

MEIOS DE CULTURA E REGULADORES DE CRESCIMENTO NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE AMOREIRA-PRETA

CULTURE MEDIUM AND GROWTH REGULATORS *IN VITRO* BLACKBERRY MICROPROPAGATION

Fabiola VILLA¹
Moacir PASQUAL²
Aline das Graças SOUZA³
Ximena Maira de Souza VILELA³

RESUMO

A micropropagação da amoreira-preta pode gerar plantas livres de vírus e em curto espaço de tempo. Com o objetivo de aprimorar técnicas de propagação *in vitro* de amoreira-preta, testaram-se diferentes meios de cultivo e concentrações de 6-belzilaminopurina (BAP) e ácido indolbutírico (AIB). O primeiro experimento constou da cv. Brazos inoculada em 3 diferentes meios, combinados com cinco concentrações de BAP. O segundo experimento constou da cv. Tupy inoculada em 4 meios de cultivo, combinados com cinco concentrações de AIB. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da adição de 6 g cm⁻³ de ágar e da autoclavagem a 121 °C e 1 atm por 20 min. Após a inoculação, os explantes foram mantidos por 70 dias, em sala de crescimento a 25 ± 1 °C, irradiância de 35 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 h. Os experimentos foram inteiramente casualizados, utilizando-se três explantes por repetição e 12 brotações por tratamento. Verificou-se maior número de brotos da cv. Brazos em meio de cultura MS. Comprimento e número de raízes dessa mesma cultivar foram estimulados em meio Roubelakis e MS adicionados de 0,5 mg dm⁻³ de BAP. Foi observada a formação do sistema radicular das brotações em todos os meios empregados, porém melhores resultados de 'Tupy', na ausência de AIB deu-se nos meios Knudson, NN e MS.

Palavras-chave: *Rubus* spp.; cultura de tecidos; BAP; AIB.

ABSTRACT

The micropropagation of blackberry can generate virus-plants free and in a short space of time. Aiming to improve *in vitro* propagation techniques of blackberry, were tested different culture media and 6-benzylaminopurin (BAP) concentrations and indolbutyric acid (IBA). The first experiment consisted cv. 'Brazos' inoculated in 3 different culture medium, combined with five BAP concentrations. As the second experiment consisted cv. Tupy inoculated in 4 culture medium, combined with five IBA concentrations. The pH of culture medium was adjusted for 5.8 before the addition of 6 g cm⁻³ agar and the sterilization of 121 °C and 1 atm for 20 min. After the inoculation, the explants had been kept per 70 days, in a growth room with 25 ± 1 °C, irradiance of 35 mmol m⁻² s⁻¹ and photoperiod of 16 h. The experiments entirely casualized, using three explants per repetition and 12 buds per treatment. There were verified bigger number of 'Brazos' buds in culture medium MS. Length and number of roots of cv. Brazos had been stimulated in culture medium Roubelakis and MS added 0,5 mg dm⁻³ of BAP. The formation of radicular system of this cv. was observed of buds in all culture medium studied, however better resulted of cv Tupy, was observed on the absence of IBA for the culture medium Knudson, NN and MS.

Key-words: *Rubus* spp.; tissue culture; BAP; IBA.

¹Pós-doutoranda em Fitotecnia, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) / Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Bairro Vargedo, Maria da Fé, Minas Gerais, Brasil. E-mail: fvilla2003@libero.it_Autor para correspondência

²Professor Titular, D.Sc., Departamento de Agricultura (DAG), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Caixa Postal 37, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil. E-mail: mpasqual@ufla.br

³Mestranda em Fitotecnia, Departamento de Agricultura (DAG), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brasil. E-mail: alinedasgracas@yahoo.com.br.

INTRODUÇÃO

No Brasil, a amoreira-preta vem sendo cultivada por pequenos produtores do Rio Grande do Sul (principal produtor brasileiro), Santa Catarina e Paraná, objetivando a exportação dos frutos. No Rio Grande do Sul, as maiores produções encontram-se nos municípios de Feliz e Vacaria, onde a cultivar Tupy responde por 70% da área cultivada, com produção a partir da terceira dezena de novembro (Antunes, 2002). Em São Paulo a produção concentra-se na região de Jundiá e em Minas Gerais, no Planalto de Poços de Caldas (Antunes et al., 2000) e Zona da Mata (Barbacena).

Atualmente, além da propagação tradicional, a micropropagação da amoreira-preta é considerada uma outra alternativa viável, com o intuito de se obter plantas livres de vírus, geneticamente uniformes e em curto espaço de tempo (Leitzke et al., 2009).

Um dos fatores importantes para o sucesso do sistema de micropropagação é a conjugação de fatores nutritivos, ambientais e endógenos. No caso específico dos fatores ambientais, procura-se estudar os componentes do meio de cultura. Neste caso, diversas formulações de meios básicos têm sido utilizadas em frutíferas. Embora não exista uma formulação padrão, o meio MS e suas modificações têm apresentado resultados satisfatórios para diversas espécies (George & Sherrington, 1984). Entretanto, com espécies lenhosas, o meio MS não se mostrou satisfatório em alguns casos (Grattapaglia & Machado, 2004). Outras formulações como, por exemplo, o meio NN e Knudson, têm sido descritas e utilizadas como alternativas ao MS.

O crescimento e a morfogênese *in vitro* são fatores regulados pela interação e balanço dos reguladores de crescimento existentes no meio de cultura, principalmente auxinas e citocininas (George & Sherrington, 1984). As citocininas são utilizadas para quebrar a dominância apical dos brotos, e aumentar a taxa de multiplicação (Grimaldi et al., 2008).

As auxinas, apesar de não promoverem a proliferação de brotações axilares, podem incrementar o crescimento da cultura (Grimaldi et al., 2008). Dentre os reguladores de crescimento comumente usadas no cultivo *in vitro* da amoreira-preta estão a 6-benzilaminopurina (BAP) e o ácido indolbutírico (AIB) (Erig et al., 2002; Villa et al., 2006; Villa et al., 2008).

O presente trabalho objetivou avaliar o efeito das concentrações de ácido indolbutírico (AIB) e 6-benzilaminopurina (BAP) adicionados à diversos meios de cultura na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta cultivares Tupy e Brazos.

MATERIAL E MÉTODOS

Segmentos nodais de amoreira-preta (*Rubus* sp.), cultivares Tupy e Brazos, com cerca de 2 cm, foram excisados de brotações pré-estabelecidas *in vitro*. Os explantes foram inoculados em tubo de ensaio contendo 15 cm³ de diversos meios de cultivo.

O primeiro experimento constou da cv. Brazos inoculada em 3 diferentes meios: 1) MS (Murashige & Skoog, 1962), 2) Knudson (1946) e 3) Roubelakis (Roubelakis-Angelakis & Zivanovitch, 1991), combinados com cinco concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg dm⁻³).

O segundo experimento constou da cv. Tupy inoculada em 4 meios de cultivo: 1) MS (Murashige & Skoog, 1962), 2) Knudson (1946), 3) Roubelakis (Roubelakis-Angelakis & Zivanovitch, 1991) e 4) NN (Nitsch & Nitsch, 1969), combinados com cinco concentrações de AIB (0; 0,125; 0,25; 0,5 e 1,0 mg dm⁻³). O pH dos meios foram ajustados para 5,8 antes da autoclavagem e solidificados com 6 g dm⁻³ de ágar.

Posteriormente foram transferidos para sala de crescimento a 25±1 °C, irradiância de 35 μmol m⁻²s⁻¹ fornecida por tubos fluorescentes de 20 W e fotoperíodo de 16 h, permanecendo nestas condições por 70 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 repetições constituídas e 12 plantas tratamento⁻¹. As variáveis analisadas foram comprimento da parte aérea e das raízes (dados transformados -

$\sqrt{x+1}$), biomassa da parte aérea, número de

brotos (dados transformados - $\sqrt{x+1}$) e massa fresca de calos. Os resultados foram submetidos à análise de variância (Ferreira, 2000), sendo utilizado regressão polinomial para concentrações de BAP e AIB e teste de Scott-Knott para os tipos de meios de cultivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1

Os dados obtidos no experimento 1 revelaram que houve interação significativa para todos os parâmetros estudados, exceto para número de brotos e biomassa da parte aérea (Tabela 1). Nas Tabelas 2 e 3 observa-se interação para os diferentes meios de cultivo empregados na micropropagação de amoreira-preta cv. Brazos.

TABELA 1 - Análise de variância para número de folhas (NF), número de brotos (NB), biomassa da parte aérea (BPA), massa fresca de calos (BCA), comprimento da parte aérea (CPA), número de raízes (NR) e comprimento de raízes (CR) de amoreira-preta cv. Brazos micropropagada. UFLA, Lavras, MG, 2008.

	Quadrados médios							
	GL	NF	NB	BPA	BCA	CPA	NR	CR
BAP	4	2,839*	11,187*	0,011 ^{n.s.}	0,053*	1,161*	0,149 ^{n.s.}	0,063 ^{n.s.}
MC	2	1,331*	16,432*	0,468*	0,106*	5,015*	1,849*	2,251*
BAP x MC	8	0,891*	0,456 ^{n.s.}	0,004 ^{n.s.}	0,022*	4,328*	0,229*	0,300*
Resíduo	42	0,251	0,347	0,005	0,002*	0,422	0,066	0,066
CV (%)		13,58	22,63	7,97	5,12	23,37	18,51	18,43

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, n.s. = não-significativo, GL = graus de liberdade, BAP = 6-benzilaminopurina, MC = meios de cultura, CV = coeficiente de variação.

TABELA 2 - Diferentes meios de cultura e concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) na micropropagação de amoreira-preta cv. Brazos. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Tipos de meio de cultura	BAP (mg dm ⁻³)					
	0	0,5	1,0	2,0	4,0	
NF	Knudson	0	0	0	4,63 a*	2,48 b
	MS	0	0	0	4,37 a	3,93 a
	Roubelakis	0	0	0	3,69 b	3,39 a
BCA	Knudson	0	0,76 b	0,80 b	0,77 c	0,71 c
	MS	0	0,78 b	0,85 b	0,97 a	1,03 a
	Roubelakis	0	0,88 a	0,94 a	0,88 b	0,93 b
CPA	Knudson	4,38 a	1,74 b	1,28 b	2,00 b	1,71 b
	MS	1,88 c	3,67 a	3,79 a	3,29 a	3,31 a
	Roubelakis	3,31 b	3,38 a	3,38 a	2,50 b	2,11 b
NR	Knudson	0	0,93 b	0,71 b	0,97 b	0,93 b
	MS	0	1,68 a	1,52 a	1,66 a	1,55 a
	Roubelakis	0	1,66 a	1,52 a	1,47 a	1,56 a
CR	Knudson	0	0,92 b	0,71 b	0,97 b	0,84 b
	MS	0	1,60 a	1,62 a	1,58 a	1,57 a
	Roubelakis	0	1,80 a	1,78 a	1,65 a	1,45 a

*Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott. NF = número de folhas, BCA = biomassa de calos, CPA = comprimento da parte aérea, NR = número de raízes, CR = comprimento de raízes.

TABELA 3 - Número de brotos (NB) e biomassa da parte aérea (BPA) de amoreira-preta cv. Brazos micropropagada, em diferentes meio de cultura. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Tipos de meios de cultura	NB	BPA
Knudson	1,93 b*	0,76 b
MS	3,63 a	1,04 a
Roubelakis	2,24 b	0,79 b

*Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

O número de folhas foi estimulado pelo tipo de meios de cultura e 2 e 4 mg dm⁻³ de BAP, observando a interação entre esses dois fatores (Figura 1). Maior número de folhas foi observado em meio Knudson e MS adicionados de 2 mg dm⁻³ de BAP e MS e Roubelakis adicionados de 4 mg dm⁻³ de BAP. Verificou-se menor número de folhas em meio Knudson adicionado de 4 mg dm⁻³ de

BAP. Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira (1994), trabalhando com crisântemo cultivado em meio MS, que observou queda no número com aumento das concentrações de BAP. Isto pode ser atribuído ao fato do BAP estimular a formação de maior número de brotos, porém, de tamanho reduzido, apresentando menor número de segmentos nodais e folhas.

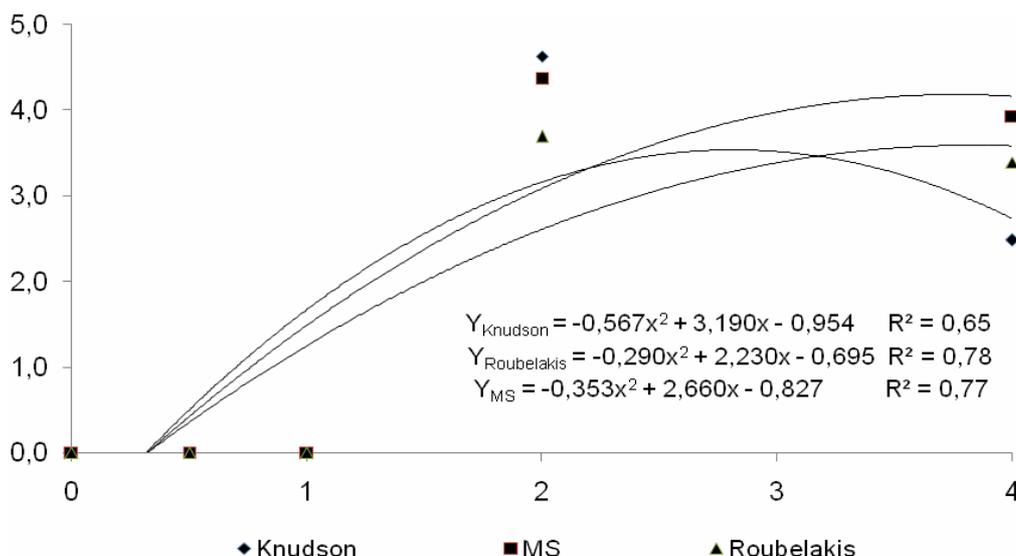


FIGURA 1 - Número de folhas de amoreira-preta cv. Brazos, em diferentes meios de cultura, adicionados de concentrações de BAP (ácido 6-benzilaminopurina). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Através da análise de variância observou-se que, o número de brotos da cv. Brazos foi estimulado pelo tipo de meio de cultivo e pela concentração de BAP separadamente (Tabelas 1 e 3). Em meio de cultivo MS verificou-se maior número de brotos. Em trabalho com café 'Catuaí', objetivando determinar o efeito de diferentes proporções dos sais inorgânicos e componentes orgânicos do meio MS, Forni & Pasqual (1996) observaram que o aumento dos níveis de MS proporcionou maior número de brotos, de folhas e peso da matéria seca. Com incremento nas concentrações de BAP, foi observado aumento de forma quadrática no número de brotos de amoreira-preta até 2 mg dm⁻³ de BAP. Após essa concentração, verificou-se um decréscimo nesses valores, devido ao fato da citocinina em altas concentrações ser tóxica às culturas *in vitro*.

Maior comprimento da parte aérea foi observado nos diversos meios de cultivo associados as cinco concentrações do regulador estudadas (Figura 2). Verificou-se maior alongamento dos brotos em meio Knudson, na ausência de BAP (Tabela 1). Menores alturas de brotações de amoreira-preta foram observadas em meio Knudson adicionado de altas concentrações da citocinina (1 mg dm⁻³ de BAP). Estes resultados concordam com a maioria dos autores que afirmam que este regulador de crescimento não é responsável pelo alongamento de brotos (Paiva et al., 1997). Leshem et al. (1988) mencionam ser tóxico o uso da citocinina em níveis elevados, caracterizando-se principalmente, pelo enroscamento e falta de alongamento das culturas.

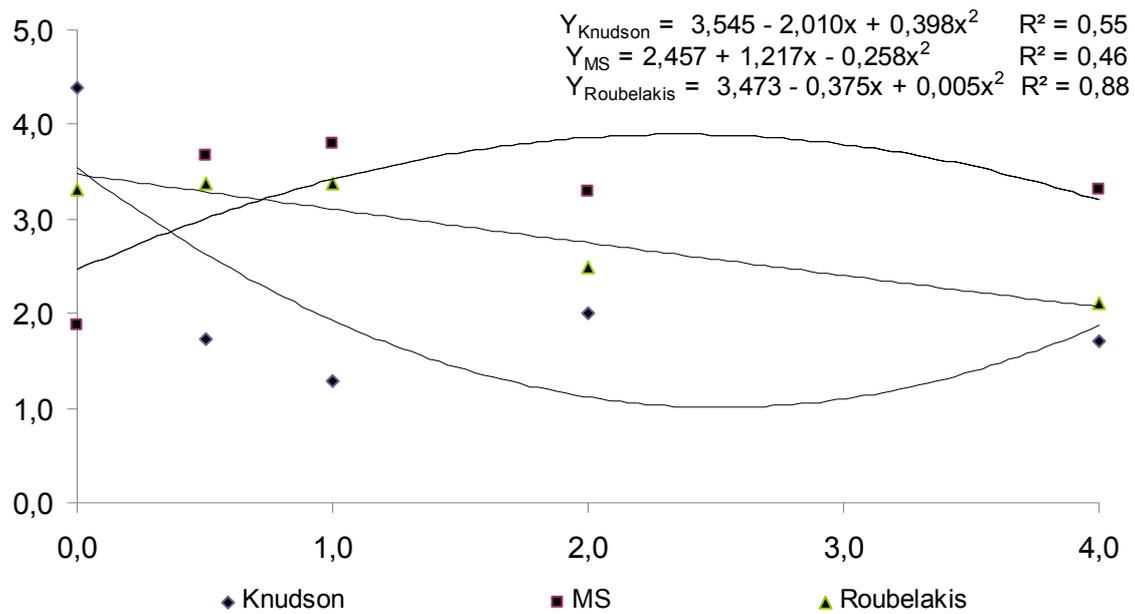


FIGURA 2 - Comprimento da parte aérea (cm) de amoreira-preta cv. Brazos, em diferentes meios de cultura, adicionados de concentrações de BAP (ácido 6-benzilaminopurina). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Verificou-se interação significativa para número (Figura 3) e comprimento das raízes em relação ao meio de cultivo e as concentrações de 0,5; 1; 2 e 4 mg dm⁻³ de BAP. Trabalhando com adição de 0,5-2 mg dm⁻³ de BAP no meio de cultura Roubelakis e MS, obtiveram-se maior número e comprimento de raízes. Em estudos com amoreira-preta, autores verificaram que o meio de cultura MS se sobressaiu na sua micropropagação

(Erig et al., 2002). O crescimento de plantas, órgãos, tecidos e células *in vitro* depende do desenvolvimento de meios de cultura otimizados para a perfeita interação de componentes essenciais como fontes de carbono e nutrientes minerais. Os fatores que limitam esse crescimento *in vitro* são similares àqueles que limitam *in vivo* (Wu et al., 2009).

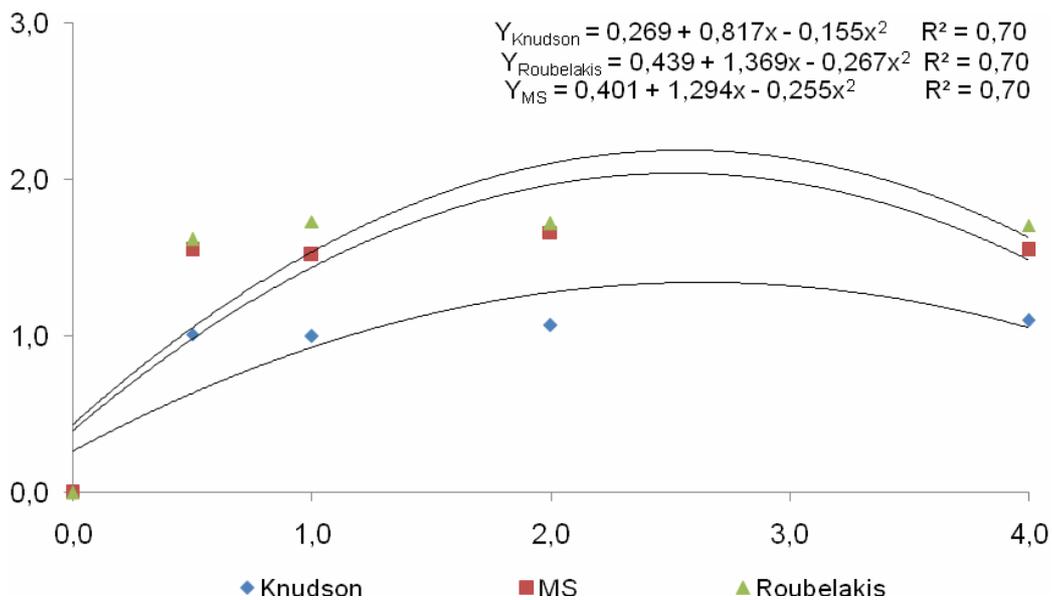


FIGURA 3 - Número de raízes de amoreira-preta cv. Brazos, em diferentes meios de cultura, adicionados de concentrações de BAP (ácido 6-benzilaminopurina). UFLA, Lavras, MG, 2008.

A massa fresca da parte aérea foi estimulado pela utilização do meio de cultura. Melhores resultados foram obtidos em meio MS. Com um aumento significativo da massa da matéria fresca no decorrer do tempo, o potencial osmótico do meio foi maior. Conseqüentemente, as plantas nesse meio conseguiram absorver mais água para os seus tecidos e, portanto, tiveram maior massa da matéria fresca.

A massa fresca de calos na base dos explantes de amoreira-preta foi influenciada pelos tipos de meio empregados e concentrações da

citocinina (Figura 4). Maior peso de calos foi observado em meio MS associado a 2-4 mg dm⁻³ de BAP e em meio Roubelakis associado a 0,5-1 mg dm⁻³. A formação de calos não é desejada na micropropagação da amoreira-preta (Leitzke et al., 2009). Provavelmente os meios descritos acima não sejam adequados para multiplicação *in vitro* de explantes da cv. Brazos. Em contrapartida, no meio de cultura Knudson houve menor formação de calos na base dos explantes e conseqüentemente, melhor desempenho dessas brotações e melhor enraizamento *in vitro*.

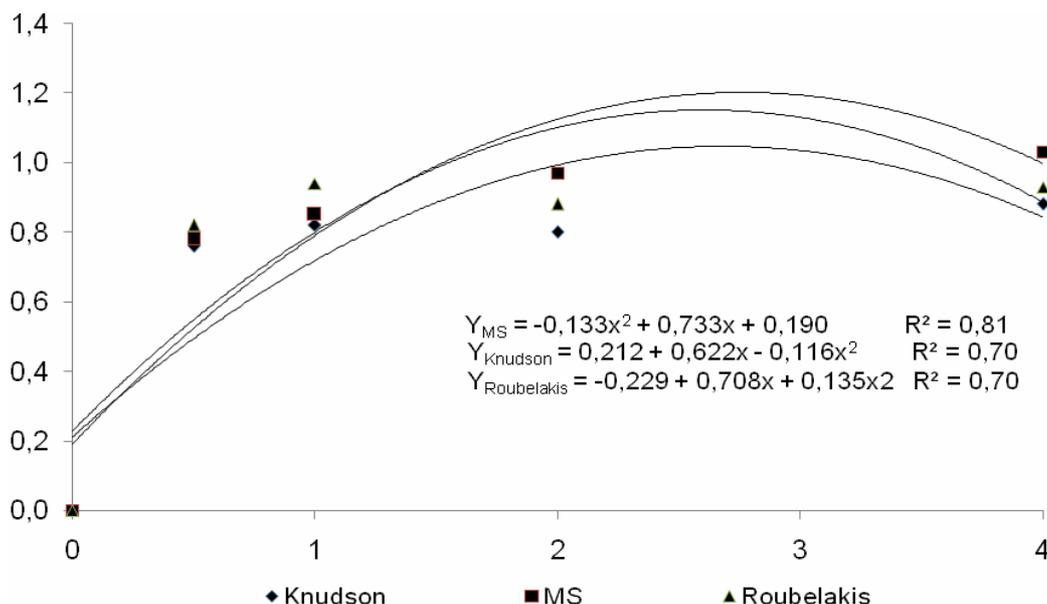


FIGURA 4 - Massa fresca da parte aérea (g) de amoreira-preta cv. Brazos, em diferentes meios de cultura, adicionados de concentrações de BAP (ácido 6-benzilaminopurina). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Experimento 2

Verificou-se interação significativa para as variáveis analisadas em todas concentrações de AIB e meios de cultura empregados no estudo com a cv. Tupy. Nas Tabelas 4, 5, 6, observam-se os

dados obtidos na avaliação feita 70 dias após a inoculação, relacionando-se o comprimento da parte aérea e das raízes de amoreira-preta cv. Tupy com os respectivos meios de cultura e concentrações de BAP e AIB.

TABELA 4 - Comprimento da parte aérea (cm) de amoreira-preta cv. Tupy cultivada em diferentes meios de cultura, adicionados de concentrações de AIB (ácido indolbutírico). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Meios de cultura	AIB (mg dm ⁻³)				
	0	0,125	0,25	0,5	1,0
MS	1,34 b*	1,47 b	1,38 b	1,47 b	1,72 a
Knudson	1,31 b	1,05 c	1,16 c	1,36 b	1,49 b
Roubelakis	1,07 c	1,20 c	1,45 b	1,61 b	1,56 b
NN	1,89 a	1,84 a	1,72 a	1,90 a	1,90 a

*Médias seguidas por letras minúsculas distintas diferem entre si na linha, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

TABELA 5 - Comprimento de raízes (cm) de amoreira-preta cv. Tupy cultivada em diferentes meios de cultura, adicionados de concentrações de AIB (ácido indolbutírico). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Meios de cultura	AIB (mg dm ⁻³)				
	0	0,125	0,25	0,5	1,0
MS	1,28 a*	0,86 b	1,51 a	1,47 a	1,33 a
Knudson	1,61a	1,49 a	0,78 b	1,28 a	1,31 a
Roubelakis	0,86 b	1,33 a	0,86 b	0,84 b	0,78 b
NN	1,27 a	1,18 a	1,36 a	1,43 a	1,43 a

*Médias seguidas por letras minúsculas distintas diferem entre si na linha, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

TABELA 6 - Comprimento de raízes (cm) de amoreira-preta cv. Brazos cultivada em diferentes meios de cultura, adicionados de concentrações de BAP (ácido 6-benzilaminopurina). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Meios de cultura	BAP (mg dm ⁻³)				
	0	0,125	0,25	0,5	1,0
MS	0	0,5	1,0	2,0	4,0
Knudson	---	1,60 a	1,62 a	1,58 a	1,57 a
Roubelakis	---	0,92 b	0,71 b	0,97 b	0,84 b

*Médias seguidas por letras minúsculas distintas diferem entre si na linha, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Maior comprimento da parte aérea (Figura 5) foi verificado em meio NN adicionado ou não de AIB (Tabela 4), sugerindo que a concentração desse meio em relação aos outros testados é ideal para o crescimento e desenvolvimento da parte

aérea de plantas de amoreira-preta cv. Tupy. O efeito da composição dos meios de cultura sobre o desenvolvimento de frutíferas já foi constatado também por diversos autores (Roubelakis-Angelakis & Zivanovitch, 1991; Nali et al., 2005).

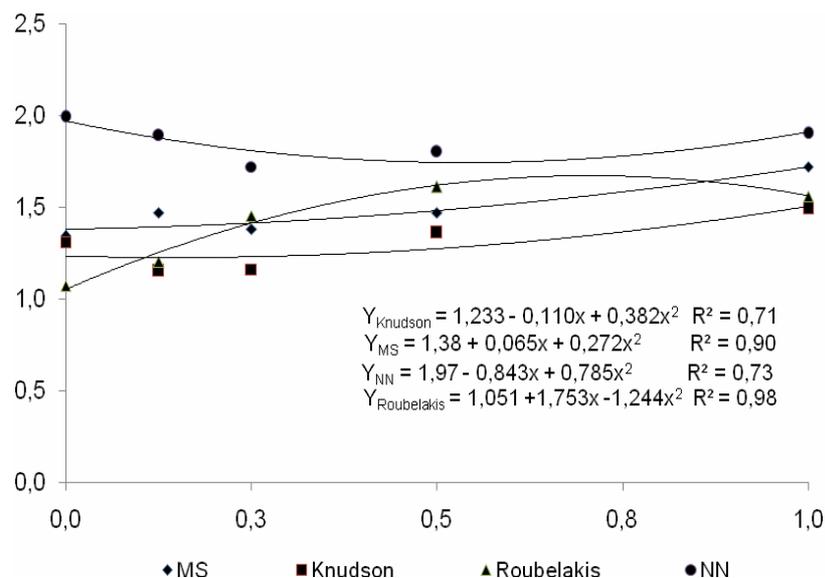


FIGURA 5 - Comprimento da parte aérea (cm) de amoreira-preta cv. Tupy, em diferentes meios de cultura, adicionados de concentrações de AIB (ácido indolbutírico). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Os resultados aqui apresentados para as duas cultivares corroboram Erig et al. (2002), que afirmaram que, nas concentrações de 0 e 1 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ de AIB, o aumento nos níveis de BAP resultou na diminuição do comprimento médio das brotações *in vitro* da cv. Tupy. Elevados níveis de citocinina no meio de cultura podem ser tóxicos à cultura, caracterizada pelo demasiado enroscamento e falta de alongamento das culturas (Leshem et al., 1988).

Foi observada a formação do sistema radicular das plantas em todos os meios empregados, porém melhores resultados na ausência de AIB deu-se nos meios Knudson, NN e MS (Figura 6). Resultados semelhantes foram observados com a adição de 0,5 mg dm^{-3} do regulador. Com outras concentrações do fitohormônio, o meio de cultivo que se destacou foi o MS.

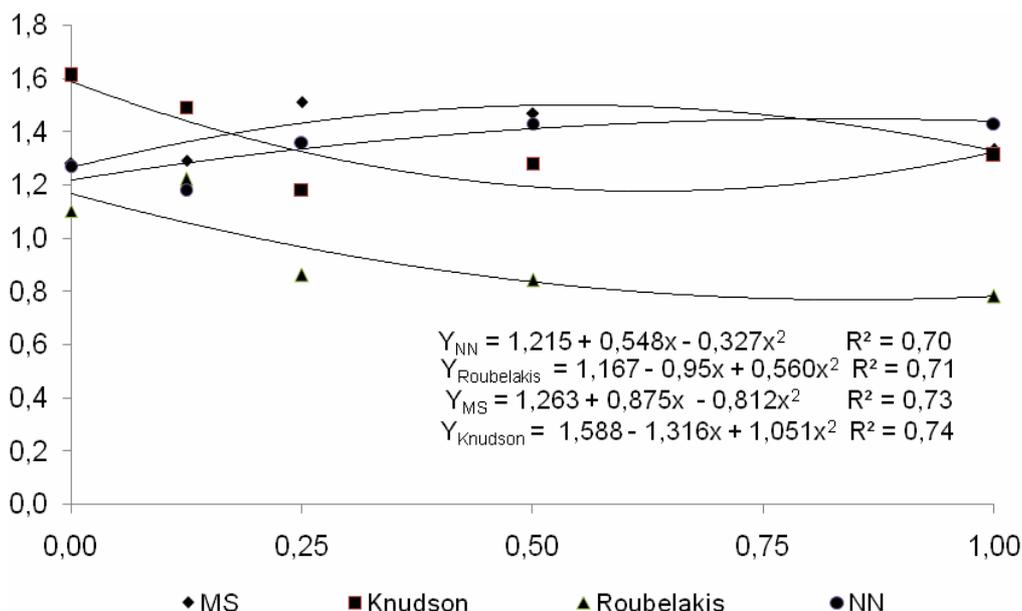


FIGURA 6 - Comprimento de raízes (cm) de amoreira-preta cv. Tupy, em diferentes meios de cultura, adicionados de concentrações de AIB (ácido indolbutírico). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Mesmo na ausência de AIB observou-se que os meios de cultura tiveram papel importante no crescimento do sistema radicular, sendo que os meios MS, Knudson e NN não diferem estatisticamente (Tabela 5).

Erig et al. (2002) obtiveram melhor enraizamento de amoreira-preta adicionando 0,1 mg dm^{-3} de ácido indolbutírico (AIB) ao meio MS, promovendo a formação de mudas bem desenvolvidas. Isto, provavelmente, se deve ao fato de se utilizarem diferentes genótipos, os quais respondem melhor à adição de auxina ao meio de cultivo. Provavelmente, a cultivar Tupy apresenta quantidade de auxina endógena suficiente para estimular o enraizamento, não respondendo, portanto, à adição de auxina exógena (Wu et al., 2009).

Diversas espécies, principalmente as herbáceas, enraízam com níveis muito reduzidos de auxina ou em meio básico sem substâncias de crescimento (Vejsadová, 2008). Nesse caso, as partes aéreas em rápido crescimento são fontes de

intensa produção de auxina, a qual é translocada para a base, estimulando a rizogênese.

Para a massa fresca da parte aérea, os meios de cultura utilizados na micropropagação de amoreira-preta não diferiram entre si estatisticamente com a adição de 0,125 mg dm^{-3} de AIB. Na ausência desse regulador, os meios que se destacaram foram o NN, MS e Knudson. Com a adição de 0,25 e 0,5 mg dm^{-3} de AIB, melhores resultados no peso fresco da parte aérea foram obtidos em meios MS, NN e Roubelakis.

Menores valores para essa variável foram obtidos em meio Knudson com 1,0 mg dm^{-3} de AIB. Esse meio, por ser mais diluído que os meios empregados na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta, fornece menor quantidade de nutrientes essenciais ao desenvolvimento dos explantes, mesmo com a adição do fitorregulador.

CONCLUSÕES

A utilização de 2 mg dm^{-3} de BAP promove maior número de brotos de amoreira-preta cultivar Brazos. Melhores resultados para biomassa da

parte aérea de 'Brazos' foram observados em meio MS. Maior número e comprimento de raízes foram verificados nos meios MS e Roubelakis adicionados de 0,5 mg dm⁻³ de BAP. Menor formação de calos de 'Brazos' ocorreu em meio de cultura Knudson.

Maior comprimento da parte aérea e número de raízes de 'Tupy' foram obtidos nos meios NN e

MS, com a adição de 0,5-1 mg dm⁻³ de AIB. Para o sistema radicular de 'Tupy', os meios que se destacaram foram o Knudson, MS e NN, sem a presença da auxina. Com 1 mg dm⁻³ de AIB adicionada em meio Roubelakis obteve-se maior biomassa da parte aérea de 'Tupy'.

REFERÊNCIAS

1. ANTUNES, L. E. C. Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil. **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, p. 151-158, 2002.
2. ANTUNES, L. E. C. et al. Blossom and ripening periods of blackberry varieties in Brazil. **Journal of the American Pomological Society**, v. 54, n. 4, p. 164-168, 2000.
3. ERIG, A. C.; DE ROSSI, A.; FORTES, G. R. L. 6-benzilaminopurina e ácido indolbutírico na multiplicação *in vitro* da amoreira-preta (*Rubus idaeus* L.), cv. Tupy. **Ciência Rural**, v. 32, n. 5, p. 765-770, 2002.
4. 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.
5. FORNI, R. C.; PASQUAL, M. Influência da citocinina BAP e concentrações dos componentes do meio "MS" na micropropagação do café 'Catuaí'. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 20, n. 4, p. 468-474, 1996.
6. GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. 1. ed. Eversley: Exegetics, 1984. 709 p.
7. GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C. et al. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA/CNPq, 2004. p. 183-260.
8. GRIMALDI, F. et al. Enraizamento *in vitro* de frutíferas da família Rosaceae. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 7, n. 2, p. 160-168, 2008.
9. KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, v. 14, n. 1, p. 214-217, 1946.
10. LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Meios de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 582-587, 2009.
11. LESHEM, B.; WERKER, E.; SHALEV, D. P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany**, v. 62, n. 3, p. 271-276, 1988.
12. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
13. NALI, L. R.; ALMEIDA, W. A. B.; MELO, N. F. Propagação *in vitro* de videiras. **Magistra**, v. 17, n. 2, p. 96-100, 2005.
14. NITSCH, J. P.; NITSCH, C. Haploids plants from pollen grains. **Science**, v. 163, n. 3862, p. 85-87, 1969.
15. OLIVEIRA, P. D. **Propagação in vitro de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzlev.) cv. Orange Reagen**. 1994. 116 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1994.
16. PAIVA, P. D. O. et al. Propagação *in vitro* de glaxínia. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 3, n. 2, p. 29-41, 1997.
17. ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A.; ZIVANOVITC, S. B. A new culture medium for *in vitro* rhizogenesis of grapevine (*Vitis* spp.) genotypes. **HortScience**, v. 26, n. 12, p. 1551-1553, 1991.
18. VEJSADOVÁ, H. Growth regulator effect on *in vitro* regeneration of rhododendron cultivars. **Horticultural Science**, v. 35, n. 2, p. 90-94, 2008.
19. VILLA, F. et al. Micropropagação da amoreira-preta (*Rubus* spp.) e efeito de substratos na aclimatização de plântulas. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 28, n. 1, p. 47-53, 2006.
20. VILLA, F. et al. Crescimento *in vitro* de amoreira-preta: efeitos de reguladores de crescimento e da cultivar. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 6, p. 1754-1759, 2008.
21. WU, J. H. et al. Factors affecting the efficiency of micropropagation from lateral buds and shoot tips of *Rubus*. **Planta Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 99, n. 1, p. 17-25, 2009.

Recebido em: 02/06/2009

Aceito em: 18/11/2009

