



Adequação de protocolo para cultivo *in vitro* de amoreira-preta (*Rubus* sp.) ‘Xingu’

Marino Schiehl^a, Tatiane Otto de França^a, Luiz Antonio Biasi^{a*}

^a Universidade Federal do Paraná, Brasil

* Autor correspondente (biasi@ufpr.br)

INFO

Keywords

tissue culture
cytokinin
auxin

Palavras-chaves

cultura de tecidos
citocinina
auxina

ABSTRACT

Protocol suitability for in vitro culture of ‘Xingu’ blackberry (Rubus sp.)

In vitro production of blackberry seedlings makes it possible to obtain seedlings quickly and healthy. The objective of this research was to optimize a micropropagation protocol of the ‘Xingu’ blackberry, defining the most efficient BAP concentration for multiplication, the best gelling agent and to verify the need for IBA in *ex vitro* rooting and survival during acclimatization. BAP concentrations (0, 2.5, 5, 7.5 and 10 μM) were evaluated by 3 subcultures. The gelling agents evaluated were Gelrite[®] (2 g L⁻¹), Vetec[®] brand agar (7 g L⁻¹) and liquid medium. Rooting of shoots, treated with IBA concentrations (0; 2.5; 4.9 and 9.8mM), was performed *ex vitro* in mist chamber. There was an increase in the amount of shoots formed with increasing BAP concentration, up to 5.0 μM . Agar was the gelling agent that generated higher quality explants and less hyperhydricity. Rooting and survival rates of *ex vitro* explants were 100% in all evaluated treatments. The blackberry cv. Xingu can be micropropagated in MS culture medium plus 5 μM BAP and solidified with agar (7 g L⁻¹) and rooting can be performed *ex vitro* during acclimatization without the need for auxins.

RESUMO

A produção de mudas *in vitro* de amoreira-preta possibilita a obtenção rápida e sadia de mudas. O objetivo dessa pesquisa foi otimizar um protocolo de micropropagação da amoreira-preta ‘Xingu’, definindo a concentração mais eficiente de BAP para multiplicação, o melhor agente gelificante, a necessidade de AIB no enraizamento *ex vitro* e a sobrevivência durante a aclimatização. As concentrações de BAP (0; 2,5; 5; 7,5 e 10 μM) foram avaliadas por 3 subcultivos. Os agentes gelificantes avaliados foram Gelrite[®] (2 g L⁻¹), ágar da marca Vetec[®] (7 g L⁻¹) e meio líquido. O enraizamento das brotações tratadas com concentrações de AIB (0; 2,5; 4,9 e 9,8 mM) foi realizado *ex vitro* em câmara de nebulização. Houve um aumento na quantidade de brotações formadas com o aumento das concentrações de BAP, até a concentração de 5,0 μM . O ágar foi o agente gelificante que gerou explantes com maior qualidade e menos hiperhidricidade. A taxa de enraizamento e sobrevivência dos explantes *ex vitro* foi de 100 % em todos os tratamentos avaliados. A amoreira-preta cv. Xingu pode ser micropropagada em meio de cultura MS acrescido de 5 μM de BAP e solidificado com ágar (7 g L⁻¹) e o enraizamento pode ser realizado *ex vitro* durante a aclimatização, sem a necessidade de auxinas.

Received 14 October 2019; Received in revised from 23 May 2020; Accepted 18 June 2020

INTRODUÇÃO

O cultivo da amoreira-preta é uma ótima opção para a diversificação da fruticultura, sendo uma cultura que apresenta rápido retorno do investimento quando realizada a implantação, uma vez que sua produção já se inicia no segundo ano após o plantio e além do mais possui baixo custo de manutenção. A amora-preta pode ser destinada para o processamento de inúmeros produtos, na forma congelada ou de polpa e também comercializada *in natura*. A amoreira pode ser cultivada em locais com potencial para ecoturismo, aumentando a agregação de valor do produto (Antunes et al., 2014).

No Brasil, o Rio Grande do Sul é o maior produtor, devido suas condições climáticas favoráveis para a cultura e também pelo incentivo realizado pela Embrapa Clima Temperado em Pelotas-RS. Além deste estado, a amoreira também é cultivada em São Paulo, Minas Gerais e Paraná (Villa et al., 2006; Antunes et al., 2014). Apesar de ser uma espécie de clima temperado, as cultivares lançadas pela Embrapa possuem adaptação a climas mais amenos e podem ser cultivadas em regiões subtropicais (Croge et al., 2016), atingindo elevados níveis de produtividade, como a cultivar Tupy que produziu mais de 20 t ha⁻¹ na Lapa-PR (Croge et al., 2019a).

A amora-preta é um fruto nutritivo e possui propriedades nutracêuticas que auxiliam no combate aos radicais livres. Um importante composto químico encontrado na amora-preta é o ácido elágico (C₁₄H₆O₈), que possui função antioxidante, antimutagênica e anticancerígena (Wang et al., 1994; Vizzotto et al., 2012). Outros compostos antioxidantes como substâncias fenólicas, flavonoides, aminoácidos e ácido ascórbico, também são encontrados (Croge et al., 2019b).

A propagação da amoreira-preta é realizada principalmente pelo método da estaquia de caule e raízes. Entretanto, esse método não confere plantas livres de doenças herdadas da planta matriz e nem sempre as mudas são de qualidade (Dias et al., 2012). A propagação *in vitro* confere maior qualidade, menor tempo de produção e mudas sadias livres de doenças, vírus e pragas de solo (Villa et al., 2008).

A amoreira preta é uma espécie que se adaptou bem ao cultivo *in vitro*, podendo ser trabalhada de diversas maneiras dentro da cultura de tecidos. Desse modo é possível encontrar na literatura diversos protocolos do cultivo *in vitro* de certas cultivares de amoreira-preta, desde a etapa de introdução *in vitro* das plantas até a etapa de enraizamento

e aclimatização das mudas propagadas *in vitro*, porém é possível observar que para cada cultivar e de acordo com cada etapa do cultivo *in vitro* este protocolo pode ser alterado. Na etapa de introdução *in vitro* de amoreira-preta ‘Xavante’, a maior taxa de sobrevivência e o menor percentual de explantes oxidados foram obtidos quando as plantas matrizes foram mantidas na ausência de luz e utilizando a concentração de 75% e 100% dos sais no meio MS (Pelizza et al., 2016). Já na etapa de multiplicação, um estudo com sete cultivares de amoreira-preta: Brazos, Cherokee, Comanche, Ébano, Guarani, Tupy e Xavante, revelou diferentes respostas de acordo com a cultivar, sendo o número estimado de plantas foi 16.335 para ‘Brazos’, 24.211 para ‘Cherokee’, 19.778 para ‘Comanche’, 106.550 para ‘Ébano’, 14.275 para ‘Guarani’, 34.022 para ‘Tupy’ e 24.651 para ‘Xavante’ (Oliveira et al., 2008). Na etapa de multiplicação, o uso de reguladores vegetais é muito comum e as concentrações desses reguladores são alteradas de acordo com a demanda de cada cultivar, como por exemplo para se obter maior número de brotações na cultivar Chester Thornless necessitou de 8,8 µM BAP (6-benzilaminopurina) + 0,9 µM AIB (ácido indolbutírico) (Kefayeti et al., 2019), já para a cultivar Ébano necessitou de apenas 4,4 µM de BAP e meio MS 150% (Villa et al., 2005), enquanto que para a ‘Xavante’ obteve-se maior taxa de brotação no meio MS suplementado com 15 µM de BAP (Leitze et al., 2010). Na fase final do processo do cultivo *in vitro* pode se fazer o uso ou não de reguladores vegetais para potencializar o enraizamento, mas isto também vai depender da cultivar. Para as cultivares Ébano (Radmann et al., 2003; Villa et al., 2005), Brazos (Augusto et al., 2006) e Xavante (Pasa et al., 2012) não foi necessário o uso de reguladores vegetais para potencializar o enraizamento, pois estas cultivares já possuíam um bom enraizamento natural. Porém para a cultivar Chester Thornless o uso de 21,5 µM ANA (ácido naftalenoacético) potencializa o seu enraizamento *in vitro* (Kefayeti et al., 2019).

A recém lançada cultivar Xingu é uma das cultivares de amoreira-preta mais produtivas encontrada no mercado, ela apresenta período de colheita mais longo e possui a mesma faixa de adaptação climática do que a ‘Tupy’ (Raseira et al., 2018), podendo complementar os pomares já estabelecidos de outras cultivares, prolongando o período de colheita, facilitando o manejo e uso de mão-de-obra, permitindo aumento de renda e diversificação nas propriedades rurais.

Porém, como o lançamento da cultivar Xingu foi

recente, não há trabalhos publicados sobre a sua micropropagação e como sabemos que cada cultivar de amoreira-preta possuem necessidades diferentes e específicas no cultivo *in vitro*, os estudos com a propagação *in vitro* da cultivar Xingu são necessários. Assim, o objetivo dessa pesquisa foi otimizar um protocolo de propagação *in vitro* da amoreira-preta 'Xingu', definindo a concentração mais eficiente de BAP para multiplicação, o melhor agente gelificante e se há necessidade de AIB no enraizamento *ex vitro* e a sobrevivência durante a aclimatização.

MATERIAL E MÉTODOS

Os explantes da amoreira-preta 'Xingu' foram provenientes de plantas em fase de multiplicação *in vitro* cedidas pela Embrapa Clima Temperado. As plantas foram multiplicadas em meio MS (Murashige e Skoog, 1962) para obter os explantes necessários aos experimentos.

O meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige e Skoog, 1962) com 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de Ágar e 100 mg L⁻¹ de mio-inositol. As vitaminas presentes no meio MS foram: ácido nicotínico (0,5 mg L⁻¹), piridoxina-HCl (0,5 mg L⁻¹), tiamina (0,1 mg L⁻¹) e glicina (2 mg L⁻¹). Foi utilizado água deionizada no preparo do meio de cultura e pH foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar e da realização da autoclavagem.

Os explantes foram padronizados com tamanho médio entre 2 a 3 cm e duas folhas inteiras (Villa et al., 2006). Os explantes foram inoculados em frascos de vidro com 65 mm de diâmetro e 87 mm de altura, vedados com tampa plástica de polipropileno, contendo 30 mL de meio de cultura. A esterilização do meio de cultura foi realizada pela autoclavagem a 1 atm com temperatura de 120 °C, por 20 minutos. Todo o processo de repicagem do material vegetal e inoculação foram realizados em câmara de fluxo laminar.

Os experimentos foram mantidos na sala climatizada com temperatura de 25°C ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas. A iluminação foi fornecida por lâmpadas fluorescentes, tipo luz do dia, com intensidade luminosa de 40 µmol m⁻² s⁻¹.

Para a aclimatização e enraizamento *ex vitro*, foi utilizada casa de vegetação com nebulização intermitente, com controle automático de rega de 15 segundos a cada 30 minutos.

Concentrações de BAP na multiplicação de brotações

O experimento foi instalado com delineamento

inteiramente ao acaso, com 5 tratamentos, 4 repetições e dois frascos por parcela com 5 explantes cada, totalizando 200 explantes. Os tratamentos foram diferentes concentrações de BAP (0; 2,5; 5; 7,5 e 10 µM).

O experimento foi repetido por três subcultivos sucessivos, a cada quatro semanas. Os explantes com maior tamanho e vigor foram utilizados nos novos subcultivos dos respectivos tratamentos. Semelhante a metodologia utilizada por Erig et al. (2002).

As avaliações foram feitas, a cada quatro semanas, pelas seguintes variáveis: número de brotações, número de folhas por brotação, comprimento das brotações (as três maiores), explantes com calo, explantes com raízes e hiperhidricidade. O comprimento das brotações foi calculado levando em consideração o comprimento da base do explante até o meristema apical. A formação de calo foi avaliada pela presença de massas celulares indiferenciadas na base da brotação.

Agente gelificante do meio de cultura na multiplicação das brotações

Os tratamentos foram diferentes tipos de compostos gelificantes, Gelrite® (2 g L⁻¹) ágar da marca Vetec® (7 g L⁻¹) e meio líquido estacionário.

O experimento foi instalado com delineamento inteiramente ao acaso, com 3 tratamentos, 7 repetições, sendo dois frascos por parcela com 5 explantes por frasco, totalizando 210 explantes.

A avaliação foi realizada aos 30 dias das seguintes variáveis: número de brotações, número de folhas por brotação, comprimento das brotações, número de explantes com raízes e hiperhidricidade.

O fenômeno de hiperhidricidade foi avaliado segundo uma escala visual de níveis de severidade do fenômeno: 1)ausência, 2)suave, 3) moderada, 4)forte e 5)severa (Figura 1). Essa escala foi elaborada através da observação dos sintomas típicos, como folhas de coloração verde clara, translúcidas com aparência de vidro, turgidas, pequenas e bordos curvados (Vasconcelos et al., 2012).

AIB no enraizamento *ex vitro* e aclimatização

Nesse experimento foram testadas diferentes concentrações de AIB, da marca Neon® na forma líquida (0, 2,5, 4,9 e 9,8 mM). O AIB foi diluído em etanol 50%.

Os explantes utilizados tiveram origem de um subcultivo com meio MS + 5 µM de BAP, com tamanho médio entre 2 a 3 cm com duas folhas inteiras. A base de cada explante foi mergulhada na so-

lução contendo AIB durante 10 segundos e os explantes foram colocados em bandejas de isopor de 128 células contendo vermiculita de granulometria

fina. O experimento foi conduzido em câmara de nebulização intermitente, com controle automático de rega de 15 segundos a cada 30 minutos.

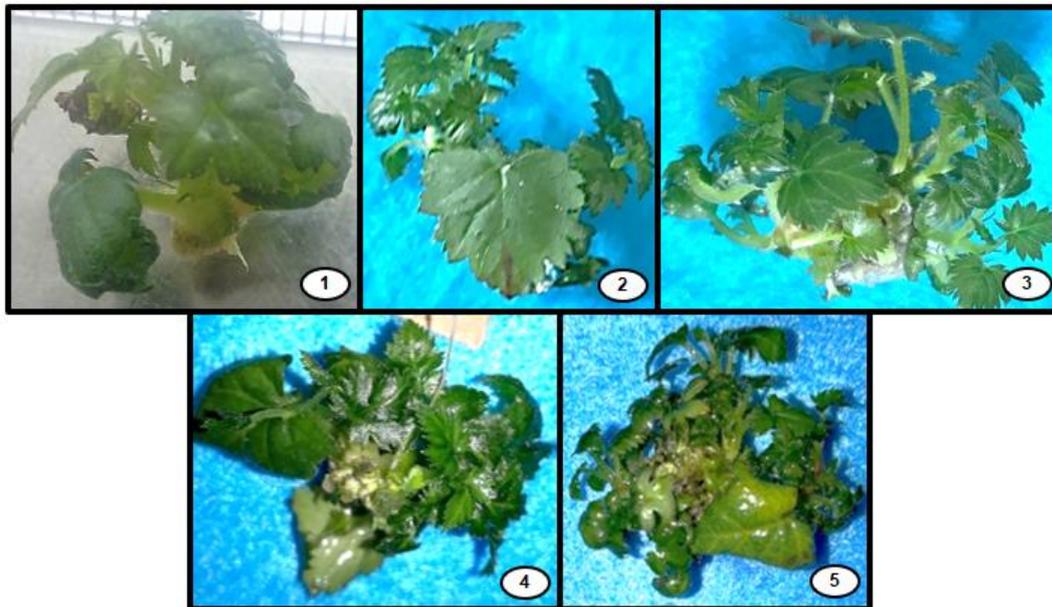


Figura 1 - Escala de severidade da hiperhidricidade em plantas de amoreira-preta cv. Xingu cultivadas in vitro. 1-Ausência, 2-Suave, 3-Moderada, 4-Forte, 5-Severa.

O experimento foi instalado com delineamento inteiramente ao acaso com 4 tratamentos, 6 repetições com 5 explantes por parcela totalizando 120 explantes.

A avaliação ocorreu após 45 dias, pelos seguintes parâmetros analisados pelo sistema Whinrizo®

(Figura 2): comprimento total das raízes por planta, área foliar por planta, volume de raízes, comprimento das raízes com diâmetro entre 0,0 a 0,5; 0,5 a 1,0 mm; e > 1,0 mm e superfície de contato solo/raiz.

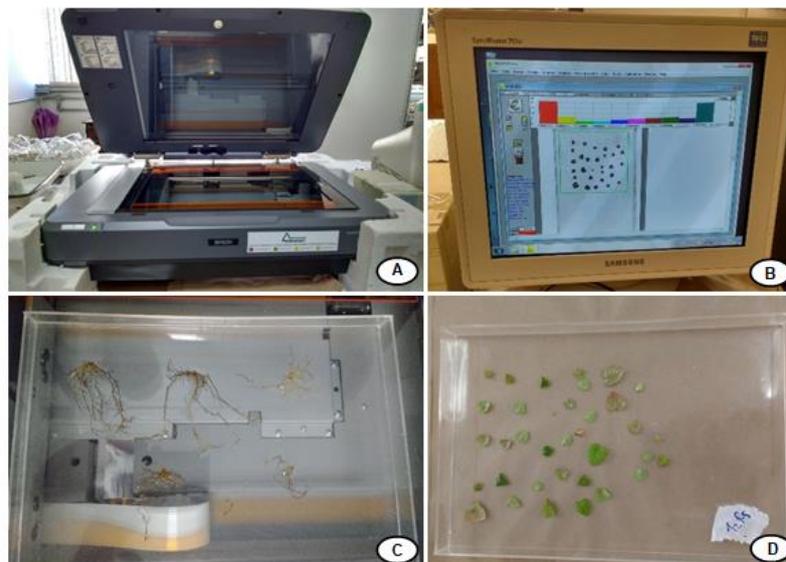


Figura 2 - Avaliação realizada pelo sistema Whinrizo®. A-aparelho Whinrizo®, B-leitura da área foliar, C-digitalização das raízes, D-digitalização das folhas.

Após realizada a avaliação pelo sistema Whinrizo®, as raízes, caules e folhas foram levadas a estufa por 24 horas a uma temperatura de 120 °C para secagem e posterior pesagem do material para determinar a massa seca.

A avaliação da aclimatização foi realizada pelos seguintes parâmetros: porcentagem de plantas que sobreviveram, altura das plantas e número de folhas por planta.

Os resultados de todos os experimentos foram submetidos a análise estatística utilizando o software ASSISTAT Versão 7.7 pt (2017), para os experimentos *in vitro* e *ex vitro* foram realizados o teste de Bartlett para verificar se as variâncias dos tratamentos eram homogêneas, posteriormente a análise de variância e o teste de Tukey no nível de 5%. Para análise do efeito de concentrações de BAP efetuou-se análise de regressão polinomial.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Concentrações de BAP na multiplicação de brotações

A tendência nos três subcultivos foi de acréscimo no número de brotações com o aumento da concentração de BAP, até atingir o máximo estimado pelas equações quadráticas de regressão que foram de 5,3 e 6,1 µM, para o segundo e terceiro subcultivo, respectivamente, acima dessas concentrações houve redução do número de brotos. Este comportamento pode ser ocasionado devido ao aumento da atividade da citocinina oxidase que regula as taxas de citocininas em cada tecido vegetal e com o aumento da concentração de BAP causa uma resposta negativa no surgimento de novas brotações (Aremu et al., 2012). Corroborando com este resultado Villa et al. (2005), testando BAP na micropropagação da amoreira-preta 'Ébano' verificou uma redução acentuada no número de brotos aumentando muito a concentração de BAP. O aumento na taxa de multiplicação, com a elevação da concentração de BAP até um ponto máximo foi observado na amoreira-preta 'Xavante' (Leitzke et al., 2010) e também encontrado em outras espécies, como bananeira (Pereira et al., 2014), pequiizeiro (Santos et al., 2006) e uvaieira (Nascimento et al., 2008).

No primeiro subcultivo a tendência foi linear (Figura 3). Nas testemunhas sem adição de BAP, não houve multiplicação, sendo formada apenas uma brotação por explante, semelhante ao observado com o porta-enxerto de videira VR043-43 (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*) com quatro subcultivos

(Machado et al., 2006).

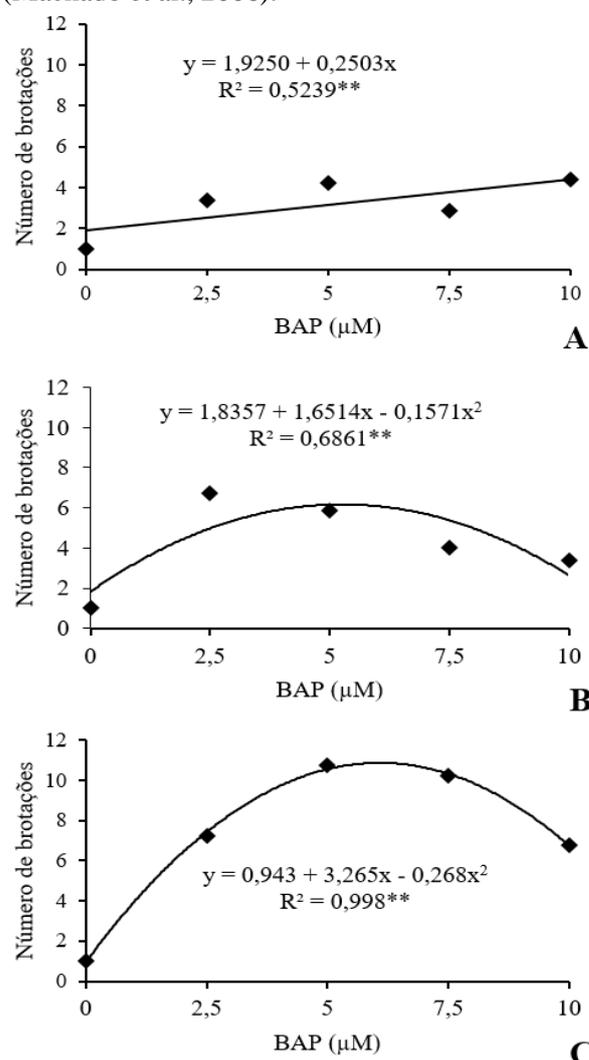


Figura 3 - Número de brotações emitidas por explante de amoreira-preta cv. Xingu em três subcultivos com diferentes concentrações de BAP. A) primeiro subcultivo, B) segundo subcultivo, C) terceiro subcultivo.

Os valores máximos estimados para a amoreira-preta 'Xingu' neste trabalho, estão próximos da concentração de 5 µM, que foi a mais efetiva na multiplicação da amoreira-preta 'Brazos' (Schuchowski e Biasi, 2018), 'Xavante' (Toledo e Biasi, 2018) e *Rubus erythroclados* (Bueno et al., 2018).

Outra tendência que pode ser observada é o aumento no número das brotações entre os sucessivos subcultivos, apontando um acréscimo de brotações a cada novo cultivo, isto pode ser decorrente ao resgate da juvenilidade após os sucessivos cultivos (Campbell et al., 2003; Beck et al., 1998), e pelo efeito residual do BAP nos tecidos vegetais da planta, uma vez que a ação da citocinina não é restrita a apenas um subcultivo (Rescarolli et al., 2007)

Nos três subcultivos foram encontradas regressões lineares significativas para o comprimento das brotações, com tendência decrescente com o aumento da concentração de BAP (Figura 4). Nas testemunhas as brotações foram sempre as mais altas, também observado para amoreira-preta ‘Brazos’ (Schuchovski e Biasi, 2018), ‘Xavante’ e framboeiras ‘Batum’ e ‘Heritage’ (Leitzke et al., 2010). O incremento da concentração de BAP causando a redução do tamanho das brotações de *Physalis peruviana* foi atribuído ao efeito do BAP em quebrar a dominância apical e estimular a emissão de novos brotos (Rodrigues et al., 2013).

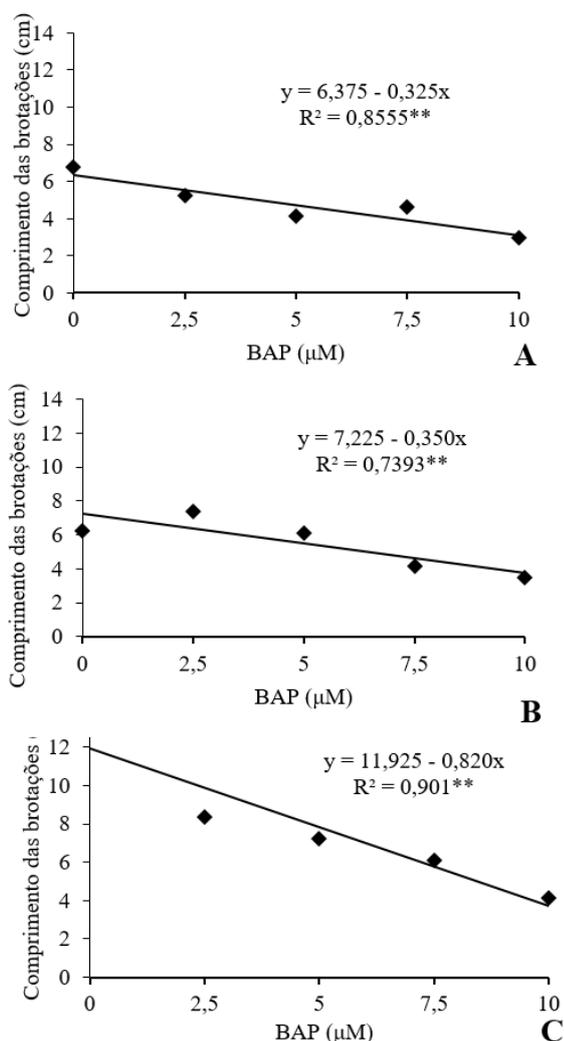


Figura 4 - Comprimento das brotações emitidas por explante de amoreira-preta cv. Xingu em três subcultivos com diferentes concentrações de BAP. A) primeiro subcultivo, B) segundo subcultivo, C) terceiro subcultivo.

As concentrações de BAP não diferiram quanto ao número médio de folhas no primeiro subcultivo, mas no segundo subcultivo houve uma regressão linear significativa e no terceiro subcultivo houve

uma regressão quadrática (Figura 5). A média do número de folhas por brotação foi de 3,2 no primeiro subcultivo e aumentou nos subcultivos posteriores, sendo acima de 5 folhas por brotação nas testemunhas. O número de folhas e altura das brotações foram maiores na testemunha devido ao menor número de brotos, pois nas demais concentrações o regulador estimulou a proliferação de brotações que apresentaram menor crescimento. Fato também observado para a amoreira-preta ‘Ébano’ (Villa et al., 2005).

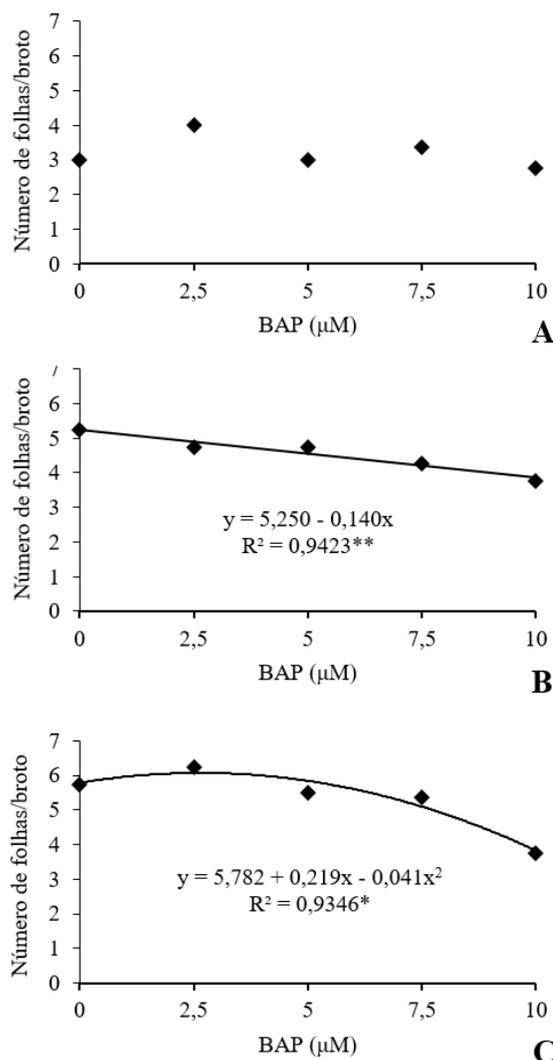


Figura 5 – Número médio de folhas por brotação emitida por explante de amoreira-preta cv. Xingu em três subcultivos com diferentes concentrações de BAP. A) primeiro subcultivo, B) segundo subcultivo, C) terceiro subcultivo.

Agente gelificante do meio de cultura na multiplicação das brotações

Todas as variáveis analisadas apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. O meio

líquido foi superior aos tratamentos com agentes gelificantes para o número de brotações por explante, comprimento das brotações, número de folhas por brotação e formação de raízes. Entretanto, favoreceu a ocorrência de hiperhidricidade, que foi

muito mais severa, atingindo o índice mais elevado em quase todas as plantas. O meio com Gelrite® apresentou índice intermediário, entre moderado a forte (3,7), e o meio com ágar apresentou os menores índices, próximo de suave (2,2) (Tabela 1).

Tabela 1 - Efeito do agente gelificante do meio de cultura no número e comprimento de brotações, número de folhas por brotação, número de explantes com raízes e índice de hiperhidricidade de amoreira-preta 'Xingu'.

Tratamentos	Número de brotações	Comprimento das brotações (cm)	Número de folhas/ brotação	Explantes com raízes (%)	Hiperhidricidade ²
Líquido	12,3 a ¹	12,6 a	6,2 a	3,0 a	4,9 a
Gelrite®	10,0 b	8,6 b	4,8 b	0,0 b	3,7 b
Ágar	6,4 c	5,5 c	4,1 c	0,0 b	2,2 c

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

²Índice de hiperhidricidade: 1-Ausência, 2-Suave, 3-Moderada, 4-Forte, 5-Severa.

A superioridade do meio líquido em relação aos meios semi-sólidos, provavelmente é resultado da maior eficiência de absorção dos nutrientes que compõem o meio de cultura. Esse comportamento também foi observado na multiplicação de batata em meio de cultura líquido, onde houve um aumento significativo na taxa de multiplicação, pela falta de resistência física a difusão dos nutrientes em comparação aos meios de cultura semi-sólidos, e pelo maior contato dos explantes com o meio, favorecendo a taxa de assimilação de nutrientes em meio líquido (Pereira e Fortes, 2003). O meio líquido também foi superior ao meio de cultura com ágar na multiplicação de abacaxizeiro ornamental (*Ananas lucidus*) (Oliveira et al., 2007) e bromélias (Mengarda et al., 2009).

Apesar da superioridade do meio líquido no crescimento e multiplicação da amoreira-preta 'Xingu', a qualidade das brotações foi muito inferior devido a hiperhidricidade. Este fenômeno é favorecido pela elevada umidade relativa dentro dos frascos de cultivo, ocasionando uma reduzida taxa transpiratória e absorção excessiva de água pelos tecidos vegetais com a formação novas células, que logo se tornam túrgidas (Vasconcelos et al., 2012). As

plantas sob efeito da hiperhidricidade não tem condições de sobreviver as condições *ex vitro*, porque possuem menor teor de massa seca, menor capacidade fotossintética, baixa resistência da parede celular, folhas entumecidas e quebradiças, alterações nos estômatos e menor lignificação, inviabilizando a produção de mudas comerciais (Radmann et al., 2009).

Para o uso de meio líquido é necessário que haja um sistema de aeração, que pode ser obtido em biorreatores, nos quais os explantes são imersos em intervalos pré-estabelecidos no meio de cultura líquido e as trocas gasosas são realizadas com frequência (Arencibia et al., 2013).

AIB no enraizamento *ex vitro* e aclimatização

Não houve diferença significativa entre os tratamentos para quase todas as variáveis analisadas, exceto para o comprimento das raízes com diâmetro maior que 1 mm, no qual o tratamento com 4,9mM foi superior a testemunha, mas não diferiu dos tratamentos 2,5mM e 9,8mM (Tabela 2) e para a altura das plantas, no qual a testemunha foi superior a 4,9mM, mas não diferiu de 2,5mM e 9,8mM (Tabela 3).

Tabela 2 – Efeito de ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento *ex vitro* de amoreira-preta 'Xingu'. CTR = Comprimento Total de Raízes por planta; CRD = Comprimento de Raízes com Diâmetro por planta; SCSR = Superfície de contato solo/raiz por planta; Volume de raízes por planta.

AIB (mM)	CTR (cm)	CRD			SCSR (cm ²)	Volume (cm ³)
		0,0 a 0,5 mm (cm)	0,5 a 1,0 mm (cm)	> 1 mm (cm)		
0	246,7 a	200,4 a	38,1 a	7,0 b	34,5 a	0,38 a
2,5	233,4 a	191,2 a	30,3 a	9,8 ab	33,8 a	0,39 a
4,9	247,2 a	196,9 a	34,7 a	12,1 a	39,9 a	0,51 a
9,8	224,6 a	185,4 a	27,3 a	8,9 ab	35,1 a	0,44 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 3 - Efeito de ácido indolbutírico (AIB) no crescimento das plantas de amoreira-preta 'Xingu' durante a aclimatização.

AIB (mM)	Comprimento da planta (cm)	Área foliar por planta (cm ²)	Número de folhas por planta	Massa seca (g) por planta		
				Raiz	Caule	Folhas
0	9,3 a	30,1 a	5,5 a	0,08 a	0,04 a	0,11 a
2,5	7,7 ab	26,7 a	5,7 a	0,07 a	0,03 a	0,10 a
4,9	7,1 b	28,1 a	5,8 a	0,09 a	0,03 a	0,09 a
9,8	8,0 ab	25,8 a	5,3 a	0,08 a	0,03 a	0,09 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A porcentagem de enraizamento e sobrevivência das plantas de amoreira-preta 'Xingu' foi de 100 % em todos os tratamentos. Este resultado revela uma grande facilidade para a formação adventícia de raízes desta cultivar, dispensando o enraizamento *in vitro* e o uso de auxinas para esta fase. Resultados semelhantes foram obtidos com a cultivar Brazos, que também dispensou o uso de AIB para o enraizamento *in vitro* e *ex vitro*, sendo obtidas taxas de enraizamento e sobrevivência de 100 % (Augusto et al., 2006). A cultivar Xavante também demonstrou grande facilidade de enraizamento *in vitro* em meio de cultura semi-sólido ou meio líquido com vermiculita e sobrevivência de todas as plantas aclimatizadas (Toledo e Biasi, 2018).

CONCLUSÃO

A amoreira-preta cv. Xingu pode ser propagada *in vitro* em meio de cultura MS acrescido de 5 µM de BAP e solidificado com ágar (7 g L⁻¹) e o enraizamento pode ser realizado *ex vitro* durante a aclimatização, sem a necessidade de auxinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antunes LEC, Pereira IS, Picolotto L, Vignolo GK, Gonçalves MA. Produção de amoreira-preta no Brasil. Revista Brasileira de Fruticultura, v.36, n.1, p.100-111, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-2945-450/13>
- Aremu AO, Bairu MW, Dolezal K, Finnie JF, Staden JV. Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges? Plant Cell Tissue and Organ Culture, v.108, p.1-16, 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-011-0007-7>
- Arencibia AD, Vergara C, Quiroz K, Carrasco B, García-Gonzalez R. Establishment of photomixotrophic cultures for raspberry micropropagation in Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). Scientia Horticulturae, Amsterdam, v.160, p.49-53, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.05.010>
- Augusto CSS, Biasi LA, Telles CA. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de amoreira-preta cv. Brazos. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.28, n.3, p.473-476, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452006000300029>
- Beck SL, Dunlop R, Staden Van J. Rejuvenation and micropropagation of adult *Acacia mearnsii* using coppice material. Plant Growth Regulation, Dordrecht, v.26, p.149-153, 1998.
- Bueno PMC, Biasi LA. Micropropagation of greenberry (*Rubus erythrocylados*). Acta Horticulturae, n.1083, p.383-389, 2015. <http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1083.48>
- Campbell MM, Brunner AM, Jones HM, Strauss, SH.; Forestry's fertile crescent: the application of biotechnology to forest trees. Plant Biotechnology Journal, v.1, n.3, p.141-154, 2003. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1467-7652.2003.00020.x>
- Croge CP, Cuquel FL, Biasi LA, Bona CM. Performance of blackberry cultivars in Cerro Azul-PR. Revista Brasileira de Fruticultura, v.38, n.3, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452016141>
- Croge CP, Cuquel FL, Biasi LA, Bona CM, Pintro PTM. Agronomic performance of blackberry cultivars in Lapa-PR. Revista Brasileira de Fruticultura, v.41, n.2, 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452019101>
- Croge CP, Cuquel FL, Pintro PM, Biasi LA, Bona CM. Antioxidant Capacity and polyphenolic compounds of blackberries produced in different climates, HortScience, v.54, n.12, p.2209-2213, 2019. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI14377-19>
- Dias JPT, Takahashi K, Duarte Filho J, Ono EO. Bioestimulante na promoção da brotação em estacas de raiz de amoreira-preta. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.34, n.1, p.1-7, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452012000100003>
- Erig AC, Rossi A, Fortes GRL. 6-benzilaminopurina e ácido indolbutírico na multiplicação *in vitro* da amoreira-preta (*Rubus idaeus* L.), cv. Tupy. Ciência Rural, Santa Maria, v.32, n.5, p.42-46, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782002000500005>
- Kefayati S, Kafkas E, Ercisl S. Micropropagation of 'Chester thornless' blackberry cultivar using axillary bud explants. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj- napoca, v.47, n.1, p.162-168, 2019. <http://dx.doi.org/10.15835/nbha47111280>
- Leitzke L, Damiani CR, Schuch MW. Influência do meio de cultura, tipo e concentração de citocininas na multiplicação

- in vitro de amoreira-preta e framboeseira. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.34, n.2, p.352-360, 2010.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542010000200012>
- Machado MP, Biasi LA, Ritter M, Ribas LLF, Koehler HS. Multiplicação in vitro do porta-enxerto de videira VR043-43 (*Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia*). *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.30, n.4, p.648-655, 2006.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542006000400009>
- Mengarda LHG, Povoas L, Debiaci C, Pescador R. Estado físico na propagação in vitro de Bromeliaceae. *Scientia Agraria*, Curitiba, v.10, n.6, p.469-474, 2009.
<http://dx.doi.org/10.5380/rsa.v10i6.15532>
- Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nascimento AC, Paiva R, Nogueira RC, Porto JMP, Nogueira GF, Soares FP. BAP e AIB no cultivo in vitro de *Eugenia pyriformis* Cambess. *Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais*, Curitiba, v.6, n.2, p.223-228, 2008.
- Oliveira MKT, Bezerra Neto F, Câmara FAA, Nunes GHS, Oliveira FA. Propagação in vitro da cultura do abacaxizeiro Ornamental (*Ananas lucidus* Miller). *Revista Caatinga*, v.20, n.3, p.167-171, 2007.
- Oliveira RP, Nino AFP, Ferreira VF. Potencial de multiplicação in vitro de cultivares de amoreira-preta. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.30, n.3, p.585-589, 2008.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452008000300004>
- Pasa MS, Carvalho GL, Schuch MW, Schmitz JD, Torchelsen MM, Nickel GK, Sommer LR, Lima TS, Camargo SS. Qualidade de luz e fitorreguladores na multiplicação e enraizamento in vitro da amoreira-preta 'Xavante'. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.42, n.8, p.1392-1396, 2012.
<https://doi.org/10.1590/S0103-84782012000800010>
- Pelizza TR, Silveira FN, Ribeiro RS, Machado BD, Rufatto L. In vitro establishment of blackberry (*Rubus* sp.) cultivar 'Xavante'. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.46, n.9, p.1542-1545, 2016.
<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140988>
- Pereira GA, Boliani AC, Corrêa LS. Concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) e Cinetina (CIN) e tempos de cultivo na micropropagação de bananeira 'Thap maeo'. *Plant Cell Culture e Micropropagation*, Lavras, v.10, n.1, p.7-12, 2014.
- Pereira JES, Fortes GRL. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.38, n.9, p.1035-1043, 2003.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2003000900003>
- Radmann EB, Bianchi VJ, Souza TM, Fachinello JC, Oliveira RP. Influência da composição do meio de cultivo e do tipo de explante na micropropagação do porta-enxerto de *Prunus* sp. 'GXN-9'. *Scientia Agraria*, Curitiba, v.10, n.2, p.095-101, 2009.
<http://dx.doi.org/10.5380/rsa.v10i2.13573>
- Raseira MCB, Franzone RC, Scaranari C. Cultivar de amoreira-preta BRS Xingu: alternativa a cultivar Brazos para o Sudeste do Brasil. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. 2018. 6p. (Comunicado Técnico, 362).
- Rescarolli CL, Zafarri GR. Produção de mudas de *Etilingera elatior* através da cultura de tecidos vegetais in vitro. *Ornamental Horticulture*, Itajaí, v. 13 s/p. 2007.
<https://doi.org/10.14295/oh.v13i0.1601>
- Rodrigues FA, Penoni ES, Soares JDR, Pasqual M. Diferentes concentrações de sais do meio MS e BAP na multiplicação in vitro de *Physalis peruviana* L. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v.29, n.1, p.77-82, 2013.
- Santos BR, Paiva R, Nogueira RC, Oliveira LM, Silva DPC, Martinotto C, Soares FP, Paiva PDO. Micropropagação de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.28, n.2, p.293-296, 2006.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452006000200031>
- Schuchovski CS, Biasi LA. Development of an efficient protocol for 'Brazos' blackberry in vitro multiplication. *Acta Horticulturae*, v.1224, p.157-164, 2018.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1224.21>
- Silva AB, Pasqual M, Maciel ALR, Dutra LF. BAP e substratos na aclimatização de plântulas de gloxínia (*Sinningia speciosa* Lood. Hiern.) provenientes de cultura de tecidos. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.27, n.2, p.255-260, 2003.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542003000200002>
- Toledo JA, Biasi LA. Multiplicação e enraizamento in vitro da amoreira-preta cv. Xavante. *Cultura Agronômica*, Ilha Solteira, v.27, n.3, p.328-339, 2018.
- Vasconcelos AGV, Tomas LF, Camara TR, Willadino L. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.42, n.5, p.837-844, 2012.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782012000500013>
- Villa F, Araújo AG, Pio LAS, Pasqual M. Multiplicação in vitro da Amoreira-preta 'Ébano' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 29, n. 3, p. 582-589, 2005.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542005000300011>
- Villa F, Fráguas CB, Dutra LF, Pio LAS, PASQUAL M. Multiplicação in vitro de amoreira-preta cultivar Brazos. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.30, n.2, p.266-270, 2006.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542006000200011>
- Villa F, Pasqual M, Assis FA, PIO LAS, Assis GA. Crescimento in vitro de amoreira-preta: efeito de reguladores de crescimento e da cultivar. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.32, n.6, p.1754-1759, 2008.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542008000600012>
- Vizzotto M, Raseira MCB, Pereira MC, Fetter MR. Teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante em diferentes genótipos de amoreira-preta (*Rubus* sp.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.34, n.3, p.853-858, 2012.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452012000300027>
- Wang SY, Maas JL, Payne JA, Galletta GJ. Ellagic acid content in small fruits mayhaws, and other plants. *Journal Small Fruit and Viticulture*, Louisiana, v.2, n.4, p.11-49, 1994.