<sup>-1</sup> de glicina. Já para o porta-enxerto de videira, verificou-se que o inositol incrementou linearmente o peso da matéria fresca calos com aumento de suas concentrações, na presença de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de glicina.

A formação de calos não é desejada nesse estudo, pois pode favorecer o surgimento de variação no genótipo. Provavelmente a glicina e o inositol do meio MS não sejam adequados para a micropropagação do porta-enxerto de videira 'Kober 5BB', pois proporcionou calos mesmo na ausência de ambos. O mesmo foi observado para a amoreira-preta, onde na ausência de inositol ocorreu a formação de calos na base dos propágulos. Kintzios et al. (2000, 2001) observaram em um estudo com folhas de rosa (*Rosa hybrida*) e de *Capsicum annuum* que, na presença de 100 mg L<sup>-1</sup> de inositol um maior crescimento de calos foi obtido. Esses verificaram também que a glicina a 0,1 mg L<sup>-1</sup> foi a menos favorável para o mesmo crescimento e proliferação de embriões somáticos de *Capsicum annuum*.

## CONCLUSÕES

Melhores resultados para micropropagação da amoreira-preta cv. Tupy são obtidos com concentração de glicina até a recomendada no meio de cultura MS (2,0 mg L<sup>-1</sup>) e 4x (400 mg L<sup>-1</sup>) o valor de inositol. Para o porta-enxerto de videira, melhores resultados são obtidos na ausência e/ou com baixas concentrações de glicina e concentração de inositol igual ou superior à recomendada no meio de cultura DSD1 ( $\geq 10$  mg L<sup>-1</sup>).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, L.E.C; RASEIRA, M.C.B. **Aspectos Técnicos da Cultura da Amora-Preta**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. p.13. Embrapa Clima Temperado. Documentos, 122).

CHALFUN, N. N. J; PASQUAL, M.; HOFFMANN, A. **Fruticultura comercial: frutíferas de clima temperado**. Lavras: UFLA-FAEPE, 1998, v.7, 304p.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar. 2000. p.255-258.

- GEORGE, E.F. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture. Part 1** – The Technology. 2.ed. Edington: Exegetics, 1993. 574p.
- GONZALES, M.V.; LOPEZ, M.; VALDES, A.E.; ORDAS, R.J. Micropropagation of three berry fruit species using nodal segments from field-grown plants. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v.137, p.73-78, 2000.
- KINTZIOS, S.; DROSSOPOULOS, J.B.; LYMPEROPOULOS, C. Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from young mature leaves of rose (*Rosa hybrida*). **Journal Plant of Nutrition**, v.23, n.10, p. 1407-1420, 2000.
- KINTZIOS, S.; DROSSOPOULOS, J.B.; LYMPEROPOULOS, C. Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from leaves of chilli pepper. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.27, p.55-62, 2001.
- LEE, H.J.; KO, K.C. Effects of culture media and plant hormones on shoot tip culture of Fuji apple cultivar (*Malus domestica*). **Seoul National University Journal of Agricultural Sciences**, Seoul, v.9, n.1, p.67-77, 1984.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações: meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 74p.
- PEIXOTO, P.H.P.; PASQUAL, M. Influência da origem dos explantes na multiplicação e no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de videira. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.20, n.3, p.293-300, 1996.
- SILVA, A.L.; DOAZAN, J. P. Une méthode d'irradiation aux rayons gamma appliquée à des porte-greffes de Vigne *in vitro*. **Journal Int. Science of Vigne et Vin**, v. 29, p. 1-9, 1995.
- SILVA, E.F. **Multiplicação e crescimento *in vitro* de orquídea *Brassicattleya Pastoral x Laeliocattleya Amber Glow***. 2003. 62p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- ZLENKO, V.A.; TROSHIN, L.P.; KOTIKOV, I.V. An optimized medium for clonal micropropagation of grapevine. **Vitis**, v.34, n.2, p.125-126, 1995.
- PALAVRAS-CHAVE: vitamina, aminoácido, MS, DSD1, amoreira-preta, videira.