

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAULO MAURICIO CENTENARO BUENO

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE ESPÉCIES DE AMOREIRA-VERDE (*Rubus erythroclados* Martius e *Rubus brasiliensis* Martius)

CURITIBA

2015

PAULO MAURICIO CENTENARO BUENO

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE ESPÉCIES DE AMOREIRA-VERDE
(*Rubus erythroclados* Martius e *Rubus brasiliensis* Martius)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. Luiz Antônio Biasi
Co-orientador: Dr. Mauro Brasil Dias Tofanelli

CURITIBA

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL



PARECER

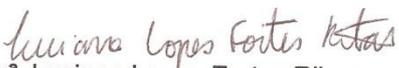
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO, apresentada pelo candidato **PAULO MAURICIO CENTENARO BUENO**, sob o título "PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE ESPÉCIES DE AMOREIRA-VERDE (*Rubus erythroclados* Martius e *Rubus brasiliensis* Martius)", para obtenção do grau de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Tese.

Curitiba, 28 de janeiro de 2015.


Professor Dr. Cícero Deschamps
Coordenador do Programa


Dr^a. Claudine Maria de Bona
Primeira Examinadora


Professora Dr^a. Luciana Lopes Fortes Ribas
Segunda Examinadora


Professora Dr^a. Giovana Bonfim de Alcântara
Terceira Examinadora


Professor Dr. Mauro Brasil Dias Tofaneli
Quarto Examinador


Professor Dr. Luiz Antonio Biasi
Presidente da Banca e Orientador

DEDICO

Aos meus pais José Antônio e Rita de Cácia, e irmãos Cássio e Emanuel, que são os maiores incentivadores desse importante passo em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar sempre meu caminho, minhas decisões, e pela proteção.

Ao meu orientador, Dr. Luiz Antônio Biasi, por aceitar esse desafio, pelas orientações, ajudas e apoio mesmo durante as suas férias.

Ao professor Dr. Mauro, pela ajuda e parceria nos trabalhos realizados.

Às colegas Vanessa, Caroline, Cassiana e Gabriely, pela amizade criada durante o doutorado, e por toda a ajuda nos trabalhos de laboratório, que foram de fundamental importância. Ao colega Vitor Spader pela parceria em diversos trabalhos. Aos colegas Gilberto Medeiros, Mario, João, Tales, Felipe, Guilherme, Marcelle, Jessica e Beбето, e ao técnico Carlos pela amizade e parceria.

Ao professor Bespa e demais integrantes, pelos convites para o futebol de terça-feira, que de fundamental importância contribuíram para o relaxamento e reorganização das ideias.

À minha namorada Kamari, que chegou a vir a Curitiba para me ajudar em alguns trabalhos, e sempre estava ao meu lado, apoiando e incentivando.

Aos meus colegas de trabalho e alunos do IFPR, que compreenderam minhas necessidades de readaptação de horários de trabalho para conseguir concluir meu doutorado.

A todas as pessoas que, de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho.

BIOGRAFIA DO AUTOR

PAULO MAURICIO CENTENARO BUENO, filho de José Antônio Bueno e Rita de Cácia Centenaro Bueno, nasceu em Palmas, Estado do Paraná, no primeiro dia de julho de 1985.

Ingressou na Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), no curso de Agronomia no ano de 2003, pela qual recebeu o título de Engenheiro Agrônomo no ano de 2008.

Trabalhou de 2008 até 2010 no extinto Centro Universitário Católico do Sudoeste do Paraná (UNICS) como professor dos cursos de Tecnologia Agroflorestal e Agronomia.

Cursou mestrado de 2009 a 2011, e ainda em 2011 ingressou no doutorado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, no Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da Universidade Federal do Paraná.

No mesmo período do mestrado, atuou como pesquisador bolsista do CNPq em um projeto de pesquisa no município de Palmas, no Estado do Paraná, vinculado ao Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI-PR) e ao Serviço Social da Indústria (SESIPR).

Atuou como professor do curso de Agronomia na Faculdade Campo Real nos anos de 2012 e 2013, e ainda em 2013 começou a atuar como professor do curso de Agronomia no Instituto Federal do Paraná – Campus Palmas, onde trabalha até o momento.

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE ESPÉCIES DE AMOREIRA-VERDE (*Rubus erythroclados* Martius e *Rubus brasiliensis* Martius)

RESUMO

Devido ao potencial econômico e à dificuldade encontrada por produtores para a produção de mudas de duas espécies de amoreira-verde (*Rubus brasiliensis* Martius e *Rubus erythroclados* Martius), o presente trabalho foi realizado com o objetivo de estabelecer métodos eficientes para a produção de mudas das mesmas. No decorrer do trabalho, foi observado que ambas as espécies são de difícil enraizamento. Para a espécie *R. erythroclados*, que apresentou grande dificuldade de enraizamento nos testes preliminares com estaquia, foram realizados diversos experimentos de micropropagação, onde foram testadas diversas concentrações de benzilaminopurina (BAP) para a multiplicação *in vitro*, e de ácido indolbutírico (AIB) para o enraizamento *in* e *ex vitro*. Dessa forma, pôde-se concluir que a espécie é dependente de BAP para a multiplicação *in vitro*, sendo que as concentrações de 5 e 10 μM foram as que proporcionaram as maiores taxas de multiplicação (superiores a três brotos por explante), quando comparadas com a testemunha, que não apresentou a formação de novos brotos. O enraizamento *ex vitro* de *R. erythroclados* sem o uso de AIB foi mais eficiente (95,8%) do que *in vitro* (0,0%). Já para a espécie *R. brasiliensis*, foram realizados experimentos de estaquia caulinar e radicial. Foi avaliada a influência de cinco concentrações de AIB, em cinco datas de coleta de estacas caulinares ao longo do ano, sendo constatado que o enraizamento desta espécie é dependente de AIB, apesar das porcentagens de enraizamento terem sido muito baixas, inferiores a 16%. Quanto à estaquia radicial, concluiu-se que a técnica não foi eficiente para a propagação da espécie, mesmo com o uso de ácido naftalenoacético (ANA) nas concentrações de 0, 2.500 e 5.000 mg L^{-1} e diversos diâmetros de estacas (2,5 mm, 5,0 mm, 7,5 mm, 10 mm e 12,5 mm). Sendo assim, foi observado que a espécie apresenta dificuldade de enraizamento, sendo necessária a realização de outros estudos de estaquia e micropropagação para aumentar a eficiência da estaquia.

Palavras-chave: Estaquia, micropropagação, pequenas frutas, auxina, citocinina.

VEGETATIVE PROPAGATION OF GREENBERRY SPECIES (*Rubus erythroclados* Martius and *Rubus brasiliensis* Martius.)

ABSTRACT

Due to the economic potential of greenberry species, and the difficulty faced by farmers to their propagation, two greenberry species (*Rubus brasiliensis* Martius and *Rubus erythroclados* Martius) were used in order to establish efficient methods for the cuttings production of these species. During the work, we observed that both species are difficult to root. For *R. erythroclados* species, which had great difficulty in rooting in the preliminary work with cuttings, were conducted several experiments of micropropagation, in which were tested different concentrations of benzylaminopurine (BA) for *in vitro* multiplication, and indolebutyric acid (IBA) for rooting, *in* and *ex vitro*. Thus, it was concluded that this species is dependent on BAP for *in vitro* multiplication, and the concentrations 5 and 10 μM were the ones with best multiplication rates (higher than 3 shoots per explant), when compared to the control, that did not show new shoots formation. The *ex vitro* rooting without IBA of *R. erythroclados*, was more effective (95.8%) than *in vitro* (0.0%). However, for the *R. brasiliensis* species, stem and radicial cutting experiments were carried out. There were evaluated the influences of five IBA concentrations in five stem cuttings collection dates throughout the year, and it was found that the rooting of this species is dependent on AIB, although the rooting percentages were very low, less than 16%. Regarding to the radicial cuttings, it is concluded that the technique is not efficient for the propagation of *R. brasiliensis* species, even with the use of naphthaleneacetic acid (NAA) under the concentrations of 0, 2.500 and 5.000 mg L^{-1} and different diameters of the cuttings (2.5 mm, 5.0 mm, 7.5 mm, 10 mm and 12.5 mm). Thus, it was observed that the species is difficult to root, requiring further studies on cutting and micropropagation to increase the efficiency of cutting.

Keywords: Cuttings, micropropagation, small fruit, auxin, cytokinin.

LISTA DE FIGURAS

FIGURE 1 - PERCENTAGE OF ROOTING AND PERCENTAGE OF LIVING PLANTS WITHOUT ROOTS (A), MEAN NUMBER OF ROOTS PER PLANT AND ROOT LENGTH (B) OF GREENBERRY (*Rubus erythroclados*) CULTIVATED IN MS MEDIUM WITH DIFFERENT INDOLEBUTYRIC ACID CONCENTRATIONS..... 32

FIGURA 2 – ASPECTO DAS MICROESTACAS DE *Rubus erythroclados* SOB DIFERENTES TRATAMENTOS COM AIB DILUÍDO EM NaOH. CURITIBA, PR, 2014. a: CULTIVADO *IN VITRO*, TRATADO COM 0 mg L⁻¹ DE AIB; b: CULTIVADO *IN VITRO*, TRATADO COM 500 mg L⁻¹ DE AIB; c: CULTIVADO *IN VITRO*, TRATADO COM 1000 mg L⁻¹ DE AIB; d: CULTIVADO *IN VITRO*, TRATADO COM 1500 mg L⁻¹ DE AIB; e: CULTIVADO *EX VITRO*, TRATADO COM 0 mg L⁻¹ DE AIB; f: CULTIVADO *EX VITRO*, TRATADO COM 500 mg L⁻¹ DE AIB; g: CULTIVADO *EX VITRO*, TRATADO COM 1000 mg L⁻¹ DE AIB; h: CULTIVADO *EX VITRO*, TRATADO COM 1500 mg L⁻¹ DE AIB..... 45

FIGURA 3 – ASPECTO DAS ESTACAS DE *Rubus brasiliensis*, COLETADAS NO DIA 18 DE JUNHO DE 2014, E TRATADAS COM CINCO CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO INDOLBUTÍRICO (AIB). CURITIBA, PR, 2014. 1: 0 mg DE AIB.L⁻¹; 2: 1000 mg DE AIB.L⁻¹; 3: 2000 mg DE AIB.L⁻¹; 4: 3000 mg DE AIB.L⁻¹; 5: 4000 mg DE AIB.L⁻¹ 58

FIGURA 4 – ASPECTO DAS ESTACAS DE *Rubus brasiliensis* COM DIFERENTES DIÂMETROS. CURITIBA, PR, 2014. 1: 2,5 mm; 2: 5,0 mm; 3: 7,5 mm; 4: 10 mm; 5: 12,5 mm..... 63

LISTA DE TABELAS

TABLE 1 - AVERAGE NUMBER OF SHOOTS PER EXPLANT, HEIGHT OF THE HIGHEST SHOOT, LEAVES PER SHOOT, PERCENTAGE OF DEAD PLANTS, PERCENTAGE OF EXPLANTS WITH CALLUS, AND PERCENTAGE OF HYPERHYDRICITY SHOOTS FROM GREENBERRY (*Rubus erythroclados*) CULTIVATED IN MS MEDIUM WITH DIFFERENT 6-BENZYLAMINOPURINE CONCENTRATIONS..... 31

TABLE 2 – AVERAGES OF THE SHOOTS PER EXPLANT, SHOOT HEIGHT, NUMBER OF LEAVES PER SHOOT, AND PERCENTAGE OF HYPERHYDRICITY SHOOTS OF GREENBERRY (*Rubus erythroclados*) CULTIVATED IN MS MEDIUM WITH DIFFERENT CONCENTRATIONS OF BENZYLAMINOPURINE IN THE TWO SUBCULTURES. 31

TABELA 3 - NÚMERO DE BROTO, ALTURA DO MAIOR BROTO, NÚMERO DE FOLHAS POR BROTO, PORCENTAGEM DE EXPLANTES COM BROTAÇÕES, CALOS, HIPERIDRICIDADE, ENRAIZADOS, MORTALIDADE, E O NÚMERO DE RAÍZES OBSERVADOS EM EXPLANTES DE *Rubus erythroclados* TRATADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AIB E BAP, EM PRIMEIRO E SEGUNDO SUBCULTIVOS. CURITIBA, PR, 2014.... 41

TABELA 4 – ENRAIZAMENTO, COMPRIMENTO DA MAIOR RAIZ, NÚMERO DE FOLHAS POR PLANTA, MORTALIDADE E PORCENTAGEM DE FORMAÇÃO DE CALOS DE MICROESTACAS DE *RUBUS ERYTHROCLADOS* TRATADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AIB DILUÍDO EM DOIS TIPOS DE SOLUÇÃO, E ACONDICIONADAS *IN* E *EX VITRO*. CURITIBA, PR, 2014..... 44

TABELA 5 - PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO DE ESTACAS CAULINARES SEMILENHOSAS DE *Rubus brasiliensis* EM CINCO DATAS DE COLETA E TRATADAS COM CINCO CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO INDOLBUTÍRICO (AIB). CURITIBA, PR, 2014..... 56

TABELA 6 - PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO, NÚMERO DE RAÍZES POR ESTACA, COMPRIMENTO DE RAÍZES, PORCENTAGEM DE ESTACAS VIVAS, MORTAS, COM BROTAÇÕES E ALTURA DOS BROTO FORMADOS POR ESTACAS RADICIAIS DE *Rubus brasiliensis* COM DIFERENTES DIÂMETROS. CURITIBA, PR, 2014. 62

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
2. REFERÊNCIAS	16
3. MICROPROPAGATION OF GREENBERRY (<i>Rubus erythroclados</i>)	19
ABSTRACT.....	19
RESUMO.....	20
3.1. INTRODUCTION.....	21
3.2. MATERIAL AND METHODS.....	22
3.3. RESULTS AND DISCUSSION.....	24
3.4. CONCLUSIONS.....	27
3.5. LITERATURE CITED	27
4. MULTIPLICAÇÃO E ENRAIZAMENTO <i>IN VITRO</i> E <i>EX VITRO</i> DE AMOREIRA-VERDE (<i>Rubus erythroclados</i>)	33
RESUMO	33
4.1. INTRODUÇÃO	35
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.2.1. Multiplicação.....	36
4.2.2. Enraizamento.....	37
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.3.1. Multiplicação.....	39
4.3.2. Enraizamento.....	42
4.4. CONCLUSÕES.....	45
4.5. REFERÊNCIAS.....	46
5. PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE <i>Rubus brasiliensis</i> POR ESTAQUIA CAULINAR E RADICIAL	49
RESUMO	49
5.1. INTRODUÇÃO	51
5.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.4. CONCLUSÕES.....	64
5.5. REFERÊNCIAS.....	64
6. CONCLUSÕES GERAIS	67
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68

1. INTRODUÇÃO GERAL

As regiões brasileiras que apresentam períodos de inverno marcante e pequenas propriedades agrícolas são apontadas como grandes potenciais para a produção de frutíferas de clima temperado. Entre essas frutíferas, destaca-se a amoreira, que não necessita de insumos na sua produção, tendo o cultivo orgânico como uma boa opção (ANTUNES, 2002).

As frutas de amoreira-verde são ricas em compostos antioxidantes (LIMA et al., 2012), e este é um dos fatores que vêm contribuindo para o aumento do mercado consumidor. Em contrapartida, a estrutura frágil e a alta atividade respiratória das amoras prejudicam a sua conservação pós-colheita (MOTA, 2006), e esse é um dos fatores que prejudicam a expansão da cultura.

Suas frutas com coloração verde e sabor agradável chamaram a atenção da população regional e revelaram seu potencial de comercialização, junto às demais pequenas frutas. Frutas de amoreira-preta, espécie similar às amoreiras verdes, podem ser consumidas *in natura*, ou utilizadas na fabricação de geléias e doces caseiros, tratando-se de alternativas para as famílias no ecoturismo regional (ANTUNES, 2002).

A espécie *Rubus erythroclados* Martius é nativa dos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Trata-se de um subarbusto lenhoso com aproximadamente 2 m de altura com folhas compostas por três folíolos. É uma erva ruderal, encontrada em diversas regiões, normalmente em beira de matas, sub-bosques, próximo a mananciais, em locais rochosos e em diferentes altitudes e desenvolve-se em locais abertos ou sombrios (SOUSA, 1998).

A espécie *Rubus brasiliensis* Martius é um arbusto perene ou bienal que pode atingir até 2,5 m de altura, ramos secundários arqueados e recobertos por tricomas glandulares e seríceos e acúleos ligeiramente curvos ou retrorsos. Suas folhas jovens apresentam três folíolos, enquanto que as plantas adultas apresentam cinco. Seus frutos maduros apresentam coloração clara. Essa espécie é encontrada em diferentes regiões e locais, especialmente em orlas de capões, próximas a mananciais, áreas devastadas como invasoras de culturas e de terrenos baldios, em altitudes de 600 a 1.500 m (SOUSA, 1998).

A espécie *R. erythroclados* possui potencial de consumo de frutos *in natura*, ou os mesmos podem ser utilizados na confecção de sucos e geléias, além do uso como planta ornamental e cerca-viva. Todas as partes do vegetal podem ser utilizadas para diversas enfermidades, tais como combate ao colesterol, contra cólicas intestinais e estomacais, como diurético e males bucais, sendo utilizada como chá, infusão, compressa, entre outros (MARQUESINI, 1995).

Os frutos de *R. brasiliensis* são comestíveis e ricos em açúcar e altamente energéticos. Podem ser utilizados para o preparo de geléias e sucos de sabor agradável. Suas raízes e folhas também são utilizadas como substância diurética e laxativa (PIO CORRÊA, 1984).

Marquesini (1995) cita que tribos indígenas do Paraná e Santa Catarina utilizam folhas de *R. brasiliensis* Mart. para fazer chás e infusões para o combate da celulite, para emagrecimento, combate ao colesterol e ainda como abortivo, quando utilizado em altas concentrações.

Considerando a inexistência de trabalhos publicados com a propagação das espécies em questão, o embasamento teórico do presente trabalho foi realizado utilizando materiais referentes a outras espécies relacionadas, como a framboeseira e a amoreira-preta. Essa deficiência de informações é um dos fatores que prejudicam a expansão do cultivo da amoreira-preta.

A propagação das amoreiras é realizada por estacas radiciais, as quais são obtidas durante o repouso vegetativo das plantas, durante o inverno (CALDWELL, 1984). Também são utilizados perfilhos retirados das entrelinhas de cultivo, os quais geralmente apresentam tamanhos irregulares, além de sua remoção poder causar estresse no sistema radicial da planta-mãe (ANTUNES, 2002).

Segundo Peruzzo et al. (1995), a multiplicação rápida de mudas de amoreira-preta pode ser realizada pelo enraizamento de estacas herbáceas sob nebulização, preparadas com quatro a cinco gemas. Isso permite que as mudas sejam produzidas durante todo o período de crescimento das plantas matrizes. Esse tipo de estacas pode ser utilizado com bons resultados, porém, com o inconveniente de retirar o material vegetativo de plantas matrizes durante a sua época reprodutiva.

Estacas lenhosas também podem ser utilizadas para a produção de mudas, visto que existe uma grande quantidade de material vegetal disponível após a poda de inverno (ANTUNES, 2002).

Vários fatores influenciam no enraizamento de estacas, como o genótipo, as condições fisiológicas da planta matriz, tipo de estaca, e as condições ambientais (MENZEL, 1985). O balanço hormonal da planta matriz também é um fator muito importante no enraizamento de estacas. O enraizamento de estacas é influenciado por auxinas, embora estas não sejam as únicas substâncias determinantes. Para equilibrar esse balanço hormonal, é indicada a utilização de fitorreguladores, com o objetivo de acelerar a formação de raízes, e aumentar o percentual de enraizamento (PASQUAL et al., 2001).

O regulador vegetal ácido indol butírico (AIB) é a auxina sintética mais utilizada na indução do enraizamento de estacas de várias espécies vegetais. Estimula a formação de raízes adventícias (PASQUAL et al., 2001), acelera a iniciação radicial, aumenta o número e a qualidade das raízes, e também aumenta a uniformidade do enraizamento (FACHINELLO et al., 1995). Segundo Pires e Biasi (2003), o AIB é provavelmente o melhor regulador vegetal de uso geral, por ser atóxico para a maioria das plantas, é muito efetivo para várias espécies e relativamente estável.

Maia e Botelho (2008), ao avaliarem o enraizamento de estacas lenhosas de amoreira-preta cv. Xavante sem a utilização do regulador vegetal AIB, observaram que nenhuma estaca apresentou raízes. Todavia, os mesmos autores obtiveram 60% de enraizamento utilizando 2000 mg L⁻¹ de AIB com a mesma cultivar. Villa et al. (2003) obtiveram os maiores percentuais de enraizamento da cv. Guarani (26,9%) com o tratamento de 1.321 mg L⁻¹, já a cv. Brazos não precisou do regulador para apresentar porcentagens de enraizamento superiores a 62%.

Outra alternativa viável é a cultura de tecidos, com o intuito de se obterem plantas livres de vírus, geneticamente uniformes e em curto espaço de tempo (SANTOS e RASEIRA, 1988). Porém, a elevada variabilidade de comportamento *in vitro* obriga a desenvolver condições específicas de cultivo, pois nem todas as espécies do gênero *Rubus* possuem grande eficiência de propagação *in vitro* (KISS e ZAKYTO, 1978).

Para cada espécie, cultivar e explante, o meio mais adequado e eficiente é variável, e de acordo com Leitzke et al. (2002), a definição do meio de cultura, o regulador e a sua concentração são imprescindíveis para o sucesso da propagação de culturas *in vitro*. Para determinar qual o melhor meio de cultura devem-se realizar diversos ensaios.

Graham et al. (1997) relatam que tem sido difícil o desenvolvimento de um sistema de regeneração eficiente e amplo em *Rubus* spp. Vários meios de cultura têm sido descritos para a regeneração, porém, com baixa eficiência ou eficientes para apenas alguns genótipos, geralmente aqueles com genes de *Rubus fruticosus* no seu genoma.

Dentre os reguladores de crescimento comumente utilizados no cultivo *in vitro* da amoreira-preta, estão a benzilaminopurina (BAP) e o ácido indol butírico (AIB) (DONNELLY e VIDAVER, 1984). A BAP é um regulador vegetal do grupo das citocininas, muito utilizadas por promover divisão, alongamento e diferenciação celular, retardar a senescência das plantas, promover a quebra da dominância apical, e induzir à proliferação de gemas axilares. Já o AIB pertence ao grupo das auxinas, conhecidas por induzirem o enraizamento adventício, promover a dominância apical, retardar a abscisão foliar, induzir a diferenciação vascular, entre outros (TAIZ e ZEIGER, 2013).

Uma etapa da micropropagação que necessita de muitos cuidados, como a manutenção de temperatura amena e alta umidade do ar é a aclimatização, devido à dificuldade de transferir com sucesso as plantas da condição *in vitro* para a casa-de-vegetação, e em seguida para o campo (FRÁGUAS, 2003).

Baseado no potencial econômico e na dificuldade encontrada por produtores para a produção de mudas das duas espécies de amoreira-verde, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de estabelecer métodos eficientes de propagação vegetativa das mesmas.

2. REFERÊNCIAS

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

CALDWELL, J. D. Blackberry propagation. **HortScience**, Alexandria, v.19, n.2, p.193-195, 1984.

DONNELLY, D. J.; VIDAVER, W. E. Physiological and anatomical transitions in tissue cultured raspberry. **Plant Physiology Supplement**, v.75, p.13, 1984.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E.; FORTES, G. R. L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2 ed. Pelotas: UFPel, 1995.

FRÁGUAS, C. B. **Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira Roxo de Valinhos em diferentes ambientes**. 2003. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

GRAHAM, J.; IASI, L.; MILLAM, S. Genotype-specific regeneration from a number of *Rubus* cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 48, n. 3, p.167-173, 1997.

KISS, F.; ZAKYTO, J. Vegetative propagation of *Rubus* species *in vitro*. **Botanikai Közlemenyek**, Budapest, p.65-69, 1978.

LEITZKE, L.N.; DAMIANI, C.R.; SCHUCH, M.W. Influência do meio de cultura, tipo e concentração de citocininas na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Ciência e Agrotecnologia**, v.34, n.2, p.352-360, 2010.

LIMA, K. P.; BUENO, P. M. C.; CUNHA, M. A. A.; RONCATI, R.; GIONGO, C. Physical-Chemical Characterization of the Green Mulberry Grown in Southwestern Paraná. World Congress of Food Science and Technology, Foz do Iguaçu, Parana, Brazil, 2012.

MAIA, A. J.; BOTELHO, R. V. Reguladores vegetais no enraizamento de estacas lenhosas da amoreira-preta cv. Xavante. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.29, n.2, p.323-330, abr./jun. 2008.

MARQUESINI, N. R. **Plantas usadas como medicinais pelos índios do Paraná e Santa Catarina, Sul do Brasil**. Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 361p., 1995.

MENZEL, C. M. Propagation of lychee: a review. **Scientia Horticulture**, v.25, n.1, p.31-48, 1985.

MOTA, R. V. Caracterização física e química de geléia de amora-preta. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n. 3, p.539-543, 2006.

PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; RAMOS, J. D.; VALE, M. R. do; SILVA, C. R. de R. e. **Fruticultura Comercial: propagação de plantas frutíferas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 137 p.

PERUZZO, E. L.; DAL BÓ, M. A.; PICCOLI, P. S. Amoreira-preta: variedades e propagação. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.8, n.3, p.53-55, 1995.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. v.1, Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro, 747p., 1984.

PIRES, E. J. P.; BIASI, L. A. Propagação da videira. In: POMMER, C. V. **Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, p.295-350, 2003.

SANTOS, A. M. dos; RASEIRA, M. do C. B. **Lançamento de cultivares de amoreira-preta**. Pelotas: EMBRAPA-CNPFT, 1988. (Embrapa - Informativo, 23).

SOUSA, R. C. de. **Revisão taxonômica das espécies de Rosaceae Jussieu nativas no Estado do Paraná-Brasil**. Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1998.

VILLA, F.; PIO, R.; CHALFUN, N. N. J.; GONTIJO, T. C. A.; DUTRA, L. F. Propagação de amoreira-preta utilizando estacas lenhosas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras v.27, n.4, p.829-834, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

3. MICROPROPAGATION OF GREENBERRY (*Rubus erythroclados*)

ABSTRACT

Rubus erythroclados is a Brazilian native species with green, sweet fruits that have great potential for fresh market and processing. However, this species is difficult to propagate, and there are no studies about its micropropagation. This study aimed to evaluate the multiplication and rooting of greenberry shoots treated with different concentrations of benzylaminopurine (BA) and indolebutyric acid (IBA). Nodal segments with a length of 0.5 cm and one bud were used as explants. After establishment in cultured medium MS, different BA concentrations were tested (1, 5 and 10 μM). In the multiplication stage, the experimental design was completely randomized, with four replications of twelve test tubes per plot. Two subcultures were performed to the same culture medium, every 60 days. The variables evaluated were the number of shoots per explant, the length of the largest shoot, the number of leaves per shoot, the percentage of dead explants, and the percentage of hyperhydricity of the shoots. The averages of the variables were submitted to an analysis of variance and Tukey's test at 5% probability using the statistical program Sisvar®. The rooting experiment utilized a completely randomized design, with four replications of twenty shoots per plot. The following concentrations of IBA were tested: 0, 3, 6 and 9 μM . After 60 days of culture, the percentage of rooted, dead and alive microcuttings; the number of roots per microcutting; the root length; the height of the plants; and the number of leaves per plant were observed. The average values were submitted to regression analysis using the statistical program Assistat®. The highest multiplication rate (>10) was observed in the culture medium supplemented with 10 μM BA. However, the percentage of hyperhydricity was very high at this concentration. The treatment without growth regulator resulted in only one shoot per explant. The maximum rooting of the microcuttings (48%), as estimated by the regression equation, was obtained with 5 μM IBA, and the highest number of roots was obtained with 5.8 μM IBA. Therefore, *Rubus erythroclados* can be multiplied in MS culture medium supplemented with 10 μM BA and rooted in MS culture medium supplemented with 5 μM IBA.

Keywords: benzylaminopurine, indolebutyric acid, rooting.

Micropropagação de amoreira-verde (*Rubus erythroclados*)

RESUMO

Rubus erythroclados é uma espécie nativa do Brasil com frutos verdes e doces, que têm um grande potencial para o mercado de produtos frescos ou processados. No entanto, é difícil de propagar, e não existem estudos sobre a micropropagação desta espécie. Este estudo teve como objetivo avaliar a multiplicação e enraizamento de segmentos nodais de amoreira-verde tratados com diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP) e ácido indolbutírico (AIB). Segmentos nodais com 0,5 cm de comprimento, com uma gema foram utilizados como explantes. Após o estabelecimento da cultura em meio MS, diferentes concentrações de BAP foram testadas (0, 5 e 10 μM). Na fase de multiplicação, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições de doze frascos por parcela. Dois subcultivos foram realizados para o mesmo meio de cultura, a cada 60 dias. As variáveis avaliadas foram: número de brotos por explante, comprimento do maior broto, número de folhas por broto, porcentagem de explantes mortos e de hiperidricidade. As médias das variáveis foram submetidas à análise de variância e ao teste de Tukey a 5% de probabilidade, pelo programa estatístico Sisvar®. O experimento de enraizamento foi instalado em um delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições de vinte frascos por parcela. As concentrações de 0, 3, 6 e 9 μM de AIB foram testadas. Após 60 dias de cultivo, foram observadas as variáveis porcentagem de microestacas enraizadas, mortas e vivas, o número médio de raízes por microestaca, o comprimento médio das três maiores raízes, a altura das plantas, e o número de folhas por planta. As médias foram submetidas à análise de regressão pelo programa estatístico Assistat®. A taxa de multiplicação mais elevada (> 10) foi observada no meio de cultura suplementado com 10 μM de BAP. No entanto, a porcentagem de brotações hiperídricas foi muito elevada nesta concentração. O tratamento sem regulador de crescimento resultou em apenas um broto por explante. A equação de regressão estimou que o valor máximo de enraizamento de microestacas (48%) foi obtido com a concentração de 5 μM de AIB, e que o maior número de raízes pode ser obtido com uma concentração de 5,8 μM do regulador. Portanto, *Rubus erythroclados* pode ser multiplicada em meio de cultura MS suplementado com 10 μM BAP e enraizada em meio de cultura MS suplementado com 5 μM de AIB.

Palavras-chave: benzilaminopurina, ácido indolbutírico, enraizamento.

3.1. INTRODUCTION

Foods with nutritional and therapeutic properties are being increasingly demanded by consumers due to consumers' increased purchasing power and their desire for a healthier diet. Greenberry is a native plant from South Brazil, and its occurrence is most common in natural grasslands and mixed ombrophilous forests (Cordeiro et al., 2011). Its fruits, with their green color and pleasant flavor, caught the attention of the regional population and demonstrated its marketing potential with other small fruits. There are two species of greenberry, *Rubus brasiliensis* and *Rubus erythroclados*.

The relevance of this work involves the need for information about how to propagate the species (*Rubus erythroclados*), considering that there are few published studies about its propagation and that producers have been unable to produce such plants. The theoretical basis of this study was obtained from similar studies with related species of the genus *Rubus*.

Vegetative propagation by cutting is one of the most feasible methods for blackberry propagation (Maia and Botelho, 2008), considering that there is a large amount of propagative material due to summer and winter pruning (Campagnolo and Pio, 2012). However, the successful application of these methods of vegetative propagation is limited by the territorial extension, and the rooting is not always satisfactory (Busby and Himelrick, 1999). Furthermore, Bueno and Biasi (2012) report that rooting of softwood cuttings of greenberry (*Rubus erythroclados*) was low, about 37% using 2.000 or 4.000 mg L⁻¹ IBA.

Another alternative for *Rubus* propagation is tissue culture by micropropagation, which yields genetically uniform plants in a short period (Santos and Raseira, 1998; Reed et al., 2004; George, 2008) that are virus, fungi and nematode-free (EPPO, 2004). However, there is high variability in the behavior of different species, and not all species of the genus *Rubus* have a high *in vitro* propagation rate (Debnath, 2003; Kiss and Zakyto, 1978). For each species, cultivar and explant, the most appropriate and efficient culture medium

varies, and several tests should be performed to determine the best medium (Brum, 2001).

The growth regulators commonly used in blackberry tissue culture include 6-benzylaminopurine (BA) and indolebutyric acid (IBA) (Donnelly and Vidaver, 1984, Lazic and Ruzic, 2007).

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* multiplication and rooting capacity of nodal segments of greenberry (*Rubus erythroclados*) when treated with different BA and IBA concentrations.

3.2. MATERIAL AND METHODS

Two experiments were performed, with the first aiming to multiply and the second aiming to root the nodal segments of the greenberry.

The multiplication experiment started on March 5, 2012. The mother plants, which served as propagative material, were grown in a greenhouse. These mother plants were one and a half year old, and immediately after collection, the plant material was placed in a vessel with water.

Nodal segments from the greenberry (*Rubus erythroclados*) with a length of 0.5 cm (one bud) were used. The plant material was washed three times with water and detergent and then sterilized for 30 seconds in a solution of ethanol 70% (v/v). The propagating material was also immersed in sodium hypochlorite 0.5% (v/v) for ten minutes. After sterilization, the material was washed three times with autoclaved water in a laminar flow hood, and each nodal segment was placed in a bottle with its respective treatment into the culture medium.

The culture medium used was MS (Murashige and Skoog, 1962), and its pH was adjusted to 5.8 using a few drops of sodium hydroxide 0.1 N before the addition of 6g L⁻¹ agar-agar (VETEC[®]) and sterilization. For the preparation of the culture medium, deionized water was used.

The bottles used had a diameter of 3 cm and a height of 7.4 cm, and 10 mL of the culture medium was added to each bottle. The bottles were then sealed with aluminum foil and sterilized in an autoclave at a temperature of 120°C and a pressure of 1.5 atm for 20 minutes.

The experimental design was a single independent variable with three levels of BA. The design was completely randomized with three treatments, four replications, and ten explants per plot. The treatments were 0, 5 and 10 μM BA.

The bottles were sealed with plastic film, identified according to the corresponding treatment, and placed in a growth chamber, which automatically controlled temperature and photoperiod. The temperature was maintained at $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ light intensity and the photoperiod was 16 hours.

After 60 days of isolation, the experiment was evaluated, observing the following variables: the number of shoots per explant that could be individualized as microcuttings, the height of the highest shoot, the number of leaves per shoot, the percentage of dead explants, and the percentage of hyperhydricity. The variable number of shoots per microcutting represents the multiplication rate achieved during the isolation period because it shows how many new shoots the initial microcutting produced during the growing period.

During the evaluation of this experiment, each microcutting was subcultured, resulting in a repetition of the same experiment, but with only two treatments, considering the low rate of the multiplication of explants in the treatment without BA. The shoots originated in each treatment were used to begin the subculture of the same treatment. After 55 days, the subculture was evaluated using the same variables as in the first evaluation. After evaluating the first subculture, the subculture was repeated again, and the same parameters were analyzed after another 55 days.

Both subcultures utilized a completely randomized design with a split plot in time, and samples were submitted to the Bartlett's test to verify the homogeneity of variances before the analyses of variance. Averages were analyzed by Tukey's test at 5% probability using the statistical program Assistat® (Silva and Azevedo, 2009).

The rooting experiment started on August 21, 2012, and the propagative material (microcuttings) was obtained from the plants of the multiplication experiment from the treatment with 5 μM BA. However, all plant material was subcultured twice on MS medium without a growth regulator to eliminate the cumulative effect of this regulator in the rooting experiment.

The experiment had a single independent variable, with four concentrations of indolebutyric acid (IBA). The experimental design was completely randomized, with four treatments, four replications, and twenty bottles per plot. The treatments were 0, 3, 6 and 9 μM IBA.

The bottles were sealed and placed under the same conditions as those of the previous experiment. The evaluation was performed after 60 days.

The analyzed variables were the percentage of rooted microcuttings, the number of roots per microcutting, the root length, the percentage of living microcuttings without roots, the height of the shoots, the number of leaves per plant, and the percentage of dead explants.

3.3. RESULTS AND DISCUSSION

In the first evaluation of the multiplication experiment, the use of the growth regulator BA promoted the highest shoot formation, regardless of the concentration, compared with the control, which had an average production of one shoot per explant (TABLE 1). These findings indicate a strong apical dominance. Debnath (2004) observed a similar behavior with dwarf raspberry, with the explants on regulator-free medium producing only one shoot each and with this number increasing with the addition of cytokinin. Similar results were obtained by Augusto (2001), who evaluated the effect of the same concentrations of BA (5 and 10 μM) with the blackberry cultivar 'Brazos' and showed 4.4 and 4.3 shoots at concentrations of 5 and 10 μM , respectively. Debnath (2007) obtained the highest number of shoots per explant using 8.9 μM BA compared with 4.4 and 13.3 μM in the micropropagation of three wild clones of cloudberry (*Rubus chamaemorus*). Fira et al. (2010) obtained the highest multiplication rate using 3.11 μM BA, and reduction of the BA concentration to 1.33 μM reduced the multiplication rate, but decreased the shoot length.

Culture medium with 10 μM BA resulted in shoots that were significantly taller than those obtained in the control but shorter than those obtained by the treatment with 5 μM . The mean number of leaves per shoot obtained in the 5

μM was higher than control, and did not statistically differ from 10 μM . For two of three cloudberry wild clones tested by Debnath (2007), the highest number of leaves per shoot was obtained with 8.9 μM BA. For the other clone, the author obtained the higher value with 4.4 μM of the growth regulator.

The treatment with the highest BA concentration (10 μM) showed the lowest percentage of dead plants, and the other treatments (0 and 5 μM) showed significantly similar percentages. This result may be occurred because, according to Taiz and Zeiger (2013), BAP promotes cell division and delays the senescence of plants by promoting the breaking of the apical dominance and induce the proliferation of axillary buds.

The use of BA promoted plant hyperhydricity because this behavior was not observed in the treatment without the regulator. Treatments with 5 and 10 μM of BA gave the highest percentages of hyperhydric plants that did not differ significantly. Hyperhydricity is generally known to occur easily in liquid media (Preil, 2005) due to the high water potential of leaves (Paek et al., 1991), especially when there are cytokinins in the media (Gaspar, 1991).

The combined analysis of the two subcultures is presented in TABLE 2 – . The treatment with the highest concentration of BA (10 μM) resulted in the highest average number of shoots per explant and the highest percentage of hyperhydric shoots in both subcultures. The *in vitro* multiplication of blackberry 'Xavante' and raspberries 'Heritage' and 'Batum' on MS medium with 15 μM BA was more efficient than on MS medium with 0, 7.5 and 22.5 μM BA (Leitzke et al., 2010).

The percentage of hyperhydricity was higher in the first subculture than in the second (Table 2). This difference seems to have occurred because the best shoots were selected to be used in the second subculture after the evaluation of the first subculture results. Another possibility is that the plant material may have been better adapted to this concentration in the second subculture. Debnath (2007) showed that the process of hyperhydricity was reversible in cloudberry and that the quality of the shoots could be significantly improved after performing subcultures with BA and GA_3 .

The number of shoots per explant was not significantly different between the two subcultures. The height of the shoots in the first subculture was higher with the concentration of 10 μM of BA compared with 5 μM . In the second

subculture, however, the BA concentration did not affect this variable. Martinussen et al. (2004) observed that an increment in the BAP concentration from 4.4 to 44.4 μM increased the number of shoots of cloudberry cv. Apollen from 6 to 9.8 (in combination with 5.4 μM NAA) and from 6.8 to 12.2 (in combination with 53.7 μM NAA), respectively.

The average number of leaves per shoot was significantly similar in both subcultures, although in the first subculture, the BA concentration did not affect the number of leaves per shoot. In the second subculture, the concentration of 5 μM provided a higher number of leaves per shoot compared with the concentration of 10 μM of the growth regulator.

The interaction between the BA concentrations and the subculture did not significantly affect the percentage of dead explants. This characteristic was only affected by the subculture, considering that in the first subculture, the number of dead explants was eight times higher (17.8) than in the second subculture, regardless of the BA concentration.

Figure 1 presents the results of the regression analysis using the variables of the percentage of rooting, the percentage of living plants without roots, the plant height, the number of roots per plant, and the root length.

The growth regulator IBA, when applied at concentrations of 3 and 6 μM , provided the highest percentage of rooting compared with 9 μM and the control. The maximum rooting of the microcuttings (48%), as estimated by the regression equation, was obtained with the concentration of 5 μM IBA. The plant response of growth regulator is variable, depending on the genotype. Thus, Poncetta et al. (2012) obtained the highest number of rooted shoots using 0.98 μM of either IBA or IAA compared with the control (with values of 2.46, 4.93 and 9.85 μM , respectively).

In a study on red raspberry, Najaf-Abadi and Hamidoghli (2009) observed that the rhizogenic activity of IBA was confirmed, compared with the control, because the addition of the growth regulator had a significant effect on the number of roots produced and the root length. Their results showed that an IBA concentration of 9.85 μM produced a greater number of roots and the maximum root length compared with concentrations of 0, 2.46 or 4.93 μM . Donnelly et al. (1980) reported that MS medium with 2.46 – 3.45 μM IBA was the best medium for the rooting of *Rubus* sp. shoots. In a study on blackberry

cv. Cacanska Bestrna, Ruzic and Lazic (2006) achieved 100% rooting after 21 days on the medium, regardless of the treatment. Debnath (2004) also obtained 95% rooting of dwarf raspberries in regulator-free culture medium.

The percentage of living plants without roots (Figure 1) was higher in the control treatment compared with the other treatments.

The highest number of roots was obtained with 5.8 μM IBA. In contrast, the root length was higher in the control than in all of the IBA concentrations. In a study on blackberry cv. Tupi using three concentrations of IBA, 1.48, 2.46 and 3.94 μM , Bobrowski et al. (1996) obtained the highest average root length using 3.94 μM IBA. However, no significant difference was observed in the cultivars Ebano and Guarany. With raspberry, however, Poncetta et al. (2012) observed that the minimum root length and the least number of rooted shoots were produced when the levels of IBA were increased from 2.46 to 9.85 μM .

3.4. CONCLUSIONS

Rubus erythroclados can be multiplied in MS culture medium supplemented with 10 μM BA and rooted in MS culture medium supplemented with 5 μM IBA.

3.5. LITERATURE CITED

- Augusto, C.S.S. 2001. Micropropagação da amoreira-preta cv. Brazos. 85p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Bobrowski, V.L., Mello-Farias, P.C. and Peters, J.A. 1996. Micropropagation of blackberries (*Rubus* sp.) cultivars. Revista Brasileira de Agrociência, 2:17-20.

- Brum, G.R. 2001. Micropropagação da figueira (*Ficus carica* L.) 'Roxo de Valinhos'. 41p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Bueno, P.M.C. and Biasi, L.A. 2012. Propagação de amoreira-verde por meio de estacas semi-lenhosas com uso de ácido indol-butírico. XXII Cong. Bras. Fruticultura, p. 5685-5688. Bento Gonçalves, RS, Brasil.
- Busby, A.L. and Himelrick, D.V. 1999. Propagation of blackberries (*Rubus* sp.) by stem cuttings using various IBA formulation. *Acta Hort.*, 505:327-332.
- Campagnolo, M.A. and Pio, R. 2012. Enraizamento de estacas caulinares e radiculares de cultivares de amoreira-preta coletadas em diferentes épocas, armazenadas a frio e tratadas com AIB. *Ciência Rural*, 42:232-237.
- Cordeiro, J., Roderjan, C.V. and Rodrigues, W.A. 2011. Plantas lenhosas da Floresta Ombrófila Mista do Parque Municipal das Araucárias – Guarapuava (PR). *Ambiência*, 7:441-460.
- Debnath, S.C. 2003. Micropropagation of small fruits. In: Jain, S.M. and Ishii, K. *Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands, p.465-506.
- Debnath, S.C. 2004. Clonal propagation of dwarf raspberry (*Rubus pubescens* Raf.) through *in vitro* axillary shoot proliferation. *Plant Growth Regulation*, 43:179-186.
- Debnath, S.C. 2007. A two-step procedure for *in vitro* multiplication of cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) shoots using bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 88:185-191.
- Donnelly, D.J. and Vidaver, W.E. 1984. Physiological and anatomical transitions in tissue cultured raspberry. *Plant Physiology Supplement*, 75:13.
- Donnelly, D.J., Stace-Smith, R. and Mellor, F.C. 1980. *In vitro* culture of three *Rubus* species. *Acta Hort.*, 112:69-76.
- EPPO. European and Mediterrean Plant Protection Organization. 2004. Certification schemes; pathogen-tested material of *Rubus*. Paris: EPPO. 9p.
- Fira, A., Clapa, D. and Plopa, C. 2010. New aspects regarding the micropropagation of blackberry cultivar 'thornless' evergreen'. *Bulletin UASVM Horticulture*, 67:106-114.

- Gaspar, T. 1991. Vitrification in micropropagation. p.116-126. In: Bajaj, Y.P.S. (ed.), *Biotechnology in agriculture and forestry, high-tech and micropropagation I*, Vol. 1, Springer, Berlin.
- George, E.F. 2008. Plant tissue culture procedure – background. p.1-28. In: George, E.F., Hall, M.A. and Klerk, G.J. (eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture*, 3rd edition, Vol. 1, Springer, The Netherlands.
- Kiss, F. and Zakyto, J. 1978. Vegetative propagation of *Rubus* species *in vitro*. *Botanikai Közlemények*, 65:65-69.
- Lazic, T. and Ruzic, D. 2007. Organogenesis *in vitro* from the leaf of blackberry cv. Cacanska Bestrna. *Genetika*, 39:69-78.
- Leitzke, L.N., Damiani, C.R. and Schuch, M.W. 2010. Influência do meio de cultura, tipo e concentração de citocininas na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. *Ciência e Agrotecnologia*, 34:352-360.
- Maia, A.J. and Botelho, R.V. 2008. Reguladores vegetais no enraizamento de estacas lenhosas da amoreira-preta cv. Xavante. *Semina: Ciências Agrárias*, 29:323-330.
- Martinussen, I., Nilsen, G., Svenson, L., Junntila, O. and Rapp, K. 2004. *In vitro* propagation of cloudberry (*Rubus chamaemorus*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78:43-49.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-479.
- Najaf-Abadi, A.J. and Hamidoghli, Y. 2009. Micropropagation of thornless trailing blackberry (*Rubus* sp.) by axillary bud explants. *Australian Journal of Crop Science*, 3:191-194.
- Paek, K.Y., Han, B.H. and Choi, S.L. 1991. Physiological, biochemical and morphological characteristics of vitrified shoot regenerated *in vitro*. *Korean Journal of Plant Tissue Culture*, 18:151-162.
- Poncetta, P., Grisenti, M. and Giongo, L. 2012. An *In Vitro* Propagation and Regeneration System for *Rubus* Germplasm. *Acta Hort.*, 946:129-134.
- Preil, W. 2005. General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture. p.1-18. In: Hvosllef-Eide, A.K. and Preil, W. (eds.), *Liquid culture system for in vitro plant propagation*. Springer, The Netherlands.

- Reed, B.M., Engelmann, F., Dulloo, M.E. and Engels, J.M.M. 2004. Technical guidelines for the management of field and *in vitro* germplasm collections. IPGRI Handbooks for Genebanks, no.7. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Ruzic, D. and Lazic, T. 2006. Micropropagation as means of rapid multiplication of newly developed blackberry and black currant cultivars. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 71:149-153.
- Santos, A.M. and Raseira, M.C.B. 1998. Lançamento de cultivares de amoreira-preta. Pelotas: EMBRAPA-CNPFT. (Embrapa - Informativo, 23).
- Silva, F.A.S. and Azevedo, C.A.V. 2009. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. 7^o World Congress On Computers In Agriculture, American Society of Agricultural and Biological Engineers, Reno-NV-USA.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 2013. *Fisiologia vegetal*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 918p.

TABLE 1 - AVERAGE NUMBER OF SHOOTS PER EXPLANT, HEIGHT OF THE HIGHEST SHOOT, LEAVES PER SHOOT, PERCENTAGE OF DEAD PLANTS, PERCENTAGE OF EXPLANTS WITH CALLUS, AND PERCENTAGE OF HYPERHYDRICITY IN SHOOTS OF GREENBERRY (*Rubus erythroclados*) CULTIVATED IN MS MEDIUM WITH DIFFERENT 6-BENZYLAMINOPURINE CONCENTRATIONS.

BA (μM)	Shoot per explant	Height (cm)	Leaves per shoot	Dead explants (%)	Hyperhydricity (%)
0	1.00 b	0.64 c	1.92 b	66.6 a	0.00 b
5	3.72 a	2.10 a	4.70 a	43.6 a	64.17 a
10	3.07 a	1.57 b	3.29 ab	5.9 b	87.05 a
CV (%)	39.70	18.55	21.99	46.69	32.33

Means within columns followed by different lowercase letters are significantly different (Tukey's test at a 5% significance level).

TABLE 2 – AVERAGES OF THE SHOOTS PER EXPLANT, SHOOT HEIGHT, NUMBER OF LEAVES PER SHOOT, AND PERCENTAGE OF HYPERHYDRICITY IN SHOOTS OF GREENBERRY (*Rubus erythroclados*) CULTIVATED IN MS MEDIUM WITH DIFFERENT CONCENTRATIONS OF BENZYLAMINOPURINE IN THE TWO SUBCULTURES.

Subculture	5 μM	10 μM	
Shoots per explant			
1 ^o	6.52 aB	11.82 aA	
2 ^o	4.51 aB	12.94 aA	
C.V. (%)	Plot = 32.09	Subplot = 12.88	
Shoot height (cm)			
1 ^o	1.74 aB	2.48 aA	
2 ^o	1.69 aA	1.50 bA	
C.V. (%)	Plot = 16.22	Subplot = 13.78	
Leaves per shoot			
1 ^o	4.80 aA	5.87 aA	
2 ^o	5.99 aA	4.61 aB	
C.V. (%)	Plot = 22.88	Subplot = 14.33	
Hyperhydricity (%)			
1 ^o	62.58 aB	85.59 aA	
2 ^o	35.28 bB	48.08 bA	
C.V. (%)	Plot = 3.69	Subplot = 5.99	
Dead explants (%)			
1 ^o	19.1	16.4	17.8 a
2 ^o	2.3	1.9	2.1 b
C.V. (%)	Plot = 57.20	Subplot = 32.51	

Means within columns followed by different lowercase letters and within rows followed by different uppercase letters are significantly different (Tukey's test at a 5% significance level).

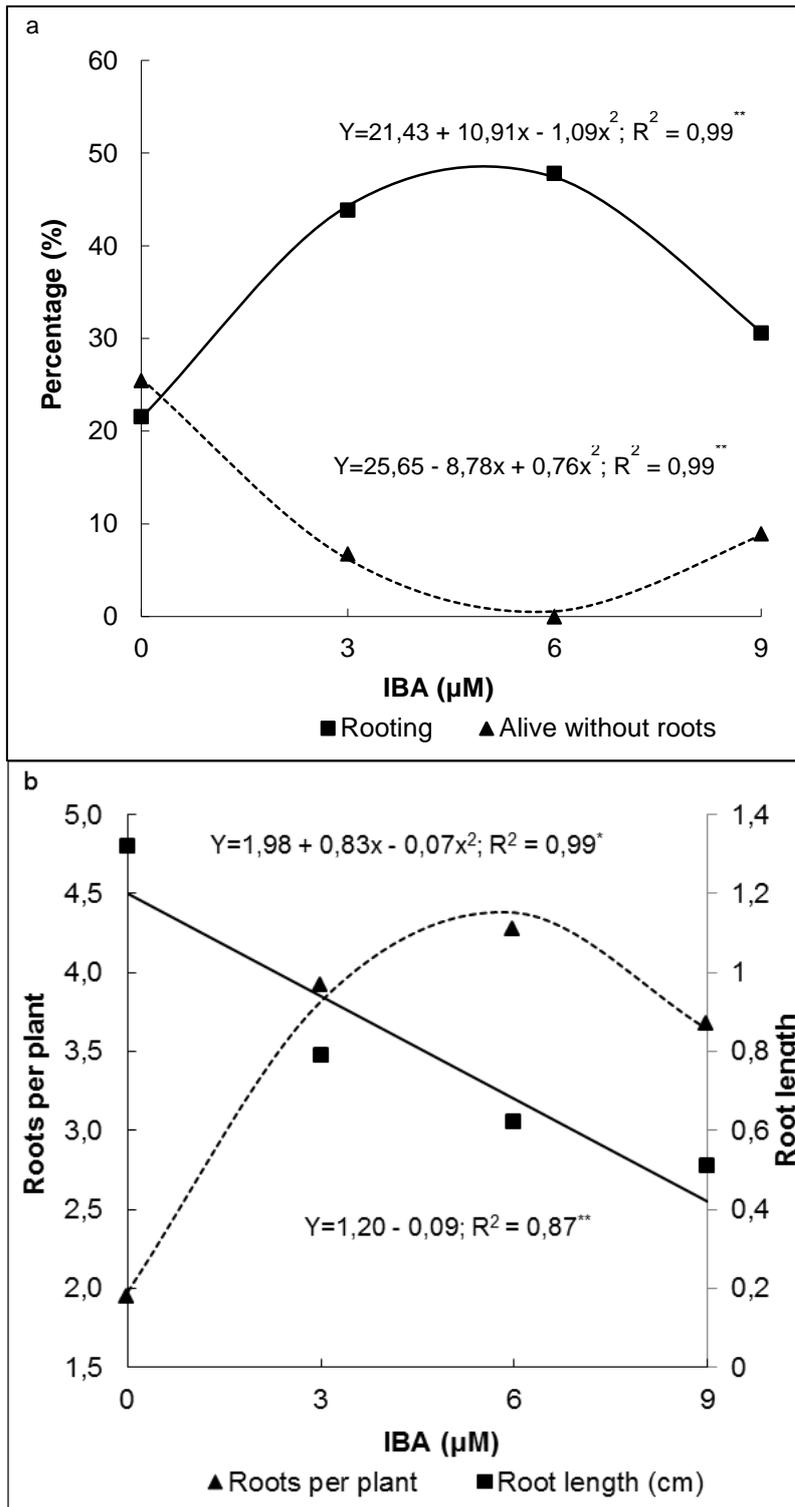


FIGURE 1 - PERCENTAGE OF ROOTING AND PERCENTAGE OF LIVING PLANTS WITHOUT ROOTS (A), MEAN NUMBER OF ROOTS PER PLANT AND ROOT LENGTH (B) OF GREENBERRY (*Rubus erythroclados*) CULTIVATED IN MS MEDIUM WITH DIFFERENT INDOLEBUTYRIC ACID CONCENTRATIONS.

4. MULTIPLICAÇÃO E ENRAIZAMENTO *IN VITRO* E *EX VITRO* DE AMOREIRA-VERDE (*Rubus erythroclados*)

RESUMO

No presente trabalho foi avaliada a multiplicação, o enraizamento e a aclimatização da amoreira-verde (*Rubus erythroclados*). Na multiplicação *in vitro* foram testadas combinações entre benzilaminopurina (BAP), nas concentrações de 0, 5 e 10 μM e ácido indolbutírico (AIB), nas concentrações de 0, 3 e 6 μM . O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial, sendo que as mesmas variáveis foram avaliadas em dois subcultivos subsequentes. A concentração de 5 μM de BAP apresentou uma das maiores taxas de multiplicação de explantes, porém, também foi um dos tratamentos que resultou em uma maior porcentagem de hiperidricidade das plantas, em ambos os subcultivos, todavia, essa característica foi revertida posteriormente, no experimento de enraizamento. No experimento de enraizamento, foram comparados o enraizamento *in* e *ex vitro* aliados à imersão rápida durante dez segundos das microestacas em soluções de AIB sob concentrações de 0, 500, 1000 e 1500 mg L^{-1} . No trabalho *in vitro*, as microestacas tratadas com suas respectivas soluções foram plantadas em frascos com meio de cultura MS e mantidas em sala de crescimento. Já no trabalho *ex vitro*, as microestacas tratadas com suas respectivas soluções foram plantadas em bandejas com vermiculita de granulometria média como substrato, e mantidas em casa-de-vegetação com sistema de nebulização intermitente. As plantas apresentaram enraizamento satisfatório (superior a 95%) quando cultivadas *ex vitro*, na ausência de tratamento com regulador vegetal, sendo que esse ambiente também proporcionou o desenvolvimento de plantas com maior número de raízes por microestaca e também uma menor mortalidade de microestacas. Conclui-se que a multiplicação de *Rubus erythroclados* é dependente da adição de BAP ao meio de cultura, sendo que a concentração de 5 μM foi a que proporcionou uma das maiores taxas de multiplicação e que o enraizamento *ex vitro* da amoreira-verde foi mais eficiente que *in vitro*, sendo que o AIB é dispensável para essa finalidade.

Palavras-chave: Micropropagação, aclimatização, auxina, citocinina.

MULTIPLICATION AND *IN VITRO* AND *EX VITRO* ROOTING OF GREENBERRY (*Rubus erythroclados*)

ABSTRACT

In the present study we evaluated the multiplication, rooting and acclimatization of greenberry (*Rubus erythroclados*). In the *in vitro* multiplication, there were tested combinations between benzylaminopurine (BA) under concentrations of 0, 5 and 10 μM , and indolebutyric acid (IBA) in concentrations of 0, 3 and 6 μM . The design was completely randomized in a factorial arrangement, whereas the same parameters were evaluated in two subsequent subcultures. The concentration of 5 μM of BA presented one of the highest explants multiplication rates, however, was also one of the treatments that resulted in a higher percentage of hyperhydricity, in both subcultures, however, this characteristic was reversed later in the rooting work. In the rooting experiment, we compared the *in* and *ex vitro* rooting combined to the fast microcutting immersion for ten seconds in IBA concentrations of 0, 500, 1000 and 1500 mg L^{-1} . In the *in vitro* work, the microcuttings treated with their respective solutions were planted in bottles with MS medium and maintained in a growth room. In the *ex vitro* work, the microcuttings treated with their respective solutions were planted in boxes with vermiculite as substrate and maintained in a greenhouse with intermittent mist system. The plants had a satisfactory rooting (over 95%) in the *ex vitro* environment in the absence of treatment with growth regulators, and this environment also enabled the development of plants with the highest number of roots per microcutting, and also a lower mortality. Finally, we concluded that the multiplication of *Rubus erythroclados* is dependent on the addition of BA to the culture medium, considering that the concentration of 5 μM proportioned one of the highest multiplication rates and that the greenberry *ex vitro* rooting was more efficient than *in vitro*, whereas IBA is dispensable for this purpose.

Keywords: Micropropagation, acclimatization, auxin, cytokinin.

4.1. INTRODUÇÃO

A amoreira-verde (*Rubus erythroclados*) é uma planta nativa de regiões de pastagens naturais e Floresta Ombrófila Mista do sul do Brasil (CORDEIRO et al., 2011). Seus frutos de coloração verde, altos teores de açúcares e sabor agradável chamaram a atenção da população regional, e revelaram seu potencial de comercialização juntamente com as demais pequenas frutas.

Considerando a dificuldade encontrada para a propagação da espécie em estudos preliminares e a ausência de estudos publicados sobre sua propagação, foi realizado o presente trabalho.

Plantas de amoreira-preta podem ser propagadas por estaquia de raízes, estaquia caulinar (MAIA e BOTELHO, 2008; CAMPAGNOLO e PIO, 2012) e por cultura de tecidos (REED et al., 2004; GEORGE, 2008), sendo esta última a forma mais segura para evitar a contaminação por fungos, bactérias, nematoides e vírus (EPPO, 2004), além de possibilitar a obtenção de plantas geneticamente uniformes em um curto espaço de tempo (REED et al., 2004; GEORGE, 2008). No entanto, a grande variabilidade de comportamento *in vitro* nos obriga a desenvolver condições de cultivo específicas, pois nem todas as espécies do gênero *Rubus* têm alto potencial de propagação *in vitro* (DEBNATH, 2003). Para cada espécie, cultivar e explante, existe um meio de cultura mais adequado e eficiente, e para determinar o melhor, vários testes devem ser realizados (BRUM, 2001).

Entre os reguladores vegetais mais utilizados na cultura de tecidos de amoreira-preta, estão a benzilaminopurina (BAP) e o ácido indolbutírico (AIB) (DONNELLY e VIDAVER, 1984; LAZIC e RUZIC, 2007). O enraizamento das microestacas pode tanto ser realizado *in vitro*, como já é amplamente utilizado (DENG e DONNELLY, 1993) quanto *ex vitro*, diretamente em substrato (JIN et al., 1992; AUGUSTO et al., 2006). Este último apresenta como vantagens a diminuição de dificuldades relacionadas à sobrevivência e ao desenvolvimento das plantas cultivadas *in vitro* (SOBCZYKIEWICZ, 1992) e também a redução de custos.

O objetivo do presente trabalho foi estabelecer um protocolo de micropropagação de amoreira verde, utilizando diferentes concentrações dos reguladores vegetais BAP e AIB.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação de Plantas, e os *ex vitro*, na casa-de-vegetação do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, localizados na cidade de Curitiba – PR.

4.2.1. Multiplicação

O meio de cultura utilizado foi o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e com a concentração de reguladores vegetais respectiva a cada tratamento. O pH da solução foi ajustado para 5,8 antes da adição de 6 g L⁻¹ de ágar-ágar (VETEC®) e da esterilização, utilizando hidróxido de sódio 0,1 N.

Após o preparo, o meio de cultura foi colocado em frascos com 9 cm de altura e 6 cm de diâmetro, contendo aproximadamente 30 mL de meio de cultura, estes foram selados com tampa de polipropileno e filme plástico, esterilizados em autoclave a 120°C e pressão de 1,5 atm durante 20 minutos.

Os tratamentos utilizados foram: T1: 0 µM de AIB e 0 µM de BAP; T2: 0 µM de AIB e 5 µM de BAP; T3: 0 µM de AIB e 10 µM de BAP; T4: 3 µM de AIB e 0 µM de BAP; T5: 3 µM de AIB e 5 µM de BAP; T6: 3 µM de AIB e 10 µM de BAP; T7: 6 µM de AIB e 0 µM de BAP; T8: 6 µM de AIB e 5 µM de BAP; T9: 6 µM de AIB e 10 µM de BAP.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial (3 x 3), sendo três concentrações de AIB, três concentrações de

BAP, com quatro repetições, e 12 explantes por parcela experimental, totalizando 432 explantes.

Os explantes utilizados são oriundos de multiplicação em três subcultivos *in vitro* com concentração de 5 μM de BAP, e para eliminar completamente os efeitos do regulador vegetal, foram submetidos a dois subcultivos com meio MS livre de reguladores vegetais. Cada explante foi composto por uma gema lateral com um par de folhas. Após serem colocados nos frascos, os explantes foram fechados com tampa de polipropileno e vedados com filme plástico e colocados em sala de crescimento com luz fluorescente branca fria, com irradiância de 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Os explantes resultantes da primeira avaliação foram utilizados na repetição do mesmo experimento, em forma de subcultivo, onde os explantes de cada tratamento foram utilizados no mesmo tratamento, sendo que o referido trabalho foi avaliado dois meses após a instalação.

As variáveis analisadas foram o número de brotos por explante com no mínimo 0,3 cm, altura do maior broto, número de folhas por broto, porcentagem de explantes oxidados, porcentagem de hiperidricidade, porcentagem de explantes com formação de calos, porcentagem de explantes com raízes e número de raízes por explante enraizado.

4.2.2. Enraizamento

Os experimentos foram conduzidos seguindo um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 4x2, sendo quatro concentrações de AIB (T1: 0 mg L^{-1} , T2: 500 mg L^{-1} , T3: 1000 mg L^{-1} , T4: 1500 mg L^{-1}) e dois ambientes (*in* e *ex vitro*).

Cada parcela experimental foi constituída por 12 microestacas, sendo que, *in vitro* as estacas foram acondicionadas em frascos de 9 cm de altura e 6 cm de diâmetro, com aproximadamente 30 mL de meio de cultura, com 6 microestacas por frasco, e portanto, dois frascos por parcela experimental. O meio de cultura, assim como a sala de crescimento utilizados no enraizamento

in vitro foram os mesmos utilizados nos experimentos de multiplicação, e na parte de enraizamento *ex vitro*, as microestacas foram acondicionadas em bandejas de poliestireno expandido com 128 células, contendo vermiculita expandida de granulometria média como substrato.

As microestacas são oriundas da multiplicação *in vitro* em meio contendo 5 μM de BAP, e para tentar eliminar os efeitos do regulador vegetal, foram submetidos a dois subcultivos com meio MS livre de reguladores vegetais.

Cada microestaca foi mantida com quatro folhas e aproximadamente um centímetro de altura. A base de cada microestaca foi tratada com a solução respectiva a seu tratamento, durante dez segundos, e em seguida, acondicionada em seu respectivo local, de acordo com o ambiente. As microestacas do ambiente *in vitro* foram acondicionadas em sala de crescimento sob as mesmas condições do experimento de multiplicação, e as microestacas mantidas *ex vitro* foram levadas à casa-de-vegetação, a qual possui refrigeração e umidade controlada, próximo a 95%.

Como no decorrer do primeiro experimento as microestacas apresentaram uma elevada oxidação, provavelmente devido à solução hidroalcoólica (50% v/v) utilizada para a dissolução do referido regulador vegetal, foi realizado o segundo experimento, mudando-se apenas a solução utilizada para dissolver o AIB. Portanto, no segundo experimento foram usadas gotas de NaOH (1N), e o restante da solução foi completado com água deionizada, e o pH da solução foi regulado para 7 (em ambos os experimentos).

Aos 69 dias da instalação, os experimentos foram avaliados, e as seguintes variáveis foram analisadas: porcentagem de microestacas enraizadas, número de raízes por planta, comprimento médio da maior raiz, porcentagem de microestacas vivas e sem raízes, crescimento médio das plantas, número de folhas por planta, porcentagem de microestacas mortas e porcentagem de microestacas com calo (inclusive aquelas que enraizaram).

As médias obtidas foram submetidas ao teste de Bartlett, para verificar se existe homogeneidade nas variâncias, e posteriormente submetidos à análise de variância pelo Teste de Scott-Knott, através do programa estatístico Assistat®.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Multiplicação

O uso de BAP na concentração de 5 μM foi suficiente para se obter uma das maiores taxas de multiplicação de explantes (superior a quatro brotos por explante), sendo que na sua ausência, a multiplicação não ocorre. O uso de AIB é dispensável para a multiplicação, embora a sua presença diminua significativamente a hiperidricidade.

Essas respostas foram observadas tanto no primeiro quanto no segundo subcultivo, como pode ser observado na Tabela 3. Debnath (2004) também observou a formação de apenas um broto por explante em meio sem citocininas para a multiplicação de framboeseira anã (*Rubus pubescens*), sendo que este número aumentou com a adição do referido regulador vegetal, e Erig et al. (2002) relataram que a concentração de 5,1 μM de BAP foi a que promoveu a maior taxa de multiplicação de amoreira-preta cv. Tupy, e que esta também pode ser multiplicada *in vitro* sem a adição de AIB no meio de cultura, como foi observado no presente trabalho. Já Oliveira et al. (2008), utilizando a concentração de 3,56 μM de BAP, obtiveram uma taxa média de multiplicação de 6,2 brotos por explante de sete cultivares de amoreira-preta em seis subcultivos.

A concentração de 5 μM de BAP também proporcionou o maior crescimento dos brotos em ambos os cultivos avaliados, porém, o referido regulador vegetal não interferiu isoladamente no número de folhas formadas pelos brotos no primeiro cultivo, enquanto que essa resposta foi diferente no segundo, onde a ausência do regulador não permitiu a formação de novos brotos.

A ausência de reguladores, assim como a presença isolada de BAP não induziram a formação de calos, sendo que no primeiro cultivo, apenas a maior

concentração de AIB isolada (6 μM) ocasionou a formação de calos. Já no segundo cultivo, o uso isolado de ambos os reguladores vegetais não ocasionou a formação de calos, sendo que os mesmos só foram formados com a combinação de 3 μM de AIB e 5 μM de BAP. Nos demais tratamentos, a formação de calos não foi observada. A ausência de calos é importante para evitar a ocorrência de variação somaclonal (OLIVEIRA et al., 2000).

Com a avaliação do primeiro cultivo foi possível observar que o AIB, além de não promover a hiperidricidade do material vegetal, acaba reduzindo esse efeito quando o mesmo é associado ao BAP, sob qualquer concentração. Quando BAP foi utilizada isoladamente, proporcionou mais de 80% de hiperidricidade. Já no segundo cultivo, esse efeito de BAP diminuiu pela metade, mas ainda é observado. Essa redução pode ter ocorrido pelo fato de ocorrer a seleção das melhores plantas para a instalação do segundo subcultivo, e essas plantas podem ser mais resistentes ao efeito tóxico do regulador vegetal. Por outro lado, Oliveira et al. (2008) observaram, em sete cultivares de amoreira-preta durante seis subcultivos, que a hiperidricidade aumentou a cada subcultivo.

O uso isolado de AIB a 3 μM foi o que proporcionou as maiores porcentagens de enraizamento, tanto no primeiro (68,7%) quanto no segundo cultivo (8,5%). A diferença expressiva na porcentagem de enraizamento dos dois cultivos pode ser devido ao explante, considerando que os tratamentos foram os mesmos, para ambos os cultivos. O tratamento com AIB a 3 μM também proporcionou uma das maiores médias de raízes por explante, em ambos os cultivos.

Na Tabela 3 pode-se observar que qualquer uma das concentrações de BAP utilizadas ocasionou redução da mortalidade dos explantes, ao mesmo tempo em que estimularam a brotação dos mesmos. Isso pode ser devido ao fato de que as citocininas promovem a divisão, o alongamento e a diferenciação celular, e também são responsáveis por retardar a senescência das plantas (TAIZ e ZEIGER, 2013).

TABELA 3 - NÚMERO DE BROTOS, ALTURA DO MAIOR BROTO (CM), NÚMERO DE FOLHAS POR BROTO, PORCENTAGEM DE EXPLANTES COM CALOS, HIPERIDRICIDADE, ENRAIZADOS, MORTALIDADE, E NÚMERO DE RAÍZES OBSERVADOS EM EXPLANTES DE *Rubus erythrolados* TRATADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AIB E BAP, EM PRIMEIRO E SEGUNDO SUBCULTIVOS. CURITIBA, PR, 2014.

Primeiro cultivo						Segundo cultivo							
BAP						BAP							
AIB	0	5	10			AIB	0	5	10				
Brotos por explante						Brotos por explante							
0	1,03	aB	4,56	aA	5,60	aA	0	0,00	aC	4,07	aA	1,73	aB
3	0,25	aB	2,70	bA	3,24	bA	3	0,00	aB	2,54	aA	3,22	aA
6	1,00	aA	1,65	bA	1,00	cA	6	0,00	aB	1,33	bA	0,00	bB
CV (%)	20,15					CV (%)	22,74						
Altura do maior broto						Altura do maior broto							
0	0,46	aB	0,73	aA	0,49	bB	0	0,00	aC	1,08	aA	0,66	aB
3	0,00	bB	0,77	aA	0,71	aA	3	0,00	aB	0,85	aA	0,90	aA
6	0,38	aB	0,66	aA	0,32	bB	6	0,00	aB	0,57	bA	0,00	bB
CV (%)	12,90					CV (%)	11,32						
Número de folhas por broto						Número de folhas por broto							
0	1,78	aA	1,89	aA	1,84	aA	0	0,00	aB	4,87	aA	4,01	aA
3	0,43	bB	1,94	aA	1,90	aA	3	0,00	aB	5,43	aA	5,68	aA
6	1,65	aA	1,97	aA	1,44	aA	6	0,00	aB	3,36	bA	0,00	bB
CV (%)	19,17					CV (%)	19,81						
Explantes com calos (%)						Explantes com calos (%)							
0	0,00	bA	0,00	bA	0,00	bA	0	0,00	aA	0,00	bA	0,00	aA
3	0,00	bB	41,67	aA	62,50	aA	3	0,00	aB	6,66	aA	0,00	aB
6	29,17	aA	93,75	bB	6,25	cB	6	0,00	aA	0,00	bA	0,00	aA
CV (%)	26,87					CV (%)	44,39						
Hiperidricidade (%)						Hiperidricidade (%)							
0	0,00	aB	91,67	aA	81,25	aA	0	0,00	aB	35,42	aA	43,75	aA
3	0,00	aC	29,17	bB	43,75	bA	3	0,00	aA	14,58	aA	50,00	aA
6	0,00	aB	10,42	cA	0,00	cB	6	0,00	aA	8,33	bA	0,00	bA
CV (%)	19,78					CV (%)	62,23						
Enraizamento (%)						Enraizamento (%)							
0	22,92	bA	0,00	aB	2,08	bB	0	0,00	bA	0,00	aA	0,00	aA
3	68,75	aA	0,00	aB	0,00	bB	3	8,52	aA	0,00	aB	0,00	aB
6	35,42	bA	0,00	aB	50,00	aA	6	0,00	bA	0,00	aA	0,00	aA
CV (%)	69,77					CV (%)	2,26						
Número de raízes por explante						Número de raízes por explante							
0	1,29	bA	0,00	aB	0,50	bB	0	0,00	bA	0,00	aA	0,00	aA
3	4,22	aA	0,00	aB	0,00	bB	3	4,00	aA	0,00	aB	0,00	aB
6	5,22	aA	0,00	aB	4,27	aA	6	0,00	bA	0,00	aA	0,00	aA
CV (%)	15,71					CV (%)	14,19						
Mortalidade (%)					Média	Mortalidade (%)					Média		
0	52,08	8,33	14,58	25,00	b	0	100,00	33,33	56,25	63,19	a		
3	31,25	18,75	31,25	27,08	b	3	91,48	25,21	33,33	50,00	b		
6	64,58	27,08	41,67	44,44	a	6	100,00	60,42	100,00	86,81	a		
Média	49,31	A	18,06	B	29,17	B	Média	97,16	A	39,65	B	63,19	B
CV (%)	35,70					CV (%)	28,68						

A H0 não foi rejeitada pelo teste de Bartlett a 5% de probabilidade.

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott (P=0,05).

4.3.2. Enraizamento

O enraizamento *ex vitro* da espécie *Rubus erythroclados* é mais eficiente, quando comparado com o enraizamento *in vitro*, como pode ser observado na Tabela 4.

Tanto com a diluição da solução em álcool ou em água, as porcentagens de enraizamento foram altas nos experimentos *ex vitro*, diferentemente da hipótese, que sugeria que a solução hidroalcoólica 50% (v/v) iria aumentar a oxidação, e conseqüentemente a mortalidade das microestacas.

O número de raízes por microestaca também foi maior no cultivo *ex vitro*, em ambas as formas de diluição da solução, e qualquer uma das concentrações de AIB proporcionou um maior número de raízes, quando comparado com a testemunha. Além do número de raízes, o comprimento das mesmas também foi maior no cultivo *ex vitro*. As maiores concentrações do regulador vegetal (1000 e 1500 mg L⁻¹) diluídas em álcool causaram redução no comprimento das raízes no cultivo *ex vitro*, o que indica que essas concentrações, aliadas ao álcool, inibem o crescimento radicial. Quando a diluição foi em água, apenas a concentração mais alta (1500 mg L⁻¹) provocou a inibição do crescimento radicial. Leitzke et al. (2009) também observaram que, com o aumento da concentração de AIB, houve a redução do comprimento das raízes de amoreira-preta e framboeseira.

A porcentagem de estacas vivas sem raízes no presente trabalho foi bastante baixa em ambos os experimentos, sendo que o único tratamento que formou muitas plantas com essas características foi o tratamento livre de regulador vegetal *in vitro*, na solução diluída em água. Nos demais tratamentos, esse comportamento foi pouco observado.

De forma geral, o enraizamento *ex vitro* formou plantas maiores que o *in vitro*, e as concentrações mais altas de AIB (1000 e 1500 mg L⁻¹) foram prejudiciais ao crescimento das mesmas, quando a diluição da solução foi realizada com álcool. As referidas características das microestacas podem ser observadas na FIGURA 2.

No enraizamento *ex vitro*, o maior número de folhas foi formado na ausência do regulador vegetal AIB. A mortalidade das microestacas foi

significativamente menor quando o enraizamento foi realizado no ambiente *ex vitro*, e quando a solução foi diluída em álcool, quanto maior a concentração de AIB, maior foi a mortalidade das microestacas.

A formação de calos não foi observada em nenhuma planta enraizada *ex vitro*, e essa taxa chegou a 58% no enraizamento *in vitro* com uso do regulador AIB. Isso indica que os sais que compõem o meio de cultura podem estar atuando como inibidores do enraizamento e também promotores da indiferenciação celular, fato este comprovado por Leitzke et al. (2009), que comparando os meios de cultura MS e WPM no enraizamento de amoreira-preta xavante, observaram que o meio MS proporcionou uma menor taxa de enraizamento, e menor número e comprimento de raízes. Welander (1985), Del Castillo e Zerda (1990), reduzindo os macronutrientes do meio MS a 1/5 com a adição de 0,05 μM de AIB, obtiveram enraizamento *in vitro* de *Rubus* spp. de 100%.

As altas taxas de enraizamento *ex vitro* mesmo na ausência de regulador vegetal (superiores a 89%) demonstraram que essa é uma técnica promissora para a espécie em questão, e que o enraizamento *in vitro* não se justifica. Dessa forma, sugere-se realizar a multiplicação *in vitro* e o enraizamento *ex vitro*.

TABELA 4 – ENRAIZAMENTO, COMPRIMENTO DA MAIOR RAIZ, NÚMERO DE FOLHAS POR PLANTA, MORTALIDADE, PORCENTAGEM DE FORMAÇÃO DE CALOS, NÚMERO DE RAÍZES POR MICROESTACA, CRESCIMENTO E NÚMERO DE FOLHAS POR PLANTADE *Rubus erythroclados* TRATADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AIB DILUÍDO EM DOIS TIPOS DE SOLUÇÃO, E ACONDICIONADAS *IN* E *EX VITRO*. CURITIBA, PR, 2014.

Solução diluída em álcool (50 % v/v)								Solução diluída em água destilada																							
AIB (mg L ⁻¹)								AIB (mg L ⁻¹)																							
0								500								1000								1500							
Enraizamento (%)																															
<i>In vitro</i>	0,00	bC	41,67	bA	14,58	bB	39,58	aA	<i>In vitro</i>	6,25	bB	10,42	bB	22,92	bA	39,58	bA														
<i>Ex vitro</i>	95,83	aA	89,58	aA	64,58	aB	39,58	aC	<i>Ex vitro</i>	89,58	aA	97,92	aA	87,50	aA	89,58	aA														
CV (%)	11,96																														
Comprimento da maior raiz (cm)																															
<i>In vitro</i>	0,00	bB	0,61	bA	0,48	bA	0,52	bA	<i>In vitro</i>	0,83	bA	0,43	bA	0,72	bA	0,82	bA														
<i>Ex vitro</i>	3,10	aA	3,26	aA	2,70	aB	2,44	aB	<i>Ex vitro</i>	3,11	aB	3,81	aA	4,29	aA	3,20	aB														
CV (%)	8,43																														
Vivas (%) ^{ns}																															
<i>In vitro</i>	10,42		2,08		0,00		0,00		<i>In vitro</i>	33,33	aA	2,08	aB	2,08	aB	6,25	aB														
<i>Ex vitro</i>	2,48		2,08		0,00		2,08		<i>Ex vitro</i>	4,17	bA	0,00	aA	4,17	aA	6,25	aA														
CV (%)	80,25																														
Mortalidade (%)																															
<i>In vitro</i>	89,58	aA	39,58	aB	77,08	aA	47,92	aB	<i>In vitro</i>	60,42		87,50		75,00		54,17															
<i>Ex vitro</i>	2,08	bD	8,33	bC	35,42	bB	58,33	aA	<i>Ex vitro</i>	6,25		2,08		8,33		4,17															
CV (%)	16,83																														
Formação de calos (%)																															
<i>In vitro</i>	0,00	aC	58,33	aA	22,92	aB	52,08	aA	<i>In vitro</i>	0,00		0,00		4,17		2,08															
<i>Ex vitro</i>	0,00	aA	0,00	bA	0,00	bA	0,00	bA	<i>Ex vitro</i>	0,00		0,00		0,00		0,00															
CV (%)	32,89																														
Raízes por microestaca																															
<i>In vitro</i>	0,00		4,49		5,21		4,23	Média	<i>In vitro</i>	2,00		4,25		6,19		6,90	Média														
<i>Ex vitro</i>	4,61		12,52		7,86		10,67	8,91 a	<i>Ex vitro</i>	5,31		8,39		6,27		8,68	7,16 a														
Média	2,31	B	8,5	A	6,54	A	7,45	A	Média	3,65	B	6,32	A	6,23	A	7,79	A														
CV (%)	15,85																														
Crescimento das plantas (cm)																															
<i>In vitro</i>	0,13		0,14		0,04		0,00	0,08 b	<i>In vitro</i>	0,34	aA	0,00	bA	0,21	aA	0,42	aA														
<i>Ex vitro</i>	0,77		0,63		0,22		0,30	0,48 a	<i>Ex vitro</i>	0,69	aA	0,90	aA	0,45	aA	0,83	aA														
Média	0,45	A	0,39	A	0,13	B	0,15	B	Média	0,51	A	0,45	A	0,33	A	0,62	A														
CV (%)	13,97																														
Número de folhas por planta																															
<i>In vitro</i>	1,17		0,47		0,13		0,00	0,44 b	<i>In vitro</i>	2,82	aA	0,00	bB	1,56	aA	2,03	aA														
<i>Ex vitro</i>	3,11		1,39		0,68		0,23	1,35 a	<i>Ex vitro</i>	2,82	aA	3,42	aA	1,28	aB	2,02	aB														
Média	2,14	A	0,93	B	0,40	C	0,11	C	Média	2,82	aA	3,42	aA	1,28	aB	2,02	aB														
CV (%)	19,72																														
Raízes por microestaca																															
<i>In vitro</i>	0,00		4,49		5,21		4,23	Média	<i>In vitro</i>	2,00		4,25		6,19		6,90	Média														
<i>Ex vitro</i>	4,61		12,52		7,86		10,67	8,91 a	<i>Ex vitro</i>	5,31		8,39		6,27		8,68	7,16 a														
Média	2,31	B	8,5	A	6,54	A	7,45	A	Média	3,65	B	6,32	A	6,23	A	7,79	A														
CV (%)	15,85																														
Crescimento das plantas (cm)																															
<i>In vitro</i>	0,13		0,14		0,04		0,00	0,08 b	<i>In vitro</i>	0,34	aA	0,00	bA	0,21	aA	0,42	aA														
<i>Ex vitro</i>	0,77		0,63		0,22		0,30	0,48 a	<i>Ex vitro</i>	0,69	aA	0,90	aA	0,45	aA	0,83	aA														
Média	0,45	A	0,39	A	0,13	B	0,15	B	Média	0,51	A	0,45	A	0,33	A	0,62	A														
CV (%)	13,97																														
Número de folhas por planta																															
<i>In vitro</i>	1,17		0,47		0,13		0,00	0,44 b	<i>In vitro</i>	2,82	aA	0,00	bB	1,56	aA	2,03	aA														
<i>Ex vitro</i>	3,11		1,39		0,68		0,23	1,35 a	<i>Ex vitro</i>	2,82	aA	3,42	aA	1,28	aB	2,02	aB														
Média	2,14	A	0,93	B	0,40	C	0,11	C	Média	2,82	aA	3,42	aA	1,28	aB	2,02	aB														
CV (%)	19,72																														

A H0 não foi rejeitada pelo teste de Bartlett a 5% de probabilidade.

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott (P=0,05).



FIGURA 2 – ASPECTO DAS MICROESTACAS DE *Rubus erythroclados* SOB DIFERENTES TRATAMENTOS COM AIB DILUÍDO EM NaOH. CURITIBA, PR, 2014. A, B, C, D: CULTIVADOS *IN VITRO* E TRATADOS COM 0, 500, 1000 E 1500 mg L⁻¹ DE AIB, RESPECTIVAMENTE. E, F, G, H: CULTIVADOS *EX VITRO* E TRATADOS COM 0, 500, 1000 E 1500 mg L⁻¹ DE AIB, RESPECTIVAMENTE.

4.4. CONCLUSÕES

A multiplicação de *Rubus erythroclados* é dependente da adição de BAP ao meio de cultura, sendo que a concentração de 5 μ M é suficiente para uma alta taxa de multiplicação. O referido tratamento ocasionou altas porcentagens de hiperidricidade nas plantas, porém, isso foi revertido na etapa de enraizamento, onde nenhuma planta apresentou tal característica.

O enraizamento de microestacas de amoreira-verde deve ser realizado *ex vitro*, em casa-de-vegetação com nebulização intermitente, sem a adição de regulador vegetal.

4.5. REFERÊNCIAS

- AUGUSTO, C. S. S.; BIASI, L. A.; TELLES, C. A. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de amoreira-preta cv. Brazos. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 28, n.3, p.437-376, 2006.
- BRUM, G. R. **Micropropagação da figueira (*Ficus carica* L.) 'Roxo de Valinhos'**. 41p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.
- CAMPAGNOLO, M. A.; PIO, R. Enraizamento de estacas caulinares e radiculares de cultivares de amoreira-preta coletadas em diferentes épocas, armazenadas a frio e tratadas com IBA. **Ciência Rural**, n.42, p.232-237, 2012.
- CORDEIRO, J.; RODERJAN, C. V.; RODRIGUES, W. A. Plantas lenhosas da Floresta Ombrófila Mista do Parque Municipal das Araucárias – Guarapuava (PR). **Ambiência**, n.7, p.441-460, 2011.
- DEBNATH, S. C. **Micropropagation of small fruits**. In: JAIN, S. M.; ISHII, K. *Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands, p.465-506, 2003.
- DEBNATH, S. C. Clonal propagation of dwarf raspberry (*Rubus pubescens* Raf.) through *in vitro* axillary shoot proliferation. **Plant Growth Regulation**, v.43, p. 179-186, 2004.
- DEL CASTILLO, A. R.; ZERDA, A. A. Estudios preliminares para la propagacion clonal *in vitro* de mora (*Rubus glaucus* L.). **Agronomía Colombiana**, Bogotá, v.7, n.1-2, p.17-25, 1990.
- DENG, R.; DONNELLY, D. J. *In vitro* hardening of red raspberry through CO₂ enrichment and relative humidity reduction on sugar-free medium. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.73, n.4, p.1105-1113, 1993.
- DONNELLY, D. J.; VIDAVER, W. E. Physiological and anatomical transitions in tissue cultured raspberry. **Plant Physiology Supplement**, v.75, p.13, 1984.
- EPPO. European and Mediterrean Plant Protection Organization. **Certification schemes; pathogen-tested material of *Rubus***. Paris: EPPO. 9p. 2004.
- ERIG, A. C.; DE ROSSI, A.; FORTES, G. R. L. 6-benzilaminopurina e ácido indolbutírico na multiplicação *in vitro* da amoreira-preta (*Rubus idaeus*), cv. Tupy. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.5, p.765-770, 2002.

- GEORGE, E.F. **Plant tissue culture procedure – background**. p.1-28. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. de. *Plant Propagation by Tissue Culture*, 3rd edition, v.1. Springer, The Netherlands, 2008.
- JIN, W.; GU, Y.; ZHEN, S.-Z. *In vitro* propagation of *Rubus* species. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.49, n.3-4, p.335-340, 1992.
- LAZIC, T.; RUZIC, D. Organogenesis *in vitro* from the leaf of blackberry cv. Cacanska Bestrna. **Genetika**, n.39, p.69-78, 2007.
- LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v.31, n.2, p.582-587, 2009.
- MAIA, A. J.; BOTELHO, R. V. Reguladores vegetais no enraizamento de estacas lenhosas da amoreira-preta cv. Xavante. **Semina: Ciências Agrárias**, n.29, p.323-330, 2008.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-479, 1962.
- OLIVEIRA, R. P.; NINO, A. F. P.; FERREIRA, L. V. Potencial de multiplicação *in vitro* de cultivares de amoreira-preta. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v.30, n.3, p.585-589, 2008.
- OLIVEIRA, R. P.; GOMES, T. S.; VILARINHOS, A. D. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.12, p.2329-2334, 2000.
- REED, B. M.; ENGELMANN, F.; DULLOO, M. E.; ENGELS, J. M. M. Technical guidelines for the management of field and *in vitro* germplasm collections. **IPGRI Handbooks for Genebanks**, n.7. 2004.
- SOBCZYKIEWICZ, D. Micropropagation of raspberry (*Rubus idaeus* L.). In: BAJAJ, Y. P. S. **High-tech and micropropagation II**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, p.339-353, 1992. (Biotechnology in agriculture and forestry, 19).
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

WELANDER, M. *In vitro* culture of raspberry (*Rubus idaeus*) for mass propagation. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.60, n.4, p.493-499, 1985.

5. PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE *Rubus brasiliensis* POR ESTAQUIA CAULINAR E RADICIAL

RESUMO

Baseado na dificuldade encontrada por produtores para a produção de mudas de amoreira-verde (*Rubus brasiliensis* Martius), o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o enraizamento de estacas caulinares em diferentes datas de coleta, tratadas com concentrações de ácido indolbutírico (AIB), e avaliar o enraizamento de estacas radiciais de diversos diâmetros, e também com diferentes concentrações de ácido naftalenoacético (ANA). O experimento com estacas caulinares teve como objetivo avaliar a influência de cinco concentrações de AIB (0, 1000, 2000, 3000 e 4000 mg L⁻¹) e cinco datas de coleta (11 de setembro e 14 de novembro de 2013, 20 de fevereiro, 20 de abril e 18 de junho de 2014) em arranjo fatorial. Com a realização desse experimento, conclui-se que o uso de AIB aumentou a porcentagem de enraizamento de estacas caulinares semilenhosas de *R. brasiliensis*, sendo que houve variação de acordo com a data de coleta, e mesmo assim, as porcentagens de enraizamento foram muito baixas, inferiores a 16%. Avaliando a estaquia radicial, conclui-se que a técnica não foi eficiente para a propagação da espécie, mesmo com o uso de ANA nas concentrações de 0, 2.500 e 5.000 mg L⁻¹ e diversos diâmetros de estacas (2,5 mm, 5,0 mm, 7,5 mm, 10 mm e 12,5 mm). Sendo assim, foi observado que a espécie apresenta dificuldade de enraizamento.

Palavras-chave: Enraizamento, amora-verde, AIB, ANA.

VEGETATIVE PROPAGATION OF *Rubus brasiliensis* BY STEM AND RADICAL CUTTING

ABSTRACT

Based on the difficulty faced by farmers to propagate greenberry (*Rubus brasiliensis* Martius), the present study was carried out to evaluate rooting of stem cuttings in different harvest dates, treated with indolebutyric acid concentrations (IBA), and to evaluate rooting of root cuttings of different diameters, and with different concentrations of naphthalene acid (ANA). The experiment with stem cuttings evaluated the influence of five concentrations of IBA (0, 1000, 2000, 3000 and 4000 mg L⁻¹) and five collection dates (September 11th and November 14th 2013, February 20th, April 20th and June 18th, 2014) in a factorial design. With the end of this experiment, we concluded that the use of IBA increased the rooting of stem softwood cuttings of *R. brasiliensis*, and there was variation according to the date of collection, and even then, the rooting was very low, less than 16%. Evaluating radical cuttings, we concluded that the technique was not efficient to multiply the species, even with the use of ANA under concentrations of 0, 2500 and 5000 mg L⁻¹ and various diameters of cuttings (2.5 mm, 5.0 mm, 7.5 mm, 10 mm and 12.5 mm). Thus, it was observed that the species is difficult to root.

Keywords: Rooting, greenberry, IBA, NAA.

5.1. INTRODUÇÃO

A crescente procura por frutas funcionais vem estimulando o consumo das pequenas frutas. A amoreira-verde (*Rubus brasiliensis*) produz frutas com altas concentrações de antioxidantes e de açúcares (LIMA et al., 2012), de coloração verde, sabor e aroma agradáveis, revelando um potencial de comercialização destas com as demais pequenas frutas. A espécie é nativa de regiões de campos naturais e dos sub bosques de araucária dos estados do Paraná e de Santa Catarina (CORDEIRO et al., 2011).

A estaquia é um dos métodos mais viáveis para a propagação de plantas do gênero *Rubus* (MAIA e BOTELHO, 2008), levando-se em conta que existe grande quantidade de material propagativo em decorrência das podas de verão e inverno, porém, o potencial rizogênico de estacas caulinares é variável de acordo com o genótipo. Outra opção para a produção de mudas de plantas do gênero *Rubus* é a estaquia radicial, que tem como vantagens a ausência de espinhos e, em diversas cultivares, uma maior porcentagem de enraizamento e número de raízes formadas (CAMPAGNOLO e PIO, 2012).

A viabilidade de uso da estaquia depende da capacidade de formação de raízes adventícias de cada espécie e/ou cultivar, da qualidade do sistema radicial formado e do desenvolvimento posterior da planta propagada na área de produção. A capacidade de uma estaca emitir raízes é função de fatores endógenos e das condições ambientais proporcionadas ao enraizamento (DENAXA et al., 2012). Entre tais fatores, o uso de reguladores vegetais contribui para o enraizamento e formação de raízes de qualidade. O enraizamento de estacas é influenciado por reguladores vegetais do grupo das auxinas, embora esta não seja a única substância envolvida (ALCANTARA et al., 2010). Dentro do grupo das auxinas, destaca-se o ácido indolbutírico (AIB) como o mais utilizado exogenamente (PASQUAL et al., 2001; HARTMANN et al., 2002; COUTINHO et al., 2007; BETANIN e NIENOW, 2010).

A época de coleta das estacas é outro fator que pode influenciar o sucesso da propagação vegetativa por diversos motivos, como a condição fisiológica da planta matriz e conseqüentemente seu balanço hormonal (FACHINELLO et al., 2005) teor de carboidratos, que varia de acordo com as

estações do ano (STENVALL et al., 2009; HAN et al., 2009), e seu conteúdo endógeno está associado com a indução de novos brotos (PALINOVA et al., 2002) e com o enraizamento (DENAXA et al., 2012). De acordo com Hartmann et al. (2002), outros fatores, como o potencial genético de enraizamento, e a oxidação dos compostos fenólicos podem afetar a formação de raízes.

A importância do presente trabalho encontra-se na necessidade de informações para a propagação da espécie *Rubus brasiliensis*, pois não há trabalhos publicados sobre este assunto e em estudos preliminares foi constatada a dificuldade de enraizamento de estacas desta espécie, concordando com a observação de produtores que não obtiveram sucesso na produção de mudas.

Dessa forma, os objetivos do presente trabalho foram avaliar a capacidade de enraizamento de estacas caulinares semilenhosas de amoreira-verde tratadas com cinco concentrações de AIB, em cinco datas de coleta ao longo do ano e avaliar a capacidade de enraizamento de estacas radiciais com cinco diferentes diâmetros de espessura e sob três concentrações de ANA.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento com estacas caulinares foi realizado no período de setembro de 2013 a agosto de 2014, em casa de vegetação, nas dependências do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, no município de Curitiba. As plantas matrizes utilizadas foram provenientes de uma população de ocorrência natural (ou população nativa) da Estação Experimental do Cangüiri, localizada no município de Pinhais – PR, sob as coordenadas 25°23'30"S e 49°07'30"W.

Os ramos utilizados nos experimentos foram coletados da parte mediana das plantas, imediatamente umedecidos e acondicionados em sacolas, garantindo um ambiente úmido e fresco. Desse modo, os ramos foram levados até a casa de vegetação onde o trabalho foi realizado.

As estacas foram preparadas com 12 centímetros de comprimento, com corte em bisel na base e corte reto na parte superior, onde foi conservado um folíolo. Após a confecção, as estacas foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 0,5% durante 10 minutos e logo em seguida lavadas em água corrente durante cinco minutos. O tratamento com AIB foi aplicado pela imersão da base das estacas durante 10 segundos em cinco concentrações hidroalcoólicas (50% v/v) 0, 1000, 2000, 3000 e 4000 mg L⁻¹.

O plantio das estacas foi realizado em tubetes de 114 cm³, contendo vermiculita de granulometria média como substrato. Os experimentos foram instalados em casa de vegetação com nebulização de 30 segundos a cada 30 minutos das 08:00 às 17:00 e 30 segundos a cada duas horas das 17:00 às 08:00 horas.

O mesmo procedimento foi realizado nas cinco datas de coleta, 11 de setembro e 14 de novembro de 2013, 20 de fevereiro, 20 de abril e 18 de junho de 2014, sendo as avaliações realizadas 63, 94, 60, 60 e 70 dias após cada coleta, respectivamente.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 5x5 (cinco datas de coleta e cinco concentrações de AIB), com quatro repetições e 16 estacas por unidade experimental, totalizando 1600 estacas.

Os experimentos com estacas radiciais foram instalados no dia 27 de março de 2014, sendo que as plantas foram coletadas e o experimento foi instalado nos mesmos locais do experimento anterior.

No primeiro experimento de estaquia radicial, foram utilizados os tratamentos de ácido naftalenoacético (ANA) nas concentrações de 0, 2.500 e 5.000 mg L⁻¹, em imersão rápida durante dez segundos, sendo que as estacas radiciais foram colocadas em leitos de enraizamento (bandejas com vermiculita), na posição horizontal, e totalmente cobertas com 2 cm de vermiculita. No segundo experimento de estaquia radicial, os tratamentos foram diferentes diâmetros de estacas, medidos com o auxílio de um paquímetro digital. Todas as estacas foram confeccionadas com seis centímetros de comprimento. Os tratamentos foram: 2,5 mm, 5,0 mm, 7,5 mm, 10 mm e 12,5 mm. Estes experimentos foram avaliados após 211 dias.

Em ambos os experimentos, foram analisadas as seguintes variáveis: porcentagem de estacas enraizadas, porcentagem de estacas com calos (sem raízes), porcentagem de estacas vivas (aquelas que não enraizaram e também não formaram calo), porcentagem de estacas mortas e porcentagem das estacas que apresentavam brotações, número de raízes formadas por estacas e comprimento médio das três maiores raízes por estaca, sendo que no trabalho de estaquia radicial, a altura das brotações também foi avaliada.

As variâncias dos tratamentos foram avaliadas quanto à sua homogeneidade pelo teste de Cochran. Os dados foram submetidos à análise de variância ($P < 0,05$) e ao teste de comparação de médias de Scott-Knott ($\alpha \leq 0,05$) através do programa estatístico Assistat[®].

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amoreira verde demonstrou ser uma espécie de difícil enraizamento, apresentando baixas porcentagens de enraizamento em todos os tratamentos (inferiores a 16%), e quando na ausência do ácido indolbutírico, as porcentagens de enraizamento foram próximas a zero em todas as épocas avaliadas. A análise de variância mostrou que houve interação significativa entre as datas de coleta e as concentrações do regulador vegetal (TABELA 5).

Quando a estaquia foi realizada nos meses de setembro, novembro e junho, não houve diferença entre as concentrações de AIB para a porcentagem de enraizamento, exceto no mês de setembro, quando o tratamento com 3000 mg L⁻¹ não diferiu da testemunha. Desta forma, nesses meses, a concentração de 1000 mg L⁻¹ foi suficiente para obter as maiores porcentagens de enraizamento.

Já nos meses de fevereiro e abril, as maiores porcentagens de enraizamento foram obtidas com concentrações de 2000, 3000 e 4000 mg L⁻¹ de AIB, que não diferiam entre si e foram superiores a concentração de 1000 mg L⁻¹ de AIB. Assim, nos meses de fevereiro e abril, foi necessária uma maior concentração de AIB para estimular a indução radicial.

Essa resposta pode estar relacionada com a concentração de açúcares solúveis endógenos nas estacas em cada época do ano, que segundo Denaxa et al. (2012), é maior no verão, quando comparado com outono e primavera, em estacas de oliveira. Os autores revelaram que no verão, os teores de açúcares solúveis são maiores, e os teores de amidos são menores, e Wiesman e Lavee (1995) citaram que a concentração de carboidratos pode afetar o metabolismo de auxinas, melhorando o efeito do AIB no enraizamento de estacas.

TABELA 5 - PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO, ESTACAS VIVAS SEM RAÍZES E SEM CALOS, MORTALIDADE, ESTACAS COM CALOS E SEM RAÍZES, ESTACAS COM BROTAÇÕES, NÚMERO DE RAÍZES POR ESTACA ENRAIZADA E COMPRIMENTO MÉDIO DAS TRÊS MAIORES RAÍZES, DE ESTACAS CAULINARES SEMILENHOSAS DE *Rubus brasiliensis* EM CINCO DATAS DE COLETA E TRATADAS COM CINCO CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO INDOLBUTÍRICO (AIB). CURITIBA, PR, 2014.

Época	AIB (mg L-1)				
	0	1000	2000	3000	4000
	Enraizamento (%)				
11.09.2013	1,6 aB	6,3 aA	6,3 aA	1,6 bB	6,3 bA
11.11.2013	0,0 aB	6,3 aA	10,9 aA	6,3 aA	4,7 bA
20.02.2014	1,6 aB	1,6 bB	9,4 aA	10,9 aA	14,1 aA
20.04.2014	0,0 aB	1,6 bB	12,5 aA	10,9 aA	7,8 aA
18.06.2014	0,0 aB	15,6 aA	6,3 aA	6,3 aA	10,9 aA
CV (%)	10,51				
	Número de raízes por estaca enraizada				
11.09.2013	0,3 aB	10,6 aA	1,6 bB	0,8 aB	1,4 aB
11.11.2013	0,0 aB	3,0 bA	7,5 aA	4,0 aA	1,8 aB
20.02.2014	0,5 aA	0,8 bA	1,9 bA	2,9 aA	3,4 aA
20.04.2014	0,0 aB	1,3 bB	4,5 aA	2,1 aA	3,8 aA
18.06.2014	0,0 aB	4,7 aA	5,8 aA	3,3 aA	3,8 aA
CV (%)	40,3				
	Comprimento médio das três maiores raízes (cm)				
11.09.2013	3,5 aB	10,0 aA	4,3 aB	3,6 bB	3,9 aB
11.11.2013	0,0 aB	10,9 aA	8,0 aA	8,1 aA	7,7 aA
20.02.2014	0,8 aB	1,2 bB	8,9 aA	6,6 aA	8,3 aA
20.04.2014	0,0 aB	1,1 bB	5,1 aA	2,3 bA	3,9 aA
18.06.2014	0,0 aB	5,3 aA	5,1 aA	3,1 bA	4,5 aA
CV (%)	39,38				
	Estacas vivas sem raízes e sem calos (%)				
11.09.2013	1,6 bA	0,0 bA	3,1 cA	3,1 bA	3,1 bA
11.11.2013	20,3 aA	0,0 bB	3,1 cB	0,0 bB	1,6 bB
20.02.2014	17,2 aA	12,5 aA	18,8 aA	4,7 aB	1,6 aB
20.04.2014	28,1 aA	1,6 bC	7,8 bB	12,5 aB	9,4 aB
18.06.2014	18,8 aA	1,6 bB	12,5 bA	6,3 aB	6,3 bB
CV (%)	21,53				
	Mortalidade de estacas (%)				
11.09.2013	92,2 aA	90,6 aA	89,1 aA	92,2 aA	85,9 aA
11.11.2013	78,1 bB	93,8 aA	84,4 aB	93,8 aA	93,8 aA
20.02.2014	68,8 cA	57,8 bB	45,3 dC	73,4 bA	70,3 bA
20.04.2014	64,1 cC	95,3 aA	76,6 bB	71,9 bB	78,1 bB
18.06.2014	60,9 cB	62,5 bB	65,6 cB	75,0 bA	79,7 bA
CV (%)	8,62				
	Estacas com calos e sem raízes (%)				
11.09.2013	4,7 bA	3,1 bA	1,6 bA	3,1 bA	4,7 bA
11.11.2013	1,6 bA	0,0 bA	1,6 bA	0,0 cA	0,0 cA
20.02.2014	12,5 aB	28,1 aA	26,6 aA	10,9 aB	14,1 aB
20.04.2014	7,8 aA	1,6 bA	3,1 bA	4,7 bA	4,7 bA
18.06.2014	20,3 aA	20,3 aA	15,6 aA	12,5 aA	3,1 cB
CV (%)	20,36				
	Estacas com brotações (%)				
11.09.2013	3,5 bA	10,0 bA	4,3 bA	3,6 bA	3,9 bA
11.11.2013	0,0 bA	0,0 cA	0,0 bA	0,0 bA	0,0 bA
20.02.2014	12,5 aA	23,4 aA	12,5 aA	12,5 aA	14,1 aA
20.04.2014	14,1 aA	0,0 cB	3,1 bB	3,1 bB	0,0 bB
18.06.2014	21,9 aA	14,1 bA	9,4 aA	9,4 aA	1,6 bB
CV (%)	42,89				

A H0 não foi rejeitada pelo teste de Cochran a 5% de probabilidade.

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott (P=0,05).

Resultados semelhantes aos do presente trabalho foram obtidos por Maia e Botelho (2008), ao avaliarem o enraizamento de estacas lenhosas de amoreira-preta da cultivar Xavante, onde nenhuma estaca apresentou raízes sem a utilização do regulador vegetal AIB, ao passo que com a concentração de 1000 mg L^{-1} a porcentagem de enraizamento foi de 56%.

Villa et al. (2003), trabalhando com estacas lenhosas de duas cultivares de amoreira-preta, no mês de setembro, obtiveram o maior percentual de enraizamento da cv. Guarani com a aplicação de 2000 mg L^{-1} , já a cv. Brazos não precisou do regulador para apresentar altas porcentagens de enraizamento, superiores a 60%. Vignolo et al. (2014), trabalhando com estacas lenhosas, com folhas e sem a adição de regulador vegetal no mês de julho, obtiveram com as cultivares Tupy e Xavante, as maiores taxas de enraizamento (70,83 e 75%, respectivamente), quando comparadas com a cultivar Guarani, que apresentou apenas 16,66% de enraizamento. Esses dados deixam claro que o enraizamento de estacas é controlado por fatores genéticos.

Já Antunes et al. (2000) obtiveram, com as mesmas cultivares Brazos e Guarani, taxas de enraizamento próximas a 97%. A diferença entre os resultados pode estar relacionada à época de coleta das estacas e ao ambiente de enraizamento. O primeiro trabalho citado teve as estacas coletadas no mês de setembro e acondicionadas em casa-de-vegetação com nebulização intermitente, já no segundo trabalho, as estacas foram coletadas no mês de julho e mantidas sob tela com 50% de sombreamento. Nesses casos, tanto a consistência e a composição hormonal, devidos à época de coleta, quanto o ambiente de enraizamento podem ter influenciado no potencial rizogenético das estacas.

Campagnolo e Pio (2012), avaliando estaquia caulinar da cultivar de amoreira-preta Tupy em diferentes épocas sem a adição de regulador vegetal, obtiveram a maior porcentagem de enraizamento (50%) quando a estaquia foi realizada no dia 22 de julho, e a segunda maior (37,5%) no dia 06 de agosto, quando comparadas às estaquias nos dias 07 e 22 de junho, 08 de julho e 20 de agosto.

O número de raízes formadas em cada estaca enraizada foi baixo nas diferentes épocas de estaquia, como pode ser observado na TABELA 5. No

mês de fevereiro, as concentrações de AIB não influenciaram a formação de raízes, mas em todas as demais datas de coleta das estacas, exceto abril, a concentração de 1000 mg L^{-1} foi uma das que proporcionou o maior número de raízes por estaca enraizada, e no referido mês de abril, a máxima formação de raízes exigiu concentrações mais altas do regulador vegetal (acima de 2000 mg L^{-1}). O aspecto das estacas caulinares tratadas com as cinco concentrações de AIB pode ser observado na FIGURA 3.



FIGURA 3 – ASPECTO DAS ESTACAS DE *Rubus brasiliensis*, COLETADAS NO DIA 18 DE JUNHO DE 2014, E TRATADAS COM CINCO CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO INDOLBUTÍRICO (AIB). CURITIBA, PR, 2014. 1: $0 \text{ mg DE AIB.L}^{-1}$; 2: $1000 \text{ mg DE AIB.L}^{-1}$; 3: $2000 \text{ mg DE AIB.L}^{-1}$; 4: $3000 \text{ mg DE AIB.L}^{-1}$; 5: $4000 \text{ mg DE AIB.L}^{-1}$.

Esta maior necessidade de regulador vegetal observada no mês de abril já era esperado, devido às condições de baixas temperaturas e fotoperíodo que ocorrem nessa época, que resultam na redução da produção de carboidratos pelas plantas, que segundo Aslmoshtaghi e Shahsavari (2010), servem como importante fonte de energia para a formação de novas raízes e também, segundo Wiesman e Lavee (1995), podem aumentar o efeito estimulatório do AIB no processo de enraizamento.

Campagnolo e Pio (2012), trabalhando com estaquia caulinar da cultivar de amoreira-preta Tupy em diferentes datas de coleta e sem a adição de regulador vegetal, observaram que nos dias 07 e 22 de junho ocorreram menores números de raízes por estaca (1,6 e 0,5, respectivamente), quando

comparado com os dias 08 e 22 de julho e 06 de agosto (6,5, 6,7 e 5,1, respectivamente). Já no presente trabalho, não houve diferença significativa no número de raízes formadas por estaca nas diferentes datas de coleta na ausência do regulador, levando em conta que as porcentagens de enraizamento nessas condições foram muito baixas.

O comprimento médio das três maiores raízes formadas (Tabela 5) também apresentou interação significativa entre as concentrações de AIB e as datas de coleta. Pode-se observar que, no mês de setembro, concentrações iguais ou superiores a 2000 mg L⁻¹ foram prejudiciais ao crescimento das raízes, sendo que a concentração de 1000 mg L⁻¹ foi a que promoveu a formação das maiores raízes. Já nos meses de dezembro e junho, não foi observado o efeito danoso das concentrações no crescimento das raízes, sendo que todos os tratamentos com AIB formaram raízes maiores que a testemunha. Nos meses de fevereiro e abril, as raízes mais compridas ocorreram em concentrações mais elevadas de AIB (acima de 2000 mg L⁻¹).

Sabe-se que, além do regulador vegetal, existem outros fatores que podem afetar o crescimento das raízes. Moubayidin et al. (2010) citaram que o crescimento da raiz ocorre quando a divisão celular prevalece sobre a diferenciação, no meristema apical. Isso ocorre porque existe uma maior concentração de auxinas promovendo a divisão celular do que citocininas promovendo a diferenciação.

Vignolo et al. (2014) citaram que diversos fatores podem estar relacionados ao processo de formação e de crescimento das raízes, como a época de coleta, tipo de substrato e ambiente utilizado. Os referidos autores verificaram que a presença de folhas nas estacas das cultivares de amoreira-preta Guarani, Tupy e Xavante também favoreceu o enraizamento, o número e o comprimento de raízes, diferindo das estacas sem folhas. No trabalho citado, não foram utilizados reguladores exógenos, e as estacas foram mantidas com uma folha, com os folíolos cortados pela metade, enquanto que no presente trabalho, foi mantido apenas um folíolo inteiro.

A interação entre as concentrações de AIB e as datas de estaquia também foi significativa para a porcentagem de estacas com calos (Tabela 5). Com base nos dados, pode-se observar que nos meses de setembro, novembro e abril, as concentrações do regulador vegetal não influenciaram na

formação de calo. Já no mês de fevereiro, as concentrações de 1000 e 2000 mg L⁻¹ proporcionaram uma maior formação de calos nas estacas, quando comparadas às estacas tratadas com as demais concentrações.

No mês de junho, o tratamento com a maior concentração de AIB (4000 mg L⁻¹) foi o que proporcionou a menor porcentagem de formação de calos, e também foi o tratamento que apresentou a menor porcentagem de estacas brotadas. Esses dados confirmam a conclusão de Vignolo et al. (2014), de que as condições que afetam ou favorecem o enraizamento podem ser as mesmas que modificam aspectos como a formação de calos e a sobrevivência das estacas.

Quando o regulador vegetal não foi utilizado, as maiores porcentagens de estacas com calos foram obtidas nos meses de fevereiro, abril e junho. Trabalhando com estaquia caulinar da cultivar de amoreira-preta Tupy em diferentes épocas sem a adição de regulador vegetal, Campagnolo e Pio (2012) relataram que obtiveram as maiores porcentagens de estacas com calos no mês de junho, quando comparado com os meses de julho e agosto.

De acordo com Hartmann et al. (2002), a formação de calo e o enraizamento são processos independentes para a maioria das plantas, porém, em algumas plantas, a formação de calos pode ser precursora do enraizamento. Entretanto, isso não foi observado no presente trabalho, considerando que existiram tratamentos que, ao mesmo tempo em que apresentaram uma maior taxa de enraizamento, apresentaram a maior taxa de formação de calos.

Pôde-se observar, durante todo o trabalho, a grande mortalidade das estacas (Tabela 5). No mês de setembro, a mortalidade de estacas foi alta e independente da concentração de AIB utilizada. No mês de novembro, a mortalidade foi mais alta quando o regulador vegetal foi utilizado nas concentrações de 1000, 3000 e 4000 mg L⁻¹, comparando com os demais tratamentos (0 e 2000 mg L⁻¹) não diferindo estatisticamente nos referidos tratamentos. Quando instalada em fevereiro, a estaquia proporcionou uma menor mortalidade de estacas sob a concentração de 2000 mg L⁻¹ de AIB, quando comparada às demais concentrações. Em abril, a testemunha resultou no menor índice de mortalidade de estacas, e já no mês de junho, as duas

concentrações mais altas de AIB (3000 e 4000 mg L⁻¹) foram as que resultaram na maior mortalidade.

Analisando apenas os tratamentos sem a adição de AIB (0 mg L⁻¹), pode-se observar que a mortalidade foi menor nos meses de fevereiro, abril e junho. Isso pode ser consequência da consistência das estacas, que já se encontravam mais lignificadas nessas três épocas mencionadas.

Também ocorreu interação entre as datas de coleta e concentrações de AIB na porcentagem de estacas vivas sem raízes e sem calos. No mês de setembro, a porcentagem de estacas vivas foi muito baixa (inferior a 3,5%), não sendo influenciada pelas concentrações de AIB. Já no mês de novembro, o uso do regulador vegetal promoveu redução da porcentagem de estacas vivas. Isso ocorreu porque, quando o AIB foi utilizado, a mortalidade das estacas foi superior a 84%, e além disso, as estacas não enraizaram na ausência do regulador vegetal, o que deixa claro que a espécie não possuiu potencial de enraizamento na ausência de AIB, nas condições do mês de novembro.

Quando a estaquia foi realizada no mês de fevereiro, os tratamentos com 0, 1000 e 2000 mg L⁻¹ de AIB proporcionaram uma maior porcentagem de estacas vivas, quando comparados às médias dos tratamentos com 3000 e 4000 mg L⁻¹. Já no mês de abril, os tratamentos com 2000, 3000 e 4000 mg L⁻¹ de AIB apresentaram porcentagens semelhantes de estacas vivas, porém, superiores à média obtida com o tratamento de 1000 mg L⁻¹ e inferiores à média da testemunha (0 mg L⁻¹ de AIB).

No mês de junho, os tratamentos com 0 e 2000 mg L⁻¹ de AIB apresentaram médias estatisticamente semelhantes entre si, e superiores às obtidas com 1000, 3000 e 4000 mg L⁻¹.

As estacas sofreram influência da data de coleta e do regulador vegetal para produzirem brotações. Nos meses de setembro, novembro e fevereiro, as concentrações de AIB não afetaram a brotação das estacas, sendo que em novembro nenhuma estaca apresentou brotações, independentemente da concentração de regulador utilizada. No mês de setembro, a porcentagem de brotação também foi baixa, não diferindo do mês de novembro. Já no mês de fevereiro, a brotação das estacas foi maior que nos referidos meses, independentemente do tratamento com o regulador vegetal.

No mês de abril, o uso de AIB inibiu a brotação das estacas. Esse dado teve relação com o baixo número de estacas vivas sem raízes e calos quando do uso do regulador, e também com a elevada mortalidade das estacas nos referidos tratamentos.

Quando a estaquia foi realizada no mês de junho, a menos porcentagem de estacas com brotações foi observada com as estacas sob a maior concentração testada de AIB (4000 mg L⁻¹). Esse mesmo comportamento foi observado para a porcentagem de calos, sendo que a maior concentração do regulador proporcionou o menor percentual de formação de calos. Isso leva a considerar que as estacas que apresentaram calos tenderam a produzir brotos.

Quando a estaquia caulinar foi realizada na ausência de AIB, a porcentagem de brotação das estacas nos meses de fevereiro, abril e junho foi maior do que nos meses de setembro e novembro.

A estaquia radicial também se mostrou ineficiente na propagação de *Rubus brasiliensis*. No experimento utilizando e diferentes concentrações de ANA com estacas de 10 mm de diâmetro, a mortalidade das estacas foi superior a 95% em todos os tratamentos, e a porcentagem de enraizamento não passou de 5%.

O experimento com diferentes diâmetros das estacas radiciais também apresentou baixas porcentagens de enraizamento, como pode ser observado na TABELA 6.

TABELA 6 - PORCENTAGEM DE ENRAIZAMENTO, NÚMERO DE RAÍZES POR ESTACA, COMPRIMENTO DE RAÍZES, PORCENTAGEM DE ESTACAS VIVAS, MORTAS, COM BROTAÇÕES E ALTURA DOS BROTOS FORMADOS POR ESTACAS RADICIAIS DE *Rubus brasiliensis* COM DIFERENTES DIÂMETROS. CURITIBA, PR, 2014.

Diâmetro	Enraizamento (%)	Número de raízes por estaca	Comprimento de raízes (cm)	Estacas vivas (%)	Estacas mortas (%)	Estacas com brotações (%)	Altura dos brotos (cm)
2,5 mm	0,0 b	0,0 b	0,0 b	0,0 a	100,0 a	0,0 b	0,0 b
5 mm	2,5 b	1,0 b	2,1 b	0,0 a	97,5 a	2,5 b	1,0 b
7,5 mm	12,5 a	6,8 a	4,9 a	5,0 a	82,5 b	17,5 a	5,4 a
10 mm	2,5 b	1,3 b	0,7 b	0,0 a	97,5 a	2,5 b	1,8 b
12,5 mm	7,5 a	3,5 a	6,2 a	2,5 a	90,0 b	10,0 a	7,4 a
CV (%)	29,7	50,0	53,2	102,6	6,9	57,8	50,8

A H0 não foi rejeitada pelo teste de Cochran a 5% de probabilidade.

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott (P=0,05).

Os diâmetros de estacas que proporcionaram as maiores porcentagens de enraizamento, de estacas com brotações, de número de raízes por estaca enraizada, comprimento de raízes e altura de brotos foram de 7,5 e 12,5 mm, sendo estes superiores aos diâmetros de 2,5, 5 e 10 mm. O aspecto das estacas pode ser observado na Figura 4.



FIGURA 4 – ASPECTO DAS ESTACAS DE *Rubus brasiliensis* COM DIFERENTES DIÂMETROS. CURITIBA, PR, 2014. 1: 2,5 mm; 2: 5,0 mm; 3: 7,5 mm; 4: 10 mm; 5: 12,5 mm.

Já era esperado que as estacas de maiores diâmetros enraizassem e brotassem mais, devido à sua maior quantidade de reservas, como foi o caso das estacas de 12,5 mm de diâmetro, porém, estacas com 7,5 apresentaram maior porcentagem de enraizamento e brotação que estacas com 10 mm. Isso pode ser devido ao fato que as plantas são nativas e pode haver uma grande variabilidade genética entre as plantas. Esse fato também pode ter contribuído para o elevado coeficiente de variação observado em praticamente todas as variáveis analisadas.

Silva et al. (2012) também relataram baixo percentual de enraizamento em estaquia radicial de framboeseira negra (*Rubus niveus*) via estaquia radicial. Os autores avaliaram tratamentos com diferentes concentrações de AIB em estacas radiciais de 10 mm de diâmetro e 10 cm de comprimento, e observaram que o regulador vegetal não influenciou no enraizamento, que foi próximo a 31%. Já em outro experimento, os mesmos autores relataram que a porcentagem de enraizamento foi elevada para 79,81% quando as estacas foram armazenadas sob refrigeração durante 14 dias. Esse período de refrigeração também ocasionou um aumento no número de raízes, de 2,5 para 10,5 raízes por estaca enraizada. Como o presente trabalho foi instalado ainda

no mês de março, pode ter faltado o estímulo térmico para a quebra da dormência das gemas das estacas radiciais.

5.4. CONCLUSÕES

A amoreira verde demonstrou ser uma espécie de difícil enraizamento, apresentando baixas porcentagens de enraizamento (inferiores a 16%) em todos os tratamentos, e quando na ausência do ácido indolbutírico, as porcentagens de enraizamento foram próximas a zero em todas as épocas avaliadas de estaquia caulinar.

A estaquia radicial de amoreira verde não foi eficiente para a propagação da espécie, mesmo com o uso de ANA e diversos diâmetros de estacas.

A espécie apresenta dificuldade de enraizamento, sendo necessária a realização de outros estudos para aumentar a eficiência da estaquia.

5.5. REFERÊNCIAS

- ALCANTARA, G. B.; OLIVEIRA, Y. LIMA, D. M.; FOGAÇA, L. A.; PINTO, F.; BIASI, L. A. Efeito dos ácidos naftaleno acético e indolilbutírico no enraizamento de estacas de jambolão [*Syzygium cumini* (L.) Skeels]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.12, n.3, p.317-321, 2010.
- ASLMOSHTAGHI, E., SHAHSAVAR, A.R. Endogenous soluble sugars, starch contents and phenolic compounds in easy- and difficult-to-root olive cuttings. **Journal of Biological and Environmental Science**, v.49, n.11, p.83–86, 2010.
- ANTUNES, L. E. C.; CHALFUN, N. N. J.; REGINA, M. A. Propagação de cultivares de amoreira-preta (*Rubus* spp.) através de estacas lenhosas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.22, n.2, p.195-199, 2000.

BETANIN, L.; NIENOW, A. A. Propagação vegetativa da corticeira-da-serra (*Erythrina falcata* Benth.) por estaquia caulinar e foliar. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 4, p. 871-880, 2010.

CAMPAGNOLO, M. A.; PIO, R. Enraizamento de estacas caulinares e radiculares de cultivares de amoreira-preta coletadas em diferentes épocas, armazenadas a frio e tratadas com AIB. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.2, p.232-237, 2012.

CORDEIRO, J.; RODERJAN, C. V.; RODRIGUES, W. A. Plantas lenhosas da Floresta Ombrófila Mista do Parque Municipal das Araucárias – Guarapuava (PR). **Ambiência**, Guarapuava, v.7, n.3, p.441-460, 2011.

COUTINHO, E. F.; FRANCHINI, E. R.; MACHADO, N. P. CASAGRANDE, J. G. **Propagação de mirtilo do tipo Rabbiteye por estaquia e alporquia**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. 34 p. (Embrapa Clima Temperado. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 50).

DENAXA, N. K.; VEMMOS, S. N.; ROUSSOS, P. A. The role of endogenous carbohydrates and seasonal variation in rooting ability of cuttings of an easy and a hard to root olive cultivars (*Olea europea* L.). **Scientia Horticulturae**, v.143, p.19-28, 2012.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de Plantas Frutíferas**. Embrapa informação tecnológica, Brasília, DF, 2005. 221p.

HAN, H.; Zhang, S.; Sun, X. A review on the molecular mechanism of plants rooting modulated by auxin. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.3, p.348-353, 2009.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; ROBERT, G. **Plant propagation: principles and practices**. 7.ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 880p.

LIMA, K. P.; BUENO, P. M. C.; CUNHA, M. A. A.; RONCATI, R.; GIONGO, C. Physical-Chemical Characterization of the Green Mulberry Grown in Southwestern Paraná. **World Congress of Food Science and Technology**, Foz do Iguaçu, Parana, Brazil, 2012.

MAIA, A. J.; BOTELHO, R. V. Reguladores vegetais no enraizamento de estacas lenhosas da amoreira-preta cv. Xavante. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 323-330, 2008.

MOUBAYIDIN, L.; PERILLI, S.; IOLO, R. D.; DI MAMBRO, R.; COSTANTINO, P.; SABATINI, S. The Rate of Cell Differentiation Controls the Arabidopsis Root Meristem Growth Phase. **Current Biology**, n. 20, p.1138-1143, 2010.

PALINOVA, O. A.; BALAKHONTSEV, E. N.; PRASOLOVA, M. F.; TURKINA, M. V. Sucrose-phosphate synthase, sucrose synthase and invertase in sugarbeet leaves. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.49, n.1, p.68-73, 2002.

PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; RAMOS, J. D.; VALE, M. R. do; SILVA, C. R. de R. e. **Fruticultura Comercial: propagação de plantas frutíferas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 137 p.

SILVA, K. N.; PIO, R.; TADEU, M. H.; ASSIS, C. N. de; CURI, P. N.; MOURA, P. H. A.; PATTO, L. S. Produção de mudas de framboeseira negra por diferentes métodos de propagação vegetativa. **Ciência Rural**, v.42, n.3, p.218-422, 2012.

STENVALL, N.; PIISILÄ, M.; PULKKINEN, P. Seasonal fluctuation of root carbohydrates in hybrid aspen clones and its relationship to the sprouting efficiency of root cuttings. **Canadian Journal of Forest Research**, v.39, n.8, p.1531-1537, 2009.

VILLA, F.; PIO, R.; CHALFUN, N. N. J.; GONTIJO, T. C. A.; DUTRA, L. F. Propagação de amoreira-preta utilizando estacas lenhosas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n.4, p.829-834, 2003.

VIGNOLO, G. K.; PICOLOTTO, L.; GONÇALVES, M. A.; PEREIRA, I. D. S.; ANTUNES, L. E. C. Presença de folhas no enraizamento de estacas de amoreira-preta. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.3, p.467-472, 2014.

WIESMAN, Z.; LAVEE, S. Relationship of carbohydrate sources and índole-3-butyric acid in olive cuttings. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.22, p.811-816, 1995.

6. CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados obtidos nas condições experimentais estabelecidas nesta pesquisa, pode-se concluir que:

A propagação da espécie *R. erythroclados* foi eficiente via cultura de tecidos, utilizando a concentração de 5 μ M de benzilaminopurina para a multiplicação *in vitro*;

O enraizamento de *R. erythroclados* pode ser realizado *ex vitro* em casa de vegetação, sem a adição de regulador vegetal, atividade esta que já culmina com a aclimatização das plantas;

A propagação de *R. brasiliensis* via estacas caulinares não foi eficiente nas condições trabalhadas, sendo que a máxima porcentagem de enraizamento alcançada foi de 16%.

A estaquia radicial de *R. brasiliensis* não é viável.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desde os estudos preliminares, várias dificuldades foram encontradas para a realização deste trabalho, como a baixa porcentagem de enraizamento de estacas da espécie *R. erythroclados*, e a dificuldade no estabelecimento *in vitro* e multiplicação de *R. brasiliensis*, com uma alta porcentagem de oxidação de explantes.

Além disso, as altas taxas de mortalidade de estacas caulinares de *R. brasiliensis* podem estar relacionadas à pilosidade das folhas, que dificulta o processo de desinfestação das mesmas, e pode favorecer a contaminação por patógenos. A oxidação dos compostos fenólicos também pode ser uma das responsáveis pela mortalidade das estacas, o que pode ser estudado em trabalhos futuros.

As mudas obtidas nos trabalhos preliminares de estaquia foram plantadas na Estação Experimental do Cangüiri, da Universidade Federal do Paraná, para a avaliação da fenologia e produção das mesmas, porém, não foi possível a obtenção de resultados devido a problemas fitossanitários com as plantas, e à impossibilidade de utilização de agroquímicos para o controle de doenças. Houve uma elevada incidência de doenças nos frutos, que tornavam-se mumificados antes do ponto de colheita. Este é um problema que precisa ser estudado para viabilizar o cultivo das amoreiras-verdes.

Todavia, os resultados obtidos atenderam às expectativas para estabelecer protocolos de propagação das duas espécies trabalhadas, sendo que os mesmos poderão ser otimizados em trabalhos futuros.

Sugere-se para as futuras pesquisas, estudar a estaquia caulinar da espécie *Rubus erythroclados* em diferentes datas de coleta e com diferentes concentrações de auxinas, visando tornar a propagação desta espécie mais barata e acessível ao produtor.

Para melhorar a eficiência da propagação da espécie *Rubus brasiliensis*, que apresentou dificuldade de enraizamento via macropropagação, sugere-se que sejam realizados trabalhos com a micropropagação da mesma. Entretanto, para o estabelecimento *in vitro* desta espécie, são ainda necessários mais estudos principalmente voltados para o controle da elevada

oxidação observada nos explantes. O uso de antioxidantes e de outras técnicas para o isolamento *in vitro* dessa espécie podem favorecer o seu estabelecimento *in vitro*.