

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



Dissertação

**RADIAÇÃO GAMA E CONSERVAÇÃO IN VITRO DE
AMOREIRA-PRETA**

Natália Dias Gomes da Silva

Pelotas, 2013

Natália Dias Gomes da Silva

**RADIAÇÃO GAMA E CONSERVAÇÃO IN VITRO DE
AMOREIRA-PRETA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiologia Vegetal.

Orientador: Dr. José Antonio Peters

Co-Orientadores: Dr. Leonardo Ferreira Dutra

Dr. Valmor João Bianchi

Pelotas, 2013

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

S586r Silva, Natália Dias Gomes da
Radiação gama e conservação in vitro de amoreira-
preta / Natália Dias Gomes da Silva ; orientador José
Antonio Peters; co-orientadores Leonardo Ferreira
Dutra e Valmor João Bianchi - Pelotas,2013.-53f. ; il.-
Dissertação (Mestrado) –Programa de Pós-Graduação
em Fisiologia Vegetal.Instituto de
Biologia.Universidade Federal de Pelotas. Pelotas,
2013.

1.Rubus 2.Mutação 3.Micropropagação I.Peters,
José Antonio(orientador) II .Título.

Banca examinadora:

Eng. Agr. Dr. Leonardo Ferreira Dutra
(Presidente)

Eng. Agr. Dr. Luis Eduardo Corrêa Antunes

Eng. Agr. Dr. Paulo Celso de Mello Farias

Aos meus pais, Volnei e Dorotéia;
A minhas irmãs Christine, Jessica, Carolina e Gabriela;
A meu noivo, André.

OFEREÇO E DEDICO

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida e por ter-me proporcionado força e coragem durante o transcorrer desta etapa.

Aos meus pais, Volnei e Dorotéia por terem me concedido a vida e terem me dado carinho, amor, educação e suporte que possibilitaram trilhar este caminho.

A minhas irmãs, Christine, Jessica, Carolina e Gabriela, pelo amor, carinho e amizade.

Ao meu noivo André, pelo amor, carinho, dedicação prestados durante essa jornada, estando sempre ao meu lado, apoiando-me, dando-me força e coragem para prosseguir.

Ao Professor José Antonio Peters, pela orientação, amizade, e ensinamentos transmitidos durante a execução deste trabalho.

Ao Leonardo Dutra, por ter me inserido na pesquisa, e em especial pelo carinho, amizade e dedicação prestados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pela oportunidade de realização do curso e aos professores que contribuíram para minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de Mestrado.

Aos colegas e amigos dos Laboratórios Cultura de Tecidos e de Biologia Molecular da Embrapa pela amizade, momentos de convívio, incentivo e auxílio na execução das atividades. Em especial a Lorena Donini, Kerlley Mayer, Fernanda Zacarias, Laura Sommer e Josiane Mendonça, pelo carinho, amizade, disponibilidade e companheirismo prestados durante esta jornada.

Aos amigos e colegas do Programa de pós-graduação em Fisiologia Vegetal, em especial a Cristina Weiser, pela fiel amizade, carinho e disponibilidade.

Ao centro de Oncologia do Departamento de Radiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas.

A todos os que contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

Resumo

SILVA, Natália Dias Gomes da. Radiação gama e conservação in vitro de Amoreira-preta, 2013. 53f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A amoreira-preta é pertencente ao gênero *Rubus* e o seu cultivo apresenta grande potencial de crescimento. No entanto, programas de melhoramento ainda buscam cultivares com maior produtividade, sabor mais doce, maior tamanho das frutas, plantas com hastes eretas e principalmente sem espinhos. Devido a essas necessidades, a radiação gama e a técnica de micropropagação, tornam-se uma possibilidade na indução, acompanhamento e armazenamento de germoplasma. Com isso o presente trabalho teve como objetivo irradiar, com diferentes doses de raios Gama, explantes de amoreira-preta estabelecidos in vitro, a fim de induzir alterações, além de buscar alternativas que possibilitem o armazenamento do germoplasma de amoreira-preta, por até 120 dias a 6°C. Para isso, explantes contendo uma gema axilar foram irradiados com diferentes doses de radiação gama (0, 5, 10, 20 e 40 Gy) e cultivados in vitro. Para o experimento de crescimento lento também foram usados segmentos nodais contendo uma gema, os quais foram cultivados por 30, 60, 90 e 120 dias a 6°C em meio de cultura com diferentes concentrações de sacarose (15, 30 e 45 g L⁻¹), presença ou ausência de manitol e posteriormente transferidos para sala de crescimento, com temperatura de 24°C, por 30 dias. Para a percentagem de multiplicação, comprimento de parte aérea e de raízes foi observado crescimento com aumento da radiação para ambas cultivares, contudo o comprimento de raízes aumentou até 20 Gy, para ambas cultivares. O número de raízes, foi crescente até 5 Gy, seguido de redução conforme aumento da dose de radiação. No crescimento lento, foi observado um aumento gradual na taxa de multiplicação até os 120 dias, a presença do manitol e da sacarose no meio de cultura reduziu a taxa de multiplicação, para ambas cultivares, evidenciando a importância destes osmorreguladores na redução do crescimento. Após o retorno à sala de crescimento, foi verificado se os explantes retornaram as taxas de normais multiplicação. Com isso, pode-se concluir que a radiação promove alterações em explantes de amoreira-preta e que a adição de osmorreguladores no meio de cultura proporciona redução na taxa de multiplicação, durante o período de armazenamento ao frio, porém não afeta a taxa de multiplicação após o retorno as condições padrões em sala de crescimento.

Palavras-chave: *Rubus*, mutação, micropropagação.

Abstract

SILVA, Natália Dias Gomes da. **Culture in vitro of blackberry: gamma radiation and germplasm conservation**, 2013. 53f. Paper (Master of Science) Post Graduation Program in Plant Physiology of Federal University of Pelotas, Pelotas.

Blackberry is belonging to the genus *Rubus*, and cultivate this has great potential for growth, however, still seek improvement programs cultivars with higher productivity, taste sweeter, larger fruits, plants with upright stems and mostly thornless. Because of these needs, gamma radiation and micropropagation technique, become a possibility in the induction, monitoring and storage germplasm. With this it aimed to radiate with different doses of gamma rays, explants of blackberry established in vitro, to induce changes compared to non-irradiated explants, and seek alternatives that enable the storage of germplasm blackberry black, stored for 120 days at a temperature of 6 ° C and subsequently verify the return rate of multiplication of explants. For this, containing an axillary bud explants were irradiated with different doses of gamma radiation (0, 5, 10, 20 and 40 Gy) and cultured in vitro. For the experiment of slow growth were also used micro-cuttings with one bud, which were cultured for 30, 60, 90 and 120 days at 6 ° C and grown in culture medium with different concentrations of sucrose (15, 30 and 45 g L⁻¹) and presence or absence of mannitol and subsequently transferred to a growth chamber with a temperature of 24 ° C for 30 days. For a percentage multiplication, length of shoot and root growth was observed with increasing radiation for both cultivars, however the length of roots increased up to 20 Gy, for both cultivars. The number of roots was increased to 5 Gy, followed by reduction according to the increase of the radiation dose for the experiment slow growth was observed a gradual increase in multiplication rate until 120 days, the presence of mannitol and sucrose in the medium culture reduced the rate of multiplication, for both cultivars, indicating the importance of these osmoregulators in slow growth. After returning to growth room, it was found that the explants returned their metabolic activities, returning the rates indicated multiplication per explant. Thus, it can be concluded that the radiation causes changes in explants of blackberry and adding osmorregulators in the culture medium provides a reduction in the rate of proliferation during the storage period the cold, but does not affect the rate multiplied after returning to room growth.

Key words: *Rubus*, mutation, micropropagation.

Sumário

1	Resumo.....	08
2	Abstract.....	09
3	Introdução Geral.....	11
4	Artigo I - Micropropagação de amoreira-preta cvs. Tupy e Xavante submetida à radiação gama.....	14
4.1	Resumo.....	15
4.2	Abstract.....	16
4.3	Introdução.....	17
4.4	Material e Métodos.....	19
4.5	Resultados e discussão.....	21
4.6	Conclusões.....	25
4.7	Referências.....	25
4.8	Figuras.....	30
5	Capítulo II - Conservação in vitro de amoreira-preta: crescimento lento.....	36
5.1	Resumo.....	37
5.2	Abstract.....	38
5.3	Introdução.....	39
5.4	Material e Métodos.....	41
5.5	Resultados e discussão.....	42
5.6	Conclusões.....	44
5.7	Referências	44
5.8	Figuras	48
6	Conclusões Gerais.....	50
7	Referências.....	51

Introdução geral

A amoreira-preta faz parte de um grande grupo de plantas do gênero *Rubus*. Esse gênero pertence à família Rosaceae, na qual existem outros gêneros de importância para a fruticultura brasileira, dentre eles *Malus*, *Prunus* e *Pyrus*. O gênero *Rubus* forma um grupo diverso e bastante difundido, para o qual se estima existir entre 400 e 500 espécies de framboeseira e amoreira-preta na América, Europa, África e Ásia (ANTUNES et al., 2006).

A amoreira-preta é uma espécie nativa também no Brasil, onde ocorrem cinco espécies: *R. urticaefolius*, *R. erythroclados*, *R. brasiliensis*, *R. sellowii* e *R. imperialis*, as quais produzem frutos pequenos e com coloração branca, rosa, vermelha ou preta (REITZ, 1996). Contudo, nenhuma das espécies brasileiras foi domesticada. As cultivares de amoreira-preta utilizadas no país são o resultado de introduções, hibridações e seleções a partir de cultivares americanas (RASEIRA et al., 2008).

A área cultivada com amoreira-preta vem crescendo nos últimos anos, no mundo, são cultivados aproximadamente 20 mil ha, sendo 38,5% na Europa, 36% na América do Norte, 8% na América Central, 8% na América do Sul, 7,5% na Ásia, 1,5% na Oceania e 0,5% na África (CLARK, 2006). No Brasil, a área plantada é de pouco mais de 250 hectares (STRIK et al., 2007). Entretanto, esta apresenta grande potencial de crescimento por se tratar de uma espécie que, nas condições sul-brasileiras, pode ser cultivada de forma orgânica, adaptando-se a pequenas propriedades, capaz de produzir frutos de elevado valor nutricional. Além disso, o fruto possui capacidade de servir de alimento funcional, devido às substâncias antioxidantes e pelas propriedades anti-inflamatórias (RAMIREZ et al., 2011).

No Brasil, o programa de melhoramento com amoreira-preta foi iniciado na década de 70, inicialmente com a introdução de uma pequena coleção de cultivares, da qual faziam parte 'Brazos', 'Cherokee' e 'Comanche', além de um clone originário

do Uruguai, cuja identidade era desconhecida. Dois ou três anos após esta introdução, foram trazidas sementes de cruzamentos realizados na Universidade de Arkansas, Estados Unidos, que originaram cerca de 12 mil “seedlings”, nos quais foram feitas as primeiras seleções (RASEIRA et al., 2008). Dentre as cultivares melhoradas pelo programa de melhoramento genético da Embrapa Clima Temperado encontram-se as cultivares Negrita, Ébano, Guarani, Caingangue, Tupy e a Xavante, sendo utilizado para este trabalho as duas últimas cultivares citadas.

A cv. Tupy é atualmente a cultivar de amoreira-preta mais plantada no Brasil. É resultante de cruzamento realizado entre ‘Uruguai’ e a cv. Comanche, lançada pela Embrapa Clima Temperado na década de 90. Caracteriza-se por ser de porte ereto, vigorosa, com espinhos, perfilhamento médio e floresce de setembro a outubro. A colheita, nas condições de Pelotas, vai de meados de novembro a início de janeiro. As frutas têm 8 a 10g de peso médio, sabor equilibrado acidez/açúcar e com teor de sólidos solúveis entre 8 e 10° Brix. Além de baixa necessidade em frio, quando comparadas com outras cultivares como a Arapaho, que necessita de aproximadamente 500 horas (RASEIRA et al., 2008).

A cultivar Xavante é um lançamento conjunto da Embrapa Clima Temperado e da Universidade de Arkansas. Resultante de sementes coletadas em Clarksville, AR, de uma população resultante de cruzamento entre as seleções A. 1620 e A. 1507, sendo, portanto, segunda geração deste cruzamento, selecionada em Pelotas. Suas hastes são vigorosas, eretas e sem espinhos. É uma cultivar de baixa necessidade em frio, com necessidade de aproximadamente de 300 horas, e bastante produtiva, porém menos que cultivares com espinho. A floração inicia em setembro estendendo-se até outubro e a colheita inicia em meados de novembro. As frutas têm forma alongada, firmeza média, sabor doce-ácido, predominando a acidez, com teor de sólidos solúveis em torno de 8° Brix, com peso médio de 6 g (RASEIRA et al., 2008).

A amoreira-preta ainda apresenta características importantes para o melhoramento genético convencional, como o sabor mais doce das frutas, maior tamanho, firmeza e conservação das mesmas, ausência de reversão de cor das frutas após a colheita, plantas de hastes eretas e preferencialmente sem espinhos (RASEIRA et al., 2012). Além disso, é relatado que a cultura é afetada por fitonematóides, tais como o nematóide-das-galhas (*Meloidogyne* spp.), o nematóide-das-lesões (*Pratylenchus* sp.) e o nematóide-adaga (*Xiphinema* spp.), por doenças

fúngicas, bacterianas e insetos-praga (GOMES, 2008), sendo também a resistência a estas doenças uma característica desejável.

Em geral, as espécies frutíferas são perenes, de longo ciclo vegetativo, de porte relativamente grande e com alto nível de heterozigosidade, o que dificulta e aumenta o tempo necessário para um programa de melhoramento genético por meio do método convencional de hibridização. Assim, a seleção de uma característica particular, pode ser um processo longo, considerando o período juvenil (2-5 anos) e o tempo necessário adicional para avaliação de uma característica importante (CABONI et al., 2000).

Com isto, a rotina dos melhoristas consiste em criar e ampliar variabilidade, selecionar genótipos desejáveis e testá-los em diferentes ambientes, para um ajuste que permita a expressão máxima do seu potencial. Assim, o melhoramento genético tem desempenhado um importante papel no progresso da agricultura, pois possibilita aos agricultores o cultivo de constituições genéticas de alto potencial produtivo e com caracteres agrônômicos de interesse na cadeia produtiva (BERTAN, 2005).

A fonte de variabilidade genética pode ser espontânea ou artificialmente induzida, porém a ocorrência de mutações espontâneas na natureza é relativamente baixa e de difícil identificação por estas serem na sua maioria deletérias (ALLARD, 1960). As mutações podem ser profundamente intensificadas pelo emprego de agentes mutagênicos químicos ou físicos, como por exemplo, raios gama (COIMBRA et al., 2004).

A irradiação com raios gama é a via mais utilizada para induzir mutação em plantas (PREDIERI; ZIMMERMANN, 2001), pois possuem precisa dosimetria, alta e uniforme penetrabilidade nos sistemas celulares, podendo ser realizada em várias fases de desenvolvimento da planta. As técnicas de indução de mutação como o uso destas radiações, têm-se mostrado eficiente na produção de variabilidade genética e, por isso, utilizadas em programas de melhoramento de plantas (JOSEPH et al., 2004). Além disso, a associação desta técnica com a cultura de tecidos promove grande avanço no tempo necessário para o desenvolvimento de uma nova cultivar.

As técnicas de cultura de tecidos têm sido empregadas de diferentes formas no desenvolvimento de cultivares superiores de plantas, oferecendo novas alternativas aos programas de melhoramento em suas diferentes fases. A propagação vegetativa *in vitro* além de aumentar a capacidade de multiplicação, melhora as condições

fitossanitárias, possibilitando a obtenção de material vegetativo em maior quantidade em um menor espaço de tempo (SOUZA et al., 2006)

Como a amoreira-preta já possui um protocolo definido de produção de mudas via micropropagação, o desafio é mantê-las pelo máximo tempo possível, tanto para reduzir o uso de mão de obra, quanto para garantir a conservação do material genético. Uma alternativa é a preservação do germoplasma in vitro, visto que a conservação desta cultura é feita a campo, onde pode ocorrer misturas varietais através das brotações radiculares (rebentos), ou em Bancos de Conservação de Germoplasma (BAG), no entanto estes necessitam de um amplo espaço.

Além disso, a conservação in vitro pode ser utilizada para manter o germoplasma protegido, para a recuperação de genes de interesse, produção de matrizes isentas de doenças, manter fidelidade genética da planta matriz, redução de mão de obra e espaço a campo, e para evitar possível mistura na conservação ex vitro. E, com isso, a cultura in vitro auxilia com a conservação desta espécie, pois permite a manutenção de grande número de acessos em pequeno espaço físico, livre dos riscos existentes a campo, reduzindo os custos de manutenção e garantindo a fidelidade genética (FARIA et al., 2006).

Os protocolos de conservação in vitro devem objetivar a máxima sobrevivência e estabilidade genética com a mínima frequência de subcultivos (NAIDU; SREENATH, 1999). Existem dois sistemas básicos de conservação in vitro: por meio da limitação do crescimento para taxas mínimas (crescimento lento) e mediante a supressão total do metabolismo celular via criopreservação (VIEIRA, 2000). O sistema de crescimento lento proporciona opções de armazenamento a curto e médio prazo, reduzindo o metabolismo da planta sem afetar sua viabilidade, enquanto na técnica de criopreservação é possível armazenar o material vegetal por longos prazos (ROCA et al., 1991).

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi utilizar a radiação gama, associada a técnicas de cultivo in vitro, como fonte potencial de geração de variabilidade em brotações regeneradas de explantes de amoreira-preta cvs. Tupy e Xavante, além buscar alternativas que possibilitem o conservação do germoplasma da cultivar Tupy.

Artigo I

**Micropropagação de amoreira-preta cvs. Tupy e Xavante submetidas à
radiação gama**

A ser submetido à revista Pesquisa Agropecuária Brasileira

1
2 **Micropropagação de amoreira-preta cvs. Tupy e Xavante submetidas à radiação**
3 **gama**
4

5 Natália Dias Gomes da Silva⁽¹⁾, Leonardo Ferreira Dutra⁽²⁾, Valmor João Bianchi⁽¹⁾,
6 Lorena Pastorini Donini⁽²⁾ e José Antonio Peters⁽¹⁾
7

8 ⁽¹⁾Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica,
9 Campus Universitário, UFPel, Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS. E-mail:
10 nataliadiasgomes@hotmail.com, valmorjb@yahoo.com, japeters1@hotmail.com, ⁽²⁾Embrapa
11 Clima Temperado, Rodovia BR 392, km 78, Caixa Postal 403, CEP 9601-971 Pelotas, RS. E-
12 mail leonardo.dutra@embrapa.br, lorenadonini@yahoo.com.br.
13

14 Resumo - A amoreira-preta (*Rubus* spp.) pertence à classe das pequenas frutas, com
15 perspectiva de ampliação de cultivo. Trabalhos de melhoramento genético de amoreira-preta
16 vêm sendo realizados visando o desenvolvimento de cultivares sem espinho, com alta
17 produtividade, maior peso de frutos e resistência pós-colheita, no entanto, as técnicas de
18 melhoramento convencional demandam um longo período de tempo para seleção de novos
19 genótipos. Com isso, o objetivo do presente trabalho foi irradiar com diferentes doses de raios
20 Gama, explantes de amoreira-preta estabelecidos in vitro, a fim de induzir alterações
21 moleculares. Para tal, foi realizado experimento em esquema fatorial, testando-se duas
22 cultivares (Tupy e Xavante) e diferentes doses de radiação gama (0, 5, 10, 20 e 40 Gy),
23 cultivadas em meio básico MS adaptado para cada fase do processo de micropropagação.
24 Como explante foram utilizados segmentos nodais compostos por uma gema axilar. A taxa de
25 sobrevivência aumentou até 20 Gy para Tupy, enquanto para Xavante a resposta foi inversa.

26 Para a percentagem de multiplicação, comprimento de parte aérea e de raízes foi observado
27 crescimento com aumento da radiação para ambas cultivares, contudo o comprimento de
28 raízes aumentou até 20 Gy. O número de raízes, foi crescente até 5 Gy, seguido de redução
29 conforme aumento da dose. De acordo com os resultados, a dose de 40 Gy pode ser indicada
30 para maior multiplicação de ambas cultivares, enquanto que 20 Gy pode servir como um
31 indutor do crescimento de amoreira-preta.

32 Termos para indexação: Mutação; *Rubus*; cultivo in vitro.

33

34

35 **Micropropagation of blackberry cvs. Tupy and Xavante subjected to gamma radiation**

36

37 Abstract- The blackberry (*Rubus* spp.) belongs to class of small fruits, with perspective of
38 magnification of cultivation. Works genetic improvement mulberry-preta come being
39 accomplished seeking the development of cultivars without thorn, with high productivity,
40 largest weight of fruits and resistance postharvest, however, the techniques of conventional
41 improvement demand a long period of time to selection of new genotypes. With this, the
42 objective of the present work was radiate, with different doses of rays Gama, explants
43 mulberry-preta established in vitro, in order of inducing molecular alterations. To such, was
44 conducted experiment in factorial scheme, testing it if two cultivars (Tupy and Xavante) and
45 different doses of gamma radiation (0, 5, 10, 20 and 40 Gy), cultivated in basic medium MS
46 adapted for each phase of process of micropropagation. How explant were used nodal
47 segments compounds by a yolk axillary. The survival rate increased until 20 Gy for Tupy,
48 while for Xavante the response was inverse. To the percentage of multiplication, length of
49 aerial part and from roots growth was observed with increased radiation to both cultivars, yet
50 the length of roots increased until 20 Gy. The number of roots, was crescent until 5 Gy,

51 followed by reduction according dose increase. De agreement with the results, the dose of 40
52 Gy may be indicated to largest multiplication of both cultivars, whereas 20 Gy can serve as
53 one inducer of growth of blackberry.

54 Terms index: Mutation; *Rubus*; in vitro culture.

55

56

Introdução

57 A produção nacional das principais espécies frutíferas de clima temperado é insuficiente
58 para atender à demanda interna, gerando uma crescente necessidade de importação de frutas
59 que poderiam ser produzidas no Brasil. Tal situação propicia grandes possibilidades de
60 mercado para a produção de frutas frescas e industrializadas, particularmente nos Estados da
61 região Sul e Sudeste (ANTUNES, 2002).

62 Dentre as várias opções de espécies frutíferas com boas perspectivas de comercialização
63 tem-se amoreira-preta (*Rubus* spp.) como uma das mais promissoras. A produtividade desta
64 frutífera, para regiões de clima temperado e sob condições adequadas, pode alcançar até
65 10.000 kg ha⁻¹ ano⁻¹. Porém, a produção nacional desta fruta, é considerada baixa, embora
66 haja alta demanda da mesma (ANTUNES et al., 2006). Desse modo, a amoreira-preta está
67 entre as espécies que apresentam boas perspectivas de ampliação do cultivo e geração de
68 renda, principalmente em áreas de agricultura familiar, em função da necessidade de uso
69 intensivo de mão de obra e baixo índice de mecanização (PIO, 2008; YAMAMOTO et al.,
70 2013).

71 A qualidade das frutas, pequeno tamanho das sementes, a aparência, firmeza e,
72 principalmente, sabor, são caracteres necessários à boa produção e comercialização da
73 amoreira-preta. A conservação pós-colheita é outra característica que vem sendo buscada ao
74 longo das gerações, pois as cultivares utilizadas atualmente possuem baixa conservação, o que
75 ocasiona algumas vezes a perda de qualidade da fruta (ANTUNES et al., 2006). Além destes,

76 trabalhos de melhoramento genético de amoreira-preta vêm sendo realizados visando o
77 desenvolvimento de cultivares sem espinho, com alta produtividade e maior peso de frutos
78 (ANTUNES, 2002).

79 Há também relatos de que esta cultura é afetada por fitonematóides, tais como o
80 nematóide-das-galhas (*Meloidogyne* spp.), o nematóide-das-lesões (*Pratylenchus* sp.) e o
81 nematóide-adaga (*Xiphinema* spp.), por doenças fúngicas, bacterianas e insetos-praga
82 (GOMES, 2008). No entanto, ainda estão sendo buscados trabalhos que visem contornar estas
83 situações para a cultura, tornando-se necessária a aplicação de estudos que busquem genótipos
84 resistentes a essas características. Assim, o melhoramento genético é chave para a introdução
85 de características desejáveis em cultivares comerciais de amoreira-preta.

86 Em geral, as espécies frutíferas são perenes com ciclo vegetativo longo e com alto nível
87 de heterozigosidade, o que dificulta e aumenta o tempo necessário para um programa de
88 melhoramento genético por meio do método convencional de hibridização (CABONI et al.,
89 2000). Assim, a seleção de uma característica particular, pode ser um processo longo,
90 considerando o período juvenil (2-5 anos) e o tempo necessário adicional para avaliação de
91 uma característica importante. Desse modo, outros métodos podem ser utilizados para reduzir
92 o tempo de seleção de uma determinada característica, como através da transformação
93 genética ou da utilização de mutação induzida (PREDIERI & ZIMMERMANN, 2001).

94 As mutações ocorrem espontaneamente na natureza, porém com ocorrência
95 relativamente baixa e de difícil identificação. As mutações podem ser profundamente
96 intensificadas pelo emprego de agentes mutagênicos químicos ou físicos, como por exemplo,
97 raios gama (COIMBRA et al., 2004), no processo de mutação induzida. A irradiação com
98 raios gama é a via mais utilizada para induzir mutação em plantas, pois possuem dosimetria
99 precisa, alta uniformidade e penetrabilidade nos sistemas celulares, podendo ser realizada em
100 várias fases de desenvolvimento da planta (PREDIERI & ZIMMERMANN, 2001).

101 A dose ideal para promover mutações, sem a ocorrência de perdas no rendimento do
102 organismo irradiado, é tecido-específica, variando a radiosensibilidade com a espécie, com a
103 cultivar, com as condições fisiológicas da planta e com a manipulação do material irradiado
104 antes e depois do tratamento (PATADE & SUPRASANNA, 2008). Portanto, diferentes
105 tecidos respondem de forma própria, sendo necessária a realização de testes de
106 radiosensibilidade para determinar a dose ideal (GAZZANEO et al., 2007).

107 As técnicas de cultura de tecidos têm sido empregadas de diferentes formas no
108 desenvolvimento de cultivares superiores de plantas, oferecendo novas alternativas aos
109 programas de melhoramento em suas diferentes fases (PATADE & SUPRASANNA, 2008).
110 Esta tecnologia é atraente para estudos de indução de mutações pelo fato de poder manipular,
111 num pequeno espaço, uma grande população de células haploides e diploides, as quais podem
112 dar origem a novas plantas. Com isso, a indução e seleção de mutantes podem ser mais
113 rápida, simples, barata e eficiente para a obtenção de genótipos desejados (GAZZANEO et
114 al., 2007).

115 Assim, visando o aumento na variabilidade genética, para a geração de novos genótipos
116 com caracteres de importância agrônômica, no presente trabalho objetivou-se irradiar, com
117 diferentes doses de raios Gama, explantes de amoreira-preta estabelecidos in vitro, a fim de
118 induzir alterações genéticas.

119

120

Materiais e métodos

121 Plantas de amoreira-preta, das cultivares Tupy e Xavante, mantidas em casa de
122 vegetação, foram utilizadas como fornecedoras de explantes. Meristemas foram excisados de
123 brotações e inoculados em meio de cultura MS, onde a cada 30 dias foram subcultivados até
124 obtenção de material suficiente para iniciar os experimentos de irradiação.

125 Para a multiplicação inicial, bem como para a micropropagação do material irradiado,
126 segmentos nodais contendo uma gema axilar, obtidas de brotações multiplicadas in vitro
127 foram inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), contendo
128 inositol (100 mg L⁻¹), sacarose (30 mg L⁻¹), ágar (7 g L⁻¹), benzilaminopurina (BAP) (1,0
129 mg.L⁻¹), pH ajustado em 6,2 antes da autoclavagem. Os segmentos nodais foram cultivados em
130 câmara de crescimento com densidade de fluxo de fótons de 40 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de
131 16 horas de luz e temperaturas de 25±2°C.

132 Para as irradiações, os segmentos nodais foram inoculados em placas de Petri contendo
133 20 mL de meio (ágar 7 g L⁻¹ e água). Foi utilizada fonte de ⁶⁰Co, com taxa de rendimento de
134 1,2204 Gy min⁻¹ para um campo de 30x30 cm e uma distância foco-objeto irradiado de 80 cm,
135 no Centro de Irradiação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas. Os
136 explantes foram submetidos às doses de 0, 5, 10, 20 e 40 Gy. O delineamento experimental
137 utilizado foi o inteiramente casualizado com seis repetições de seis explantes cada, cujos
138 tratamentos foram arranjados em esquema fatorial 2X5, sendo duas cultivares e cinco doses
139 de irradiações.

140 Após a irradiação, os segmentos nodais foram transferidos para meio de multiplicação e
141 cultivados nas condições citadas acima, dando-se início à condução dos experimentos. As
142 variáveis analisadas foram percentagem de explantes sobreviventes aos 60 dias após a
143 irradiação, considerando-se explante sobrevivente aquele que não morreu, não contaminou e
144 que apresentasse início do desenvolvimento. Foi analisada também a taxa de multiplicação
145 por explante e o comprimento da parte aérea, sendo estes avaliados aos 90 dias após a
146 irradiação.

147 Após as avaliações de multiplicação in vitro os explantes sobreviventes foram repicados
148 e transferidos para meio de enraizamento, constituído pelos sais do meio MS, acrescidos de
149 inositol (100 mg.L⁻¹), sacarose (30 g.L⁻¹), ágar (7 g.L⁻¹) e ácido naftaleno acético (ANA) (0,1

150 mg.L⁻¹) e, transferidos para câmara de crescimento por sete dias em condições de escuro e 30
151 dias na luz, com densidade de fluxo de fótons de 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura 25±2°C e
152 fotoperíodo de 16 horas. Decorrido esse período, as variáveis analisadas foram percentagem de
153 enraizamento, número de raízes por explante e comprimento médio das raízes.

154 Concluída esta etapa, os explantes foram cuidadosamente lavados em água corrente para a
155 remoção total do meio de cultura, e posteriormente submetidos à aclimatização. Esta etapa foi
156 conduzida em casa de vegetação, sob túnel baixo coberto com plástico para manutenção da
157 umidade, sendo as plantas transferidas para bandejas de isopropileno, com 72 células, contendo
158 Plantmax[®] e 4% de osmocote[®] (p/v). Decorridos 30 dias do início desse processo, foi avaliado o
159 índice de sobrevivência da mudas, contabilizando-se as plantas que sobreviveram ao processo de
160 transferência do cultivo in vitro para o ex-vitro.

161 Os dados obtidos foram inicialmente analisados quanto à sua normalidade (teste de
162 Shapiro-Wilk), e posteriormente submetidos à análise da variância ($p \leq 0,05$). Quando houve
163 significância estatística, os dados foram analisados por regressão.

164

165

Resultados e Discussão

166 Houve interação entre os fatores testados para as variáveis percentagem de
167 sobrevivência, taxa de multiplicação, número médio de raízes e média do comprimento de
168 raízes. Para a variável comprimento de parte aérea houve somente efeito do fator radiação. As
169 variáveis enraizamento e aclimatização das plantas não apresentaram significância estatística,
170 pois apresentaram 100% de plantas enraizadas e aclimatizadas respectivamente.

171 A percentagem de sobrevivência dos explantes da cultivar Tupy foi crescente até 20 Gy
172 de radiação com 89,35% de explantes sobreviventes, ocorrendo um decréscimo significativo
173 na dose de 40 Gy (Figura 1), com 66,60% de explantes sobreviventes. Resultados opostos a
174 estes foram encontrados em duas cultivares de pereira (*Pyrus* spp.), cvs. Ya-li e Carrick,

175 irradiadas com diferentes concentrações de raios gama (0, 5, 10, 20, 30, 40 Gy), onde
176 conforme aumentou-se a dose de radiação houve também redução na taxa de sobreviventes
177 (SILVA, 2009).

178 Para a cultivar Xavante observou-se efeito inverso a cultivar Tupy, ocorrendo uma
179 redução da percentagem de sobreviventes até a dose de 20 Gy com 56,08% de sobreviventes,
180 seguido de breve aumento na dose de 40 Gy com 59,29% de sobreviventes. O comportamento
181 verificado pode ter ocorrido devido ao fato de que a radiosensibilidade varia com a dose de
182 radiação, espécie e cultivar (D'AMATO 1992), podendo explicar a resposta diferencial das
183 duas cultivares.

184 Quando avaliada a taxa de multiplicação, observou-se aumento linear em relação à
185 dose de radiação para ambas cultivares (Figura 2), alcançado na dose de 40 Gy 17,21% e
186 19,71% de multiplicação por explante para a Xavante e Tupy, respectivamente, enquanto no
187 tratamento controle, ou seja, sem exposição à radiação, a cultivar Tupy apresentou 4,0% e a
188 Xavante 5,8% de multiplicação por explante. Pode-se inferir que esse fato é devido ao tecido
189 vegetal responder de maneira diferenciada à dose de radiação e a esta possuir efeito
190 estimulatório no desenvolvimento vegetal (BAJAJ, 1970). Desse modo, o aumento da
191 radiação gama proporcionou maior multiplicação dos explantes de amoreira-preta, sendo este
192 resultado considerado benéfico para a cultura.

193 Resultados semelhantes aos observados, foram encontrados por Al-Safadi et al. (2000)
194 em que a irradiação de explantes com baixas doses induziu a um aumento significativo (38%)
195 no número de microtubérculos de batata (*Solanum tuberosum*) em relação ao controle não
196 irradiado, contudo em doses altas observou-se redução do número de tubérculos.
197 Diferentemente, Wendt et al. (1999) ao analisarem entrenós de batatas irradiadas observaram
198 maiores médias de brotações por explante regenerado no tratamento controle não irradiado.

199 O comprimento médio da parte aérea foi crescente em relação à dose a que o tecido foi
200 exposto (Figura 3). Assim sendo, a dose de 40 Gy apresentou incremento significativo em
201 relação às demais doses, obtendo-se a média de 4,23 cm dos explantes de ambas as cultivares
202 submetidos a esta concentração de radiação, enquanto os explantes do tratamento controle
203 apresentaram média de 1,2 cm de comprimento. Resultados semelhantes foram obtidos em
204 mamona (*Ricinus communis*), com aumento no comprimento da parte aérea até a dose de 50
205 Gy de radiação (LOPES, 2012). Em contrapartida, estes resultados divergem dos encontrados
206 em Wasabi (*Wasabia japonica*) (HUNG & JOHNSON, 2008), petúnia (*Boungainvillea*
207 *spectabilis*) (BERENSCHOT et al., 2008), e em pereira (*Pyrus communis*) (SILVA, 2009),
208 que apresentaram redução no crescimento com o aumento das doses de radiação.

209 Em relação às variáveis radiculares, para ambas cultivares, o número médio de raízes
210 aumentou em relação à testemunha (0 Gy) na dose de 5 Gy, ocorrendo a partir desta uma
211 tendência à redução no número de raízes para ambas cultivares (Figura 4). Estes resultados
212 estão de acordo com os resultados encontrados em pereira, onde houve um pequeno aumento
213 no número de raízes quando foram expostos a baixas doses de radiação (SILVA, 2009). Isto
214 pode ter ocorrido devido às altas doses de radiação gama produzirem efeitos deletérios, ou
215 ainda diminuição do crescimento vegetal (WATANABE et al., 2000). Além disso, a radiação
216 gama interfere nos processos de divisão celular, culminando em crescimento alterado e
217 variabilidade morfológica (AMJAD & AMJUN, 2007).

218 Foi verificado maior comprimento das raízes na dose 20 Gy com 6,01 e 4,24 cm para
219 as cultivares Tupy e Xavante, respectivamente (Figura 5). Este comportamento foi crescente
220 até a referida dose, observando-se decréscimo no comprimento das raízes com a maior dose
221 de radiação. Resultados semelhantes foram encontrados em arroz, onde até a dose de 100 Gy
222 houve um incremento no comprimento das raízes, porém a partir desta dose houve uma
223 redução no comprimento das mesmas (SILVA, 2010).

224 Os resultados obtidos neste estudo podem ser explicados devido às respostas do
225 material biológico aos agentes mutagênicos serem dependentes de uma interação complexa
226 entre dose de radiação utilizada, tipo de explante e genótipo. A radiação gama pode ser
227 considerada como um dos principais indutores de mutação e de aberrações cromossômicas
228 estruturais, sendo que a dose ideal para promover mutações sem que haja perda no
229 rendimento do indivíduo irradiado é tecido-específica (PIMENTEL, 1990).

230 Além disso, a radiação pode ter seus efeitos influenciados por diversos fatores, como:
231 condições de armazenamento após a irradiação, teor de água do material, genótipo dos
232 indivíduos, modo de exposição, fase do ciclo celular, dosagem de radiação, grau de ploidia
233 dos cromossomos e o conteúdo de DNA por genoma haploide (CONGER & CARABIA,
234 1972; IQBAL & ZAHUR, 1975; BAHL & GUPTA, 1982; BUMP et al., 1982; GUDKOV &
235 GRODZINSKY, 1982; SANTOS, 1993). No entanto, os mecanismos pelos quais as plantas
236 reconhecem e respondem às doses a que foram expostas de radiação ainda não são
237 compreendidos (PRISTOV, 2013).

238 Com isso, pode-se inferir que a radiação gama possui efeito estimulatório quando
239 ministradas em baixas doses, porém em altas doses esse efeito pode ser contrário, reduzindo
240 os processos de crescimento e desenvolvimento vegetal, e por vezes tornando-se deletérios.
241 Além disso, convém salientar que não foram encontrados trabalhos sobre radiação gama em
242 amoreira-preta que avaliasse o comportamento da mesma in vitro. No entanto, há o relato
243 sobre o comportamento de amoreira-preta, irradiada com raios gama, a campo, os resultados
244 indicam que a radiação gama induz a alterações em características de interesse agrônomicas,
245 como mudança na qualidade dos frutos, aumento no conteúdo de ácido ascórbico, redução na
246 acidez, maior consistência dos frutos e o aumento da vida de prateleira (BASARAN &
247 KEPENEK, 2011).

248 Com isso, fica evidenciado a necessidade do acompanhamento do desempenho destas
249 plantas à campo e de análises moleculares para confirmação da variabilidade genética entre
250 plantas irradiadas e não irradiadas. Além de estudos que elucidem o comportamento
251 fisiológico e metabólico das plantas em respostas às doses de radiação.

252

253

254

Conclusões

255 A radiação Gama induz alterações fisiológicas, como o aumento na taxa de explantes
256 multiplicados, o aumento no comprimento de parte aérea e comprimento de raízes, em
257 explantes de amoreira-preta, quando irradiados com até 40 Gy.

258 A radiação gama induz aumento na taxa e multiplicação e no comprimento de parte
259 aérea de explantes de amoreira-preta para ambas cultivares testadas.

260

261

Referências Bibliográficas

262 AL-SAFADI, B.; AYYOUBI, Z.; JAWDAT, D. The effect of gamma irradiation on potato
263 microtuber production *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 61, p. 183–187, 2000.

264 AMJAD, M.; ANJUM, M.A. Effect of post-irradiation ageing on onion seeds. **Acta**

265 **Physiologia Plantarum**, v.29, p.63–69, 2007.

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

268 ANTUNES, L. E. C.; GONÇALVES, E. D.; TREVISAN, R. Alterações de compostos

269 fenólicos e pectina em pós-colheita de frutos de amora-preta. **Revista Brasileira de**

270 **Agrociência**, Pelotas, v. 12, p. 57-61, 2006.

271 BAHL, J.R.; GUPTA, P.K. Inheritance of two induced lethal chlorophyll mutations in

272 mungbean. **Current Science**, v.53, p.147-8, 1982.

- 273 BAJAJ, Y.P.S.; SAETTLER, A. W.; ADAMS, M. W. Gamma irradiation studies on seeds,
274 seedlings and callus tissue cultures of *Phaseolus vulgaris* L. **Radiation Botany**, v.10, p.119–
275 124, 1970.
- 276 BASARAN, P.; KEPENEK, K. Fruit quality attributes of blackberry (*Rubus sanctus*) mutants
277 obtained by ⁶⁰Co gamma irradiation. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.16, p.
278 587-592, 2011.
- 279 BERENSCHOT, A. S.; TULMANN NETO, A. ; ZUCCHI, M. I. ; QUECINI, V. Mutagenesis
280 in *Petunia x hybrida* Vilm. and isolation of a novel morphological mutant. **Brazilian Journal**
281 **of Plant Physiology**, v. 20, p. 95-103, 2008.
- 282 BUMP, E. A.; YU, N. Y.; BROWN, J. N. Radiosensitization of hypoxic tumor cells by
283 depletion of intracellular glutathione. **Science**, Washington. v.217, p.544-545, 1982.
- 284 CABONI, E.; LAUR, P.; D'ANGELI, S. *In vitro* plant regeneration from callus of shoot
285 apices i apple shoot culture. **Plant Cell Reports**, v.19, p.755-760, 2000.
- 286 CONGER, B.V.; CARABIA, J.V. Modification of the effectives of fission neutrons versus ⁶⁰
287 Co gamma radiation in barley seeds by oxygen and seed water content. **Radiation Botany**,
288 Great Britain, v.12, p.411-420, 1972.
- 289 COIMBRA, J. L. M.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C.; CHOCOROSQUI, V. R.;
290 GUIDOLIN, A. F. Criação de variabilidade genética no caráter ciclo vegetativo em aveia:
291 hibridação artificial x mutação induzida **Revista Brasileira de Agrociência**, v.10, p.159-166,
292 2004.
- 293 D'AMATO, F. Induced mutations in crop improvement: basic and applied aspects.
294 **Agriculture Mediterranea.**, v.122 p.31–60, 1992.
- 295 GAZZANEO, L.R.S; COLAÇO, W.; KIDO, E. A.; BENKO-ISEPPON, A. M.; HOULLOU-
296 KIDO, L. M. Efeito da Radiação Gama Sobre o Desenvolvimento *in vitro* de *Vigna*
297 *unguiculata*. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, p.27-29, 2007.

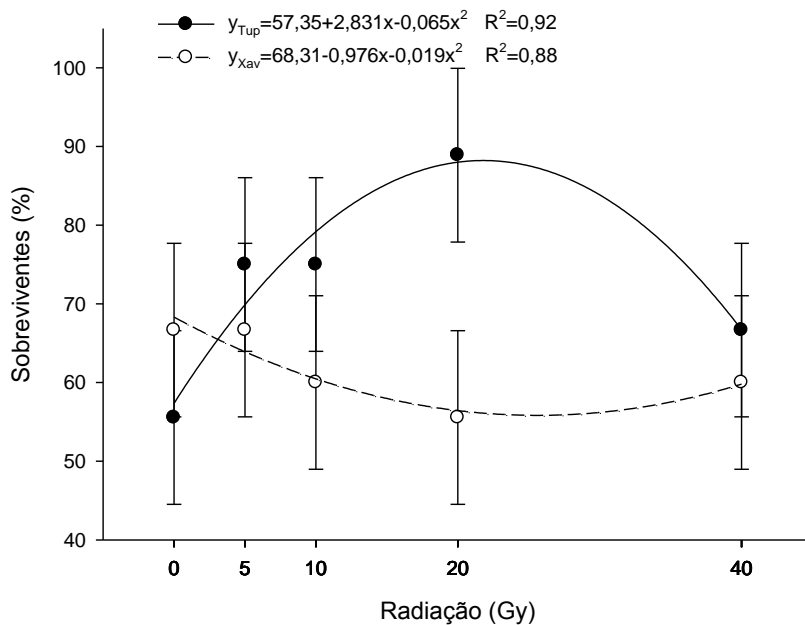
- 298 GOMES, C. B. Nematóides parasitas. In: Sistema de Produção de amoreira-preta. Sistemas de
299 Produção 12. **Embrapa Clima Temperado**, Pelotas, 2008. Versão eletrônica:
300 <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Amora/SistemaProducaoAmoreiraPreta/nematoides.htm>. Acesso em 18 de janeiro de 2013.
- 302 GUDKOV, I. N.; GRODZINSKY, D. M. Cell radiosensitivity variation in
303 synchronously dividing root meristems of *Pisum sativum* L. and *Zea mays* L. during the
304 mitotic cycle. **Internacional Journal of Radiation Biology**, v.41, p.401-409, 1982.
- 305 HUNG, C.D.; JOHNSON, K. Effects of ionizing radiation on the growth and allyl
306 isothiocyanate accumulation of *Wasabia japonica* *in vitro* and *ex vitro*. **In vitro Cellular and**
307 **Development Biology- Plant**, v.44, p.51–58, 2008.
- 308 IQBAL, J.; ZAHUR, M.S. Effects of acute gamma irradiation and developmental stages on
309 growth and yield of rice plants. **Radiation Botany**, v.15, p.231-240, 1975.
- 310 LOPES, A. M. **Alterações morfofisiológicas e bioquímicas em sementes de mamona**
311 **(*Ricinus communis* L.) submetidas à radiação gama cobalto60**. Dissertação (Mestrado).
312 Programa de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal. Instituto de Biologia. Universidade
313 Federal de Pelotas. Pelotas, 2012.
- 314 MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with
315 tobacco tissue cultures. **Plant Physiology**, v.15, p.473– 497, 1962.
- 316 PATADE, V.Y.; SUPRASANNA, P. Radiation induced *in vitro* mutagenesis for sugarcane
317 improvement. **Sugar Technology**, v.10, p.14-19, 2008.
- 318 PIO, R. O potencial de novas fruteiras. In: ENCONTRO DE FRUTICULTURA DOS
319 CAMPOS GERAIS, 2008, Ponta Grossa, PR. **Anais...** Ponta Grossa: UEPG, p.11-21. 2008.
- 320 PIMENTEL, M. C. G. **Indução de aberrações cromossômicas estruturais em milho (*Zea***
321 ***mays* L.) por radiação gama**. Viçosa, 1990. 86p. Dissertação (Mestrado em Genética e
322 Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa. 1990.

- 323 PREDIERI, S.; ZIMMERMANN, R.H. Pear mutagenesis: *In vitro* treatment with gamma-rays
324 and field selection for productivity and fruit traits. **Euphytica**, v.117, n.3, p.217-227, 2001.
- 325 PRISTOV. J. B.; SPASIC, M. SPASOJEVIC, I. Converting low dose radiation to redox
326 signaling **Plant signaling e behavior** . v.8, 2013.
- 327 SANTOS, M. V. F. D. L. **Resposta à radiação gama em sementes de milho (Zea mays L.)**
328 **sob a influência de agentes físicos e químicos**. 1993. 131p. Dissertação (Mestrado em
329 Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa. 1993.
- 330 SILVA, A. S. da. **Radiação gama na indução de variabilidade em cultivares de Arroz**
331 **irrigado**. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós Graduação em Fisiologia Vegetal.
332 Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2010.
- 333 SILVA, C. P. da. **Variabilidade genética induzida por radiação gama em pereira**
334 **cultivada *in vitro***. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Fisiologia
335 Vegetal. Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2009.
- 336 YAMAMOTO, L. Y.; KOYAMA, R.; BORGES, W. F. S.; ANTUNES, L. E. C.; ASSIS, A.
337 M.; ROBERTO, S. RUFFO. Substratos no enraizamento de estacas herbáceas de amora-preta
338 Xavante. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, p.15-20, 2013.
- 339 WATANABE, Y.; Yukawa, M.; Hee-Sun. K.; Nishimura, Y. **Radiation effects on growth**
340 **and seed germination of Arabidopsis**. Annual Report 1999–2000. National Institute of
341 Radiological Sciences, Anagawa, Chiba-shi, Japan, 2000.
- 342 WENDT, S.N.; PETERS, J. A.; OLIVEIRA, A. C.; BOBROWSKI, V. L.; COSTA, F. L. C.
343 da; MADRUGA, C. dos S.; VIGHI, I. L. Plant regeneration and molecular characterization of
344 potato cultivar Macaca, obtained form gamma-irradiated explants. **Journal of New Seeds**.
345 v.3, p.17-36, 1999.
- 346

347

Figuras

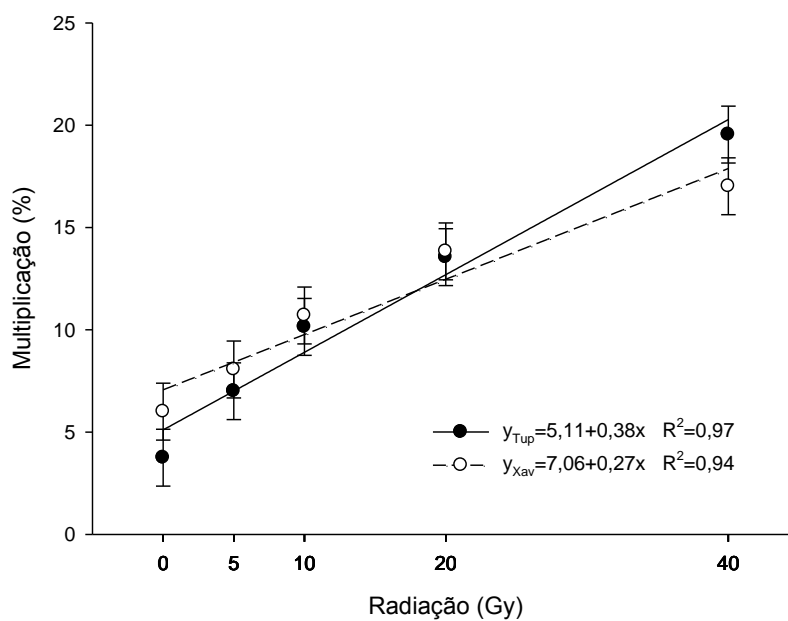
348



349

350 **Figura 1.** Percentagem de explantes sobreviventes de amoreira-preta (*Rubus* spp.) cvs. Tupy
 351 (Tup) e Xavante (Xav), submetidas a diferentes doses de radiação gama (^{60}Co). Rio Grande
 352 do Sul, 2012. Os pontos representam as médias e as barras os respectivos intervalos de
 353 confiança.

354



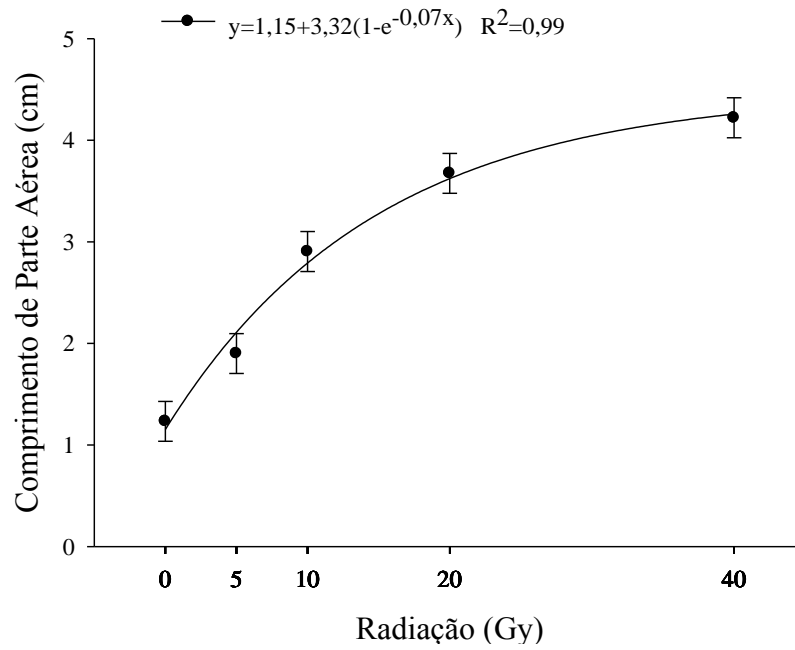
355

356 **Figura 2.** Percentagem de explantes, multiplicação in vitro de amoreira-preta (*Rubus* spp.)357 cvs. Tupy (Tup) e Xavante (Xav), submetidas a diferentes doses de radiação gama (^{60}Co). Rio

358 Grande do Sul, 2012. Os pontos representam as médias e as barras os respectivos intervalos

359 de confiança.

360

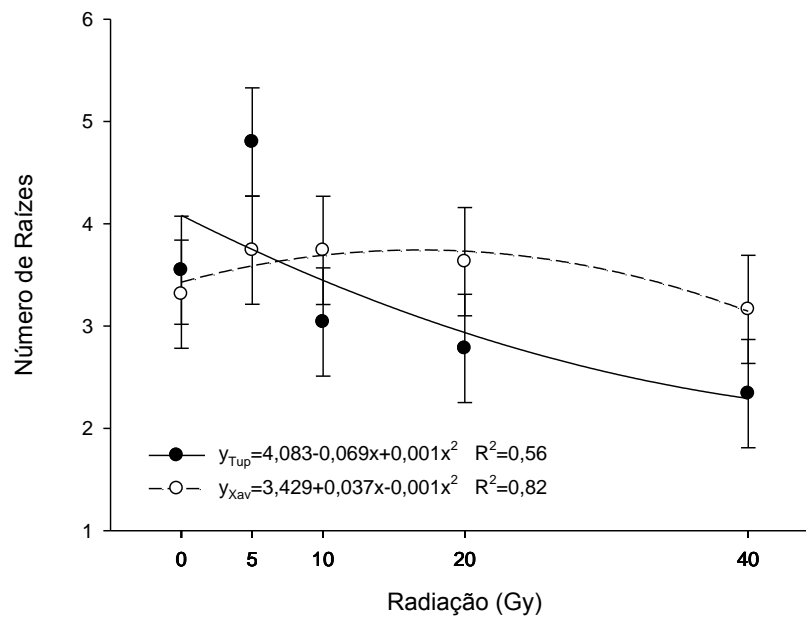


361

362 **Figura 3.** Comprimento médio da parte aérea de explantes de amoreira-preta (*Rubus* spp.),363 submetidos a diferentes doses de radiação gama (^{60}Co). Os pontos representam as médias e as

364 barras os respectivos intervalos de confiança.

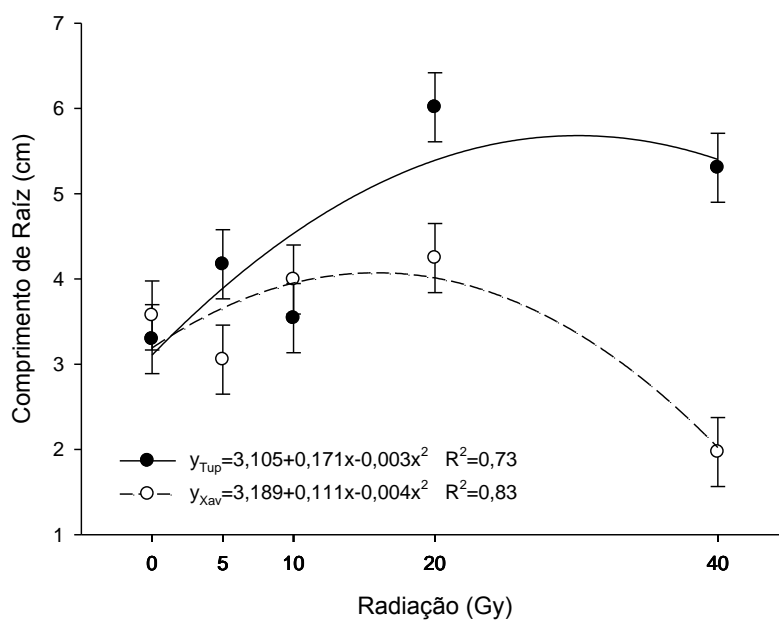
365



366

367 **Figura 4.** Número médio de raízes de amoreira-preta (*Rubus* spp.) cvs. Tupy (Tup) e Xavante
 368 (Xav), submetidas a diferentes doses de radiação gama (^{60}Co). Os pontos representam as
 369 médias e as barras os respectivos intervalos de confiança.

370



371

372 **Figura 5.** Comprimento médio de raízes de amoreira-preta cvs. Tupy (Tup) e Xavante (Xav)373 submetidas a diferentes doses de radiação gama (^{60}Co). Os pontos representam as médias e as

374 barras os respectivos intervalos de confiança.

Artigo II

Conservação in vitro de amoreira-preta: crescimento lento

A ser submetido à Revista Brasileira de Fruticultura

Conservação *in vitro* de amoreira-preta: crescimento lento

Natália Dias Gomes da Silva⁽¹⁾, Leonardo Ferreira Dutra⁽²⁾, Valmor João Bianchi⁽¹⁾,
Laura Reisdorfer Sommer⁽²⁾; Daiane Peixoto Vargas⁽²⁾; José Antonio Peters⁽¹⁾

Resumo

Em virtude da existência de vários genótipos de amoreira-preta, evidencia-se a necessidade do desenvolvimento de um método alternativo e complementar à conservação de germoplasma dessa espécie, uma alternativa é através do cultivo *in vitro*, com redução da temperatura da cultura e com a adição de osmorreguladores. Além disso, esta técnica ocupa pequeno espaço e redução de custos de manutenção. Com isso, objetivou-se buscar alternativas que possibilitem a conservação de germoplasma de amoreira-preta, por um período de até 120 dias em temperatura de 6°C. Segmentos nodais de amoreira-preta ‘Tupy’ foram submetidos a temperaturas de 6 °C durante 30, 60, 90 e 120 dias, em meio de cultura MS adicionado de diferentes concentrações de sacarose (15, 30 e 45 g L⁻¹) e com presença (15g L⁻¹) ou ausência de manitol. A cada 30 dias foi avaliada a taxa de multiplicação. Após cada avaliação, os explantes voltaram à sala de crescimento onde, após 30 dias, foi avaliada novamente a taxa de multiplicados. Foi observado um aumento gradual na taxa de multiplicados até os 120 dias. A presença de manitol no meio de cultura reduziu a taxa de multiplicação. A concentração de sacarose também auxiliou na redução da multiplicação dos explantes conservados, evidenciando a importância destes osmorreguladores. Após o retorno à sala de crescimento, quando os explantes foram cultivados com meio de cultura indicado, os mesmos retornaram suas taxas de multiplicação, voltando às taxas indicadas de

⁽¹⁾Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, Campus Universitário, UFPel, Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS. E-mail: nataliadiasgomes@hotmail.com, japeters1@hotmail.com, valmorjb@yahoo.com ⁽²⁾Embrapa Clima Temperado, Rodovia BR 392, km 78, Caixa Postal 403, CEP 9601-971 Pelotas, RS. E-mail: leonardo.dutra@embrapa.br, dvbio@hotmail.com, laurarsommer@hotmail.com.

27 aproximadamente 6 multiplicados por explante. Diante do exposto, pode-se concluir que a
28 exposição a baixas temperaturas é viável até o período de 120 dias para amoreira-preta cv.
29 Tupy. A taxa de multiplicação dos explantes de amoreira-preta reduziu quando os mesmos
30 foram mantidos em baixas temperaturas. Os explantes armazenados in vitro à temperatura
31 de 6°C, obtiveram as taxas normais de multiplicados, 30 dias após o retorno à sala de
32 crescimento.

33 **Termos para indexação:** Rubus; baixas temperaturas; osmorreguladores, multiplicação,
34 propagação vegetativa.

35

36

Abstract

37 Because the existence of multiple genotypes of blackberry, highlights the need to develop
38 an alternative and complementary to the germplasm conservation of this species, an
39 alternative is through cultivation in vitro, reducing the temperature of the culture and the
40 adding osmoregulators. Furthermore, this technique occupies little space and reduced
41 maintenance costs. The objective was to seek alternatives that enable the conservation of
42 germplasm of blackberry, for a period of 120 days at a temperature of 6 ° C. Nodal
43 segments of blackberry 'Tupy' were subjected to temperatures of 6 ° C for 30, 60, 90 and
44 120 days on MS medium supplemented with different concentrations of sucrose (15, 30 and
45 45 g L⁻¹) and in the presence (15g L⁻¹) or absence of mannitol. Every 30 days we evaluated
46 the rate of multiplication. After each evaluation, the explants returned to growth room
47 where, after 30 days, was evaluated again rate multiplied. We observed a gradual increase in
48 rate multiplied by 120 days. The presence of mannitol in the culture medium decreased the
49 rate of proliferation. The sucrose concentration also helped in reducing the proliferation of
50 explants cultured, highlighting the importance of these osmoregulators. After returning to
51 the room for growth when the explants were cultured with culture medium indicated, they
52 returned their multiplication rates, returning to rates indicated approximately 6 multiplied by
53 explant. Given the above, one can conclude that exposure to low temperatures is feasible
54 until the period of 120 days for blackberry cv. Tupy. The multiplication rate of explants of
55 blackberry reduced when they were kept at low temperatures. The explants in vitro stored at
56 a temperature of 6 ° C, achieved rates multiplied normal 30 days after returning to room
57 growth.

58 **Índex terms:** Blackberry; low temperature; osmoregulators, multiplication, vegetative
59 propagation.

60

61

62

Introdução

63 A amoreira-preta (*Rubus* spp.) é uma das espécies frutíferas mais promissoras no país,
64 apresentando boas perspectivas de cultivo e comercialização. Seu cultivo, no Brasil,
65 ocupava há pouco tempo área de aproximadamente 250 hectares (STRIK et al., 2007). Nos
66 últimos anos tem se observado crescimento na área cultivada, principalmente na Região Sul,
67 pois a espécie adapta-se bem ao clima, produzindo frutas de elevado valor nutricional
68 (RAMIREZ et al., 2011). Além disso, o cultivo de amoreira-preta tem elevado potencial de
69 expansão para os demais estados com características climáticas semelhantes
70 (CAMPAGNOLO & PIO, 2012).

71 O sistema produtivo desta espécie requer principalmente definição do método de
72 produção de mudas por estruturas vegetativas (COUTO et al., 2010). Nesse contexto, as
73 técnicas de cultivo in vitro constituem um promissor instrumento para o desenvolvimento de
74 alternativas para a produção de mudas e conservação de material genético da espécie.

75 A cultura de tecidos também possibilita que simultaneamente seja explorada tanto a
76 propagação quanto a conservação. Esta característica é importante, pois um dos problemas
77 advindos do cultivo continuado dos tecidos in vitro é a perda de vigor dos explantes, após a
78 permanência por longos períodos, não se apresentando mais responsivos após sucessivos
79 subcultivos (PASA, 2012), como ocorre no morangueiro, podendo levar o material a
80 alterações genéticas. Tal fato justifica o desenvolvimento de métodos de conservação in
81 vitro.

82 Diante do potencial de cultivo da amoreira-preta, devido principalmente à
83 produtividade desta frutífera no Rio Grande do Sul, alternativas que auxiliem na sua
84 propagação, cultivo e preservação do germoplasma tornam-se muito necessárias. Como a
85 amoreira-preta já possui um protocolo definido de produção de mudas via micropropagação
86 (DUTRA et al., 2010), o desafio é mantê-las em condições in vitro por tempo
87 indeterminado, tanto para reduzir o uso de mão de obra, quanto para garantir a conservação
88 do material genético.

89 A conservação de germoplasma implica na manutenção de coleções em seu lugar de
90 ocorrência (in situ) ou fora do mesmo (ex situ). Na conservação ex situ, podem ser mantidos
91 embriões, sementes ou qualquer estrutura vegetal sob diferentes condições, dependendo do
92 material e da técnica empregada (VIEIRA, 2000). Cada método de conservação possui
93 vantagens e desvantagens sendo necessárias estratégias complementares para uma eficaz
94 conservação máxima da diversidade genética (VIEIRA, 2000).

95 Nos últimos anos, as técnicas tradicionais de conservação são complementadas por
96 métodos de conservação in vitro, oferecendo assim maior segurança aos bancos de
97 germoplasma (MARTIN & PRADEEP, 2003). A conservação in vitro permite a
98 manutenção de grande número de acessos em pequeno espaço físico, livre dos riscos
99 existentes a campo, reduzindo os custos de manutenção e garantindo a fidelidade genética
100 (FARIA et al., 2006).

101 Os protocolos de conservação in vitro devem objetivar a máxima sobrevivência e
102 estabilidade genética com a mínima frequência de subcultivos (NAIDU & SREENATH,
103 1999). Existem dois sistemas básicos de conservação in vitro: por meio da limitação do
104 crescimento para taxas mínimas (crescimento lento); e mediante a supressão total do
105 metabolismo celular (criopreservação) (VIEIRA, 2000). O sistema de crescimento lento
106 proporciona opções de armazenamento a curto e médio prazo, reduzindo o metabolismo da
107 planta sem afetar sua viabilidade, enquanto na técnica de criopreservação é possível
108 armazenar o material vegetal por longos prazos (ROCA et al., 1991).

109 O crescimento mínimo consiste em reduzir o metabolismo vegetal por alterações no
110 ambiente de cultivo, como, decréscimo na intensidade da luz, fotoperíodo, trocas gasosas e
111 temperatura de incubação da cultura, e por modificações no meio de cultura por meio da
112 adição de reguladores vegetais e agentes osmóticos e redução dos componentes salinos e
113 orgânicos (WITHERS & WILLIANS, 1998; LEMOS et al., 2002). O decréscimo da
114 temperatura é uma das estratégias mais utilizadas para manter as plantas em crescimento
115 mínimo por reduzir o metabolismo da planta, incluindo alterações no conteúdo e ação das
116 enzimas e na composição e funcionamento das membranas celulares (LEMOS et al., 2002;
117 LÉDO et al., 2007). Essa técnica tem sido utilizada para a conservação de diversas espécies
118 vegetais, com respostas que variam em função da sensibilidade à baixa temperatura
119 (LEMOS et al., 2002; FARIA et al., 2006). A combinação de baixas temperaturas com a

120 adição de reguladores vegetais ou agentes osmóticos no meio de cultura tem sido apontada
121 como uma alternativa eficiente para a conservação de germoplasma in vitro.

122 Por outro lado, a conservação por meio da indução de estresse osmótico ocorre pela
123 adição de reguladores no meio de cultura, e pode ser empregada em associação ou não à
124 outra técnica. Reguladores osmóticos têm sido testados para limitar o crescimento de
125 explantes in vitro, dentre eles manitol e sorbitol são frequentemente utilizados, modificando
126 o potencial da água no meio de cultura (PEDROSO et al., 2010). Assim, é possível retardar
127 a taxa de multiplicação dos explantes, aumentando o período do cultivo in vitro.

128 Com isso, o presente trabalho teve como objetivo buscar alternativas que possibilitem
129 o armazenamento do germoplasma de amoreira-preta cv. Tupy, por um período de até 120
130 dias armazenadas em temperatura de 6°C e posteriormente verificar o retorno da taxa de
131 multiplicação dos propágulos.

132

133

Material e Métodos

134 Como material vegetal utilizou-se a cultivar Tupy, pertencentes à coleção de
135 germoplasma da Embrapa Clima Temperado. Os explantes foram constituídos por
136 segmentos nodais contendo uma gema axilar, obtidas de brotações multiplicadas in vitro,
137 oriundas de meristemas excisados de ramos jovens de plantas devidamente identificadas,
138 mantidas em casa de vegetação. As culturas foram subcultivadas a cada 30 dias, até a
139 obtenção de material suficiente para a execução do experimento.

140 Os explantes foram inoculados em meio de cultura composto pelos sais do meio MS
141 (Murashige e Skoog, 1962) com adição de inositol (100 mg L⁻¹), ágar (7 g L⁻¹),
142 benzilaminopurina (BAP) a 1,0 mg L⁻¹, sacarose (15, 30, 45 g L⁻¹) e manitol (0 e 15 g L⁻¹). O
143 pH do meio de cultura foi ajustado em 6,2 antes da autoclavagem. Depois de inoculados, os
144 explantes foram mantidos em BOD durante 30, 60, 90 e 120 dias, submetidos à densidade de
145 fluxo de fótons de 8-10 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas de luz e temperatura de 6±1°C.

146 O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com três
147 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por cinco tubos de ensaio
148 contendo um segmento nodal com uma gema. Os tratamentos foram arrançados em
149 esquematrifatorial 4x3x2, sendo o fator A o tempo de permanência in vitro (30, 60, 90, e
150 120 dias), o fator B as concentrações de sacarose (15, 30, e 45 g L⁻¹) e o fator C a presença
151 ou ausência de manitol.

152 Decorrido cada período de permanência nas referidas condições, foi avaliada a taxa de
153 multiplicação dos explantes, os quais foram inoculados em meio de cultura com a
154 composição descrita anteriormente, adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose e sem a presença de
155 manitol, transferidos para sala de crescimento com densidade de fluxo de fótons de 40 μmol
156 m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas de luz e temperatura de 25±2°C para multiplicação.
157 Decorridos 30 dias do retorno à sala de crescimento, os explantes foram novamente
158 avaliados quanto à taxa de multiplicação.

159 Os dados obtidos foram analisados quanto à sua normalidade pelo teste de Shapiro-
160 Wilk, e posteriormente submetidos à análise da variância (p≤0,05). Em caso de significância
161 estatística, compararam-se os resultados do fator tempo por regressão polinomial, do fator
162 sacarose pelo teste Tukey, e do fator manitol pelo teste t (p≤0,05).

163

164

Resultados e Discussão

165 Houve interação entre os fatores tempo x sacarose e tempo x manitol, quando em
166 exposição a baixas temperaturas. Já, 30 dias após retorno à sala de crescimento, foi
167 observado efeito principal do fator tempo para a taxa de multiplicação.

168 A taxa de multiplicação dos explantes foi crescente quando estes estavam em
169 exposição ao frio, tanto na presença ou ausência de manitol, no entanto, os explantes que
170 permaneceram em meio de cultura sem manitol apresentaram maior taxa de multiplicação
171 (Figuras 1). Os resultados obtidos são satisfatórios, visto que a taxa de multiplicação
172 encontrada em todos os tempos de permanência no frio foi inferior à descrita para a espécie,
173 em torno de 5 a 7 explantes por repicagem, a cada 30 dias de cultivo (DUTRA et al., 2010).

174 Com relação à redução da taxa de multiplicação em função da presença do manitol no
175 meio de cultura, tal fato pode ter ocorrido devido a este ser um açúcar-álcool que
176 geralmente não é metabolizado pelas plantas e por isso é empregado para a redução do
177 potencial hídrico do meio de cultura na conservação in vitro (GEORGE, 1993). Entretanto,
178 por períodos reduzidos de armazenamento em frio, a presença de manitol no meio de cultura
179 não favoreceu a redução da taxa de multiplicação, devendo então, ser empregado somente
180 quando utilizar-se períodos superiores a 60 dias de armazenamento sob condição de frio.

181 Resultados semelhantes foram encontrados com Yacon (*Smallanthus sonchifolius*),
182 cultivados por 60 dias em baixas temperaturas em meio MS com 10, 20, 30 g L⁻¹ de manitol.
183 Observou-se redução na taxa de multiplicação com a presença de manitol, sendo a taxa de

184 multiplicados 4,67 na ausência de manitol e 2,89 com 10 g L⁻¹ deste (SKALOVA et al.,
185 2012). Para mangabeira foi observado crescimento linear na taxa de multiplicação conforme
186 aumentou-se o tempo de permanência no meio de cultura com manitol até 180 dias a 27°C,
187 porém ainda assim o agente osmótico se mostrou efetivo na conservação *in vitro* da espécie
188 (SANTOS, 2010)

189 Lédo et al. (2007), observaram que a adição de manitol a 24,65 e 32,87 mg L⁻¹
190 induziu menor crescimento de explantes de coqueiro anão verde. Em hastes de batata
191 (*Solanum tuberosum*), a presença de manitol reduziu efetivamente o crescimento das
192 plantas, porém apenas 37% dos explantes sobreviveram após 90 dias de cultivo (FORTES &
193 PEREIRA; 2001). Contudo, estes resultados diferem dos encontrados em mangabeira, cujo
194 manitol não foi viável para a conservação *in vitro* de microestacas desta espécie, uma vez
195 que apresentou efeito tóxico (SÁ et al., 2011)

196 A taxa de multiplicação foi crescente para a relação tempo de exposição ao frio e
197 concentração de sacarose no meio de cultura. A maior concentração de sacarose propiciou
198 menor taxa de multiplicação (Figura 2). Com isso, é aconselhável aumentar a concentração
199 de sacarose para explantes de amoreira-preta conservados *in vitro*, visto que a concentração
200 de 45g L⁻¹ apresentou maior redução na taxa de multiplicados que as demais concentrações
201 testadas. Este fato é decorrente de que conforme aumenta-se a concentração de sacarose no
202 meio de cultura, diminui o potencial hídrico do meio, dificultando a absorção de água pelos
203 explantes, promovendo assim, a redução do crescimento do explante.

204 Diante dos resultados encontrados no presente trabalho, os agentes osmóticos como a
205 sacarose e o manitol podem ser acrescentados ao meio de cultura para auxiliar na redução da
206 taxa de multiplicados, visto que os mesmos agem sobre o crescimento do explante de forma
207 a reduzir o potencial hídrico do meio de cultura (LIMA-BRITO et al., 2011). Além disso, o
208 decréscimo da temperatura é uma das estratégias que podem ser utilizadas juntamente com
209 as demais citadas, para manter as plantas em crescimento mínimo, pois o frio reduz o
210 metabolismo da planta (LEMOS et al., 2002; LÉDO et al., 2007).

211 Após 30 dias de retorno à sala de crescimento observou-se que a taxa de multiplicação
212 de amoreira-preta retornou às taxas obtidas comumente, e além disso, os explantes que
213 permaneceram por maior tempo em exposição ao frio apresentaram também maiores taxas
214 de multiplicação (Figura 3). Este resultado indica que mesmo os explantes de amora-preta
215 que permaneceram por 120 dias em baixas temperaturas, não tiveram sua taxa de

216 multiplicados reduzida após o recultivo, evidenciando assim a possibilidade da técnica do
217 crescimento lento para a cultura por um período de até 120 dias de exposição ao frio.

218 Dois fatos importantes devem ser destacados, o primeiro é que não houve morte dos
219 explantes em nenhum dos tratamentos submetidos, e o outro é que os explantes após o
220 retorno a sala de crescimento, voltaram a ter a aparência que apresentavam antes do início
221 dos experimentos, sem a presença de injúrias devido ao tratamento. Além disso, cabe
222 resaltar que estes resultados indicam o princípio para trabalhos com criopreservação da
223 espécie, visto que até o presente nada foi relatado para a cultura. Com isso, fica evidente a
224 necessidade de trabalhos posteriores que testem maiores períodos de exposição ao frio, para
225 que seja possível o armazenamento do germoplasma por maior tempo possível, além de ser
226 necessário, que sejam realizadas técnicas moleculares para a garantia da fidelidade do
227 germoplasma.

228

229

230

Conclusão

231 A taxa de multiplicação de amoreira-preta reduziu quando os mesmos foram mantidos
232 em baixas temperaturas, com a presença de osmorreguladores no meio de cultura.

233 Os explantes armazenados in vitro a temperatura de 6°C, retornaram as taxas normais
234 de multiplicação, 30 dias após o retorno a sala de crescimento.

235

236

237

Referências

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

241 COUTO, M; ANTUNES, L. E. C. A.; CARPENDO, S.; TREVISAN, R. Avaliação de
242 crescimento inicial de mudas de amoreira-preta. **Comunicado Técnico 247**. Embrapa Clima
243 Temperado. Pelotas, 2010. 8p.

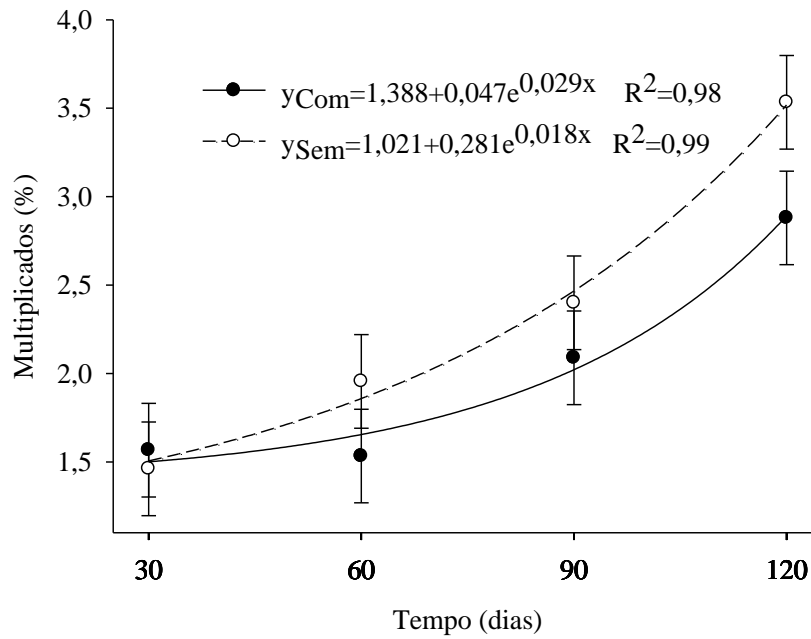
244 DUTRA, L. F.; SILVA, N. D. G. da; MAYER, K. C. de A.; NINO, A. F. P.; XAVIER, F.
245 O. da S.; VIEIRA, F. C. B. Protocolos de micropropagação de plantas II: amoreira-preta,
246 **Documento 326**. Embrapa Clima Temperado. Pelotas, 2010. 23p.

- 247 FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. C.; JUNGHANS, T. G.; LEDO, C. A. S. Efeito da
248 sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista**
249 **Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.2, p.267-270, 2006.
- 250 FORTES, G. R. L.; PEREIRA, J. E. S. Preservação *in vitro* de batata com ácido salicílico e
251 duas concentrações de carboidratos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n.10,
252 p.1261-1264, 2001.
- 253 GEORGE, E. F. Plant propagation by tissue culture. Part. 1. The technology. 2.ed.
254 Edington, Wilts, London: Exegetics, 1993. 1574p.
- 255 LÉDO, A.S.; CUNHA, A. O.; ARAGÃO, W. M.; TUPINAMBÁ, E. A. Efeito da sacarose e
256 do manitol na conservação *in vitro* por crescimento lento de coqueiro anão. **Magistra**, v.19,
257 n.4, p.346-351, 2007
- 258 LEMOS, E. E. P. de; FERREIRA, M. de S.; ALENCAR, L. M. C. de; NETO, C. E. R.;
259 ALBUQUERQUE, M. M. de. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar.
260 **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.10, p.1359-1364, 2002.
- 261 LIMA-BRITO, A. ALBUQUERQUE, M. M. S.; ALVIM, B. F. M.; RESENDE, S. V.;
262 BELLINTANI, M. C.; SANTANA, J. R. F. de Agentes osmóticos e temperatura na
263 conservação *in vitro* de sempre-viva. **Ciência Rural**, v.41, n.8, p. 1354-1361, 2011.
- 264 MARTIN, K. P.; PRADEEP, A. K. Simple strategy for the *in vitro* conservation of *Ipea*
265 *malabarica* an endemic and endangered orchid of the Western Ghats of Kerala, India. **Plant**
266 **Cell, Tissue and Organ Culture**, v.74, p.197-200,2003.
- 267 MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with
268 tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497,1962
- 269 NAIDU, M. M.; SREENATH, H. L. *In vitro* culture of coffee zygotic embryos for
270 germplasm preservation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.55, p.227-230, 1999.
- 271 PASA, M. da S.; CARVALHO, G. L.; SCHUCH, M. W.; SCHIMITZ, J. D.;
272 TORCHELSEN, M. de M.; NICKEL, G. K. SOMMER, L. R.; LIMA, T. S.; CAMARGO,
273 S. S. Qualidade de luz e fitorreguladores na multiplicação e enraizamento *in vitro* da
274 amoreira-preta 'Xavante'. **Ciência Rural**, v.42, n.8, p.1392-1396. Santa Maria, 2012.
- 275 PEDROSO, A. N. V.; LAZARINI, R. A. de M.; TAMAKI, V.; NIEVOLA, C. C. *In vitro*
276 culture at low temperature and *ex vitro* acclimatization of *Vriesea inflata* an ornamental
277 bromeliad. **Revista Brasileira de Botânica**, v.33, n.3, p.407-414, 2010.

- 278 RAMIREZ, M. R.; APEL, M.A.; RASEIRA, M.C.B. ; ZUANAZZI, J.Â.S. ; HENRIQUES,
279 A.T. Polyphenol content and evaluation of antichemotactic, antiedematogenic and
280 antioxidant activities of *Rubus* spp. cultivars. **Journal of Food Biochemistry**, v. 35, p.
281 1389-1397, 2011.
- 282 ROCA, W. M.; ARIAS, D. I.; CHAVÉZ, R. Métodos de conservación *in vitro* Del
283 germoplasma. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos em la**
284 **agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: Centro Internacional de Agricultura
285 Tropical, 1991.
- 286 SÁ, A. J; LÉDO, A. da S.; LÉDO, C. A. da S. Conservação *in vitro* de mangabeira da região
287 nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, v. 41, n.1, p.57-62, 2011.
- 288 SANTOS, M. da COSTA. **Conservação *in vitro* de mangabeira nativa da região**
289 **nordeste do Brasil**. 2010. 55f. Dissertação. Núcleo de Pós-Graduação em Biotecnologia.
290 Universidade Federal de Sergipe. 2010.
- 291 SKALOVA, I.; VIEHMANNNOVA, I.; VITAMVAS, J. *In vitro* Conservation of
292 *Smallanthus sonchifolius* under Slow-growth Conditions. **Agricultura Tropica et**
293 **Subtropica**, v. 45, n.3, p.147-150, 2012.
- 294 STRIK, B. C.; CLARK, J.R.; FINN, C.; BAÑADOS, M.P. Worldwide production of
295 blackberries. *Proc. IXIb Intl. Rubus and Ribes Symp. 209*. Eds.: P. Baflados and A. Dale.
296 **Acta Horticulturae** 777, ISHS, p.209-217, 2007.
- 297 VIEIRA, M. L. C. Conservação de germoplasma *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e**
298 **Desenvolvimento**, v.3, n.14, p.18-20, 2000.
- 299 WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas.
300 In: TORRES, C. A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed). **Cultura de Tecidos e**
301 **Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa-SPP.PI: Embrapa, CNPH, 1998.
302
303

304

Tabelas e Figuras

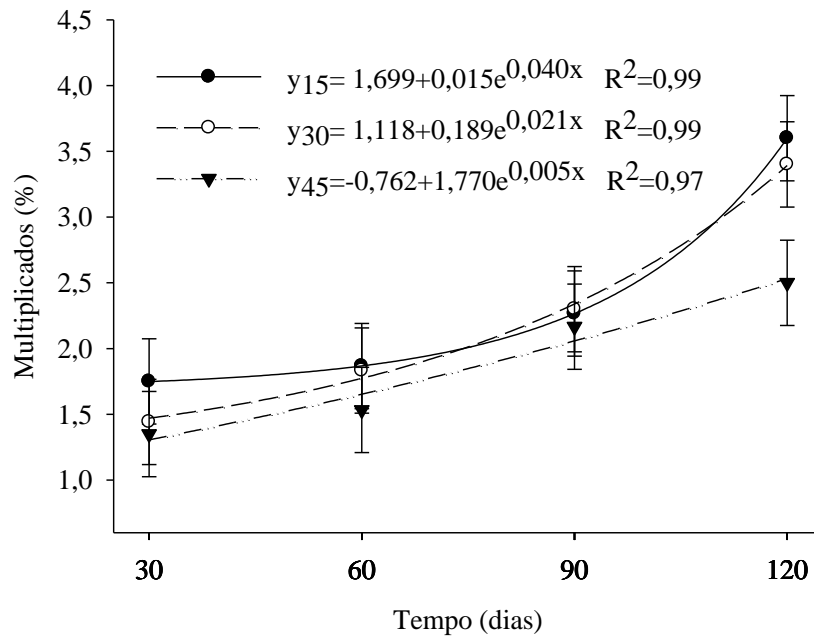


305

306 **Figura 1:** Taxa de explantes multiplicados in vitro, da cultivar de amoreira-preta (*Rubus*
 307 spp.) Tupy, mantidos sob temperatura de $6\pm 1^\circ\text{C}$, com a presença (y_{Com}) ou não (y_{Sem}) de
 308 manitol, durante o período de 30, 60, 90 e 120 dias. Pelotas, 2012. Os pontos representam as
 309 médias e as barras os respectivos intervalos de confiança.

310

311

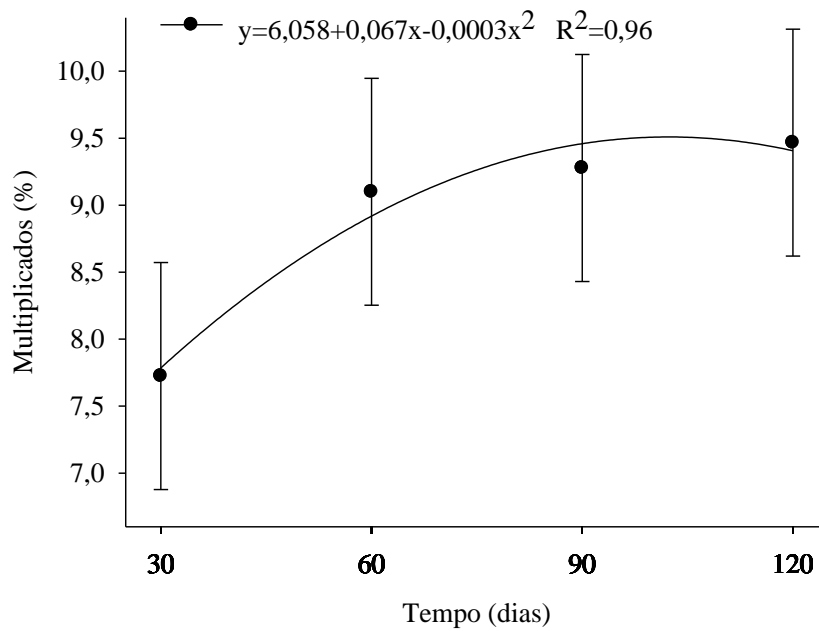


312

313 **Figura 2:** Taxa de multiplicados in vitro da cultivar de amoreira-preta (*Rubus* spp.) Tupy,
 314 mantidos sob temperatura de $6 \pm 1^\circ\text{C}$, em meio de cultura com diferentes concentrações de
 315 sacarose 15 g L^{-1} (y15), 30 g L^{-1} (y30) e 45 g L^{-1} (y45), durante o período de 30, 60, 90 e 120
 316 dias. Pelotas, 2012. Os pontos representam as médias e as barras os respectivos intervalos
 317 de confiança.

318

319



320

321 **Figura 3:** Taxa de explantes multiplicados, de amoreira-preta (*Rubus* spp.), in vitro, da
 322 cultivar Tupy, submetidos a diferentes tempos de exposição ao frio (30, 60, 90 e 120 dias),
 323 avaliada 30 dias após retorno dos explantes à sala de crescimento. Pelotas, 2012. Os pontos
 324 representam as médias e as barras os respectivos intervalos de confiança.

Conclusão

Diante do exposto, conclui-se que a radiação Gama induz alterações fisiológicas em explantes de amoreira-preta cvs. Tupy e Xavante, sendo que as mesmas apresentam respostas semelhantes em relação às doses de radiação submetidas neste estudo. Fica evidente a necessidade de análises moleculares na comprovação da variação genética induzida pelos raios gama, além de estudos complementares com atividade enzimática, anatomia e acompanhamento a campo.

A taxa de multiplicação dos explantes de amoreira-preta reduziu quando os mesmos foram mantidos em baixas temperaturas, com a presença de osmorreguladores no meio de cultura, porém esse resultado pode ser revertido após o retorno das mesmas as condições normais de cultivo. Este foi um estudo pioneiro com esta cultura, logo, ainda serão necessários outros estudos que visem maior tempo de permanência in vitro, tipo do explante a ser utilizado, e ainda outros osmorreguladores e concentrações dos mesmos, além de análises anatômicas, para que seja observado se há alterações na estrutura e organização dos tecidos, e moleculares.

Referências

ALLARD, R.W. **Principles of plant breeding**. 3. ed. Nova York: J. Wiley, 485p, 1960.

ANTUNES, L.E.C. Amora-preta (*Rubus* spp). In: **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 28, n. 3, 2006.

BERTAN, I. Distância genética como critério para escolha de genitores em programas de melhoramento de trigo (*Triticum aestivum* L.). Pelotas, 2005. 93p. **Dissertação** (Mestrado). Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel/Universidade Federal de Pelotas.

CABONI, E.; LAUR, P.; D'ANGELI, S. *In vitro* plant regeneration from callus of shoot apices i apple shoot culture. **Plant Cell Reports**, v.19, p.755-760, 2000.

CLARK, J.R. Blackberry: world production and perspectives. In: Encontro sobre pequenas frutas e frutas nativas do mercosul, v. 2, 2006, Pelotas. **Palestras...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. p.11-16.

COIMBRA, J.L.M. et al. Criação de variabilidade genética no caráter ciclo vegetativo em aveia: hibridação artificial x mutação induzida **Revista Brasileira de Agrociência**, v.10, n. 2, p.159-166, 2004.

FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. C.; JUNGHANS, T. G.; LEDO, C. A. S. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de passiflora giberti N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.2, p.267-270, 2006.

GOMES, C. B. Nematóides parasitas. In: Sistema de Produção de amoreira-preta. Sistemas de Produção 12. **Embrapa Clima Temperado**, Pelotas, 2008. Versão eletrônica:<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Amora/SistemaProducaoAmoreiraPreta/nematoides.htm>>. Acesso em 18 de janeiro de 2013.

JOSEPH, R. et al. Induced mutations in cassava using somatic embryos and the identification of mutant plants with altered starch yield and composition. **Plant Cell Report**, v.23, p.91–98, 2004.

NAIDU, M. M.; SREENATH, H. L. *In vitro* culture of coffee zygotic embryos for germplasm preservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.55, p.227-230, 1999.

PREDIERI, S.; ZIMMERMANN, R.H. Pear mutagenesis: *In vitro* treatment with gamma-rays and field selection for productivity and fruit traits. **Euphytica**, v.117, n.3, p.217-227, 2001.

RASEIRA, M. do C. B.; SANTOS, A. M. dos; BARBIERI, R. L. Classificação botânica, origem e cultivares.; In: Sistemas de produção de amoreira-preta. Sistemas de Produção 12. **Embrapa Clima Temperado**, Pelotas, 2008. Versão eletrônica: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Amora/SistemaProducaoAmoreiraPreta/nematoides.htm>>. Acesso e, 17 de fevereiro de 2013.

RASEIRA, M. do C. B.; SOUZA, E. L.; FELDBERG, N. P.; SILVA, W. R. da; ARTIMONTE, A. P. Seleções avançadas de amora-preta em comparação com a cultivar padrão, 'tupy'. **XXII Congresso Brasileiro de Fruticultura**. Bento Gonçalves, 2012.

RAMIREZ, M.R.; APEL, M.A.; RASEIRA, M.C.B. ; ZUANAZZI, J.Â.S. ; HENRIQUES, A.T. Polyphenol content and evaluation of antichemotactic, antiedematogenic and antioxidant activities of *Rubus* sp. cultivars. **Journal of Food Biochemistry**, v. 35, p. 1389-1397, 2011.

REITZ, R. Flora ilustrada catarinense: rosáceas. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. 135 p. 1996.

ROCA, W. M.; ARIAS, D. I.; CHAVÉZ, R. Métodos de conservación *in vitro* Del germoplasma. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos em la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991.

SOUZA, R. M.; NOGUEIRA, M. S.; LIMA, I. M.; MELARATO, M.; DOLINSKI, C. M. Management of the guava root-knot nematode in São João da Barra, Brazil, and report of new hosts. **Nematologia Brasileira**, v. 30, p. 165-169, 2006.

STRIK, B.C.; CLARK, J.R.; FINN, C.; BAÑADOS, M.P. Worldwide production of blackberries. *Proc. IXIb Intl. Rubus and Ribes Symp. 209*. Eds.: P. Baflados and A. Dale. **Acta Horticulturae 777**, ISHS, p.209-217, 2008.

VIEIRA, M. L. C. Conservação de germoplasma *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Brasília, v.3, n.14, p.18-20, 2000.