

FRUTICULTURA

Diodos emissores de luz (LEDs) na micropropagação de amoreira-preta cv. Tupy

P.S. Gomes da Rocha¹; R.P. Oliveira²; C.R. Bastos³ y W.B. Scivittaro²

¹Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI Erechim. Av. Sete de Setembro 1621, Fatima, Erechim. RS, Brasil. 99700-000. p.sergio.r@uol.com.br Tel. (55) 543321-0040. ²Embrapa Clima Temperado. ³UCPel.

Recibido: 14/5/12

Acceptedo: 24/7/13

Resumen

Gomes da Rocha, P.S.; Oliveira, R.P.; Bastos, C.R. y Scivittaro, W.B. 2013. Diodos emissores de luz (LEDs) na micropropagação de amoreira-preta cv. Tupy. *Horticultura Argentina* 32(79): 14-19.

Este trabalho objetivou avaliar o efeito do tipo de luz na multiplicação e no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Tupy. Brotas de amoreira-preta foram cultivadas por 30 dias em meio MS acrescido de 100 mg·L⁻¹ de mio-inositol, 7 g·L⁻¹ de ágar, 0,8 mg·L⁻¹ de BAP e 30 g·L⁻¹ de sacarose. O pH foi ajustado para 5,8. Para o enraizamento utilizou-se o meio MS ½ suplementado com 30 g·L⁻¹ de sacarose, 100 mg·L⁻¹ de mio-inositol, 7,0 g·L⁻¹ de ágar e 0,5 mg·L⁻¹ de ANA. Os tratamentos utilizados nas fases de multiplicação e enraizamento foram constituídos por cinco tipos de luz [LEDs azuis-EDEB 3LA1 470 nm, LEDs verdes-EDET 3LA1 530 nm, LEDs vermelhos-EDER 3LA3 630 nm,

lâmpadas Growlux e lâmpadas fluorescentes]. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com dez repetições. Os maiores números de brotações foram observado sob os LEDs vermelhos (6,07) e lâmpada Growlux (6,03) os quais foram superiores aos da lâmpada fluorescente branca. O menor comprimento da brotação foi obtido sob as lâmpadas Growlux. A porcentagem de enraizamento foi elevada, sendo a menor observada sob os LEDs verdes (93,08 %). Os LEDs vermelhos mostraram tendência de maior média nas variáveis da fase de enraizamento, mas a confirmação de superioridade em relação as lâmpadas fluorescentes ocorreu no número de raízes formadas.

Palabras claves adicionales: Qualidade da luz, explante, multiplicação, enraizamento.

Abstract

Gomes da Rocha, P.S.; Oliveira, R.P.; Bastos, C.R. and Scivittaro, W.B. 2013. Light-emitting diodes (LEDs) in the micropropagation of blackberry cv. Tupy. *Horticultura Argentina* 32(79): 14-19.

This work aimed to evaluate the effects of light type on *in vitro* multiplication and rooting of blackberry (*Rubus* sp.) cv. Tupy. Blackberry shoots were grown for 30 days on MS medium supplemented by 100 mg·L⁻¹ myo-inositol, 7 g·L⁻¹ agar, 0.8 mg·L⁻¹ BAP and 30 g·L⁻¹ sucrose. The pH was adjusted to 5.8. For rooting it was used MS medium supplemented by 30 g·L⁻¹ sucrose, 100 mg·L⁻¹ myo-inositol, 7 g·L⁻¹ agar and 0.5 mg·L⁻¹ ANA. The treatments used during multiplication and rooting process were five light of types (blue-EDEB 3LA1 470 nm LEDs, green-EDET 3LA1 530

nmLEDs, red-EDER 3LA3 630 nm, Growlux lamps and fluorescent lamps). Experimental design was entirely randomized, with ten replications. The shoot number per explant was higher under the red Led (6.07), Growlux lamps (6.03) and blue Led (5.59), which were higher than those of white fluorescent lamp. The shorter length of shoot was observed under the lamps Growlux. The percentage of rooting was high, the lowest percentage was observed under the green LEDs (93.08 %). The red LEDs showed a trend of higher average in the variables of rooting, but confirmation of superiority over fluorescent lamps occurred in the number of roots.

Additional keywords: Light quality, explant, multiplication, rooting.

1. Introdução

A amoreira-preta (*Rubus* sp.) pertence à família Rosaceae e ao gênero *Rubus*, o qual é composto por mais de trezentas espécies nativas da Europa, África e América. Sendo a cultivar Tupy o resultado obtido do cruzamento entre as cultivares de amoreira-preta Uruguai x Comanche, os frutos dessa cultivar são de tamanho grande, com coloração preta e sabor equilibrado entre açúcar e acidez (Santos & Raseira, 1988).

A área cultivada com amoreira-preta no Brasil vem

crescendo anualmente 5 % nos últimos anos. Em parte, esta expansão da área de produção é atribuída ao aumento no consumo desta fruta que apresenta propriedades nutracêuticas (Oliveira *et al.*, 2008). Além disto, existem estudos que buscam relacionar o efeito dos compostos fenólicos presente nas amoreiras-preta com benefícios para a saúde (Hassimotto *et al.*, 2008).

Para atender à ampliação do plantio de amoreira-preta podem-se obter as mudas pelo método clássico, por meio de estacas de raiz, estacas herbáceas, rebentos e hastes novas, ou pelas técnicas de micropropaga-

ção. Sendo, este último método de propagação o mais indicado pelo fato de produzir grande número de plantas uniformes e livres de vírus em curto período de tempo (Abadi & Hamidoghli, 2009; Couto *et al.*, 2009).

Embora na literatura especializada existam vários trabalhos que descrevem protocolos para a micropropagação da amoreira-preta (Bobrowski *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 2008), as técnicas de micropropagação requererem o constante refino e aperfeiçoamento para possibilitar a redução dos custos da muda micropropagada e, por consequência, alcançar preços mais competitivos em relação à muda obtida pelo método convencional. Contudo, não existem trabalhos com o uso dos diodos emissores de luz (LEDs) como fonte de iluminação para o crescimento de plantas micropropagadas de amoreira-preta.

Os LEDs são considerados como uma alternativa bastante promissora e com aplicação comercial por apresentar características ímpares em relação às lâmpadas convencionais, tais como alta eficiência na geração de luz com baixa emissão de calor, ausência de substância tóxica tais como mercúrio, volume e massa pequenos e longo período de vida útil, podendo atingir até 100.000 horas (Nhut *et al.*, 2003; Nhut & Nam, 2010). Além disso, de acordo com Skin *et al.* (2008), os LEDs proporcionam aumento da quantidade de clorofila e de carotenoides nos tecidos das plantas, maior taxa de multiplicação dos explantes e maior comprimento das brotações.

Diante deste contexto, este trabalho teve como ob-

jetivo avaliar o efeito do tipo de luz durante as fases de multiplicação e enraizamento *in vitro* de amoreira-preta cv. Tupy.

2. Material e métodos

A fase de multiplicação foi estudada cultivando-se as brotações em frascos de vidro com capacidade de 250 mL, contendo 40 mL de meio de cultura semi-sólido constituído pelos sais do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido por 100 mg·L⁻¹ de mio-inositol, 0,8 mg·L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) e 30 g·L⁻¹ de sacarose (Oliveira *et al.*, 2008), por três subcultivos sucessivos de 30 dias. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8, antes da adição de 7,0 g·L⁻¹ de ágar. A autoclavagem foi realizada a 121 °C à 1,5 atm por 20 minutos. As condições ambientais de cultivo foram fotoperíodo de 16 h a 25 ± 2 °C, sendo avaliadas cinco fontes de luz (LEDs azuis-EDEB 3LA1 470 nm, LEDs verdes-EDET 3LA1 530 nm, LEDs vermelhos-EDER 3LA3 630 nm, lâmpadas fluorescentes Growlux e lâmpadas fluorescentes brancas), fixando-se a intensidade luminosa durante os subcultivos em 20 μmol·m⁻²·s⁻¹. O delineamento utilizado foi o inteiramente ao acaso. Utilizaram-se dez repetições por tratamento, sendo as unidades experimentais constituídas por um frasco de 250 mL contendo 40 mL de meio semi-sólido com cinco explantes. Avaliaram-se o número e o comprimento médio das brotações formadas por explante. Os dados obtidos em cada um dos

três subcultivos foram usados na composição de uma única média para análise estatística.

A fase de enraizamento *in vitro* foi estudada utilizando brotações individualizadas, medindo aproximadamente 30 mm, obtidas na fase de multiplicação. As brotações foram cultivadas por apenas um subcultivo de 30 dias em meio MS sem reguladores de crescimento, acrescido de 100 mg·L⁻¹ de mio-inositol, 30 g·L⁻¹ de sacarose e 7 g·L⁻¹ de ágar e 0,5 mg·L⁻¹ de ANA (ácido naftaleno acético), sendo o pH ajustado para 5,8. Nessa fase, foram utilizadas as mesmas condições de cultivo da fase de multiplicação, sendo avaliadas cinco fontes de luz: LEDs

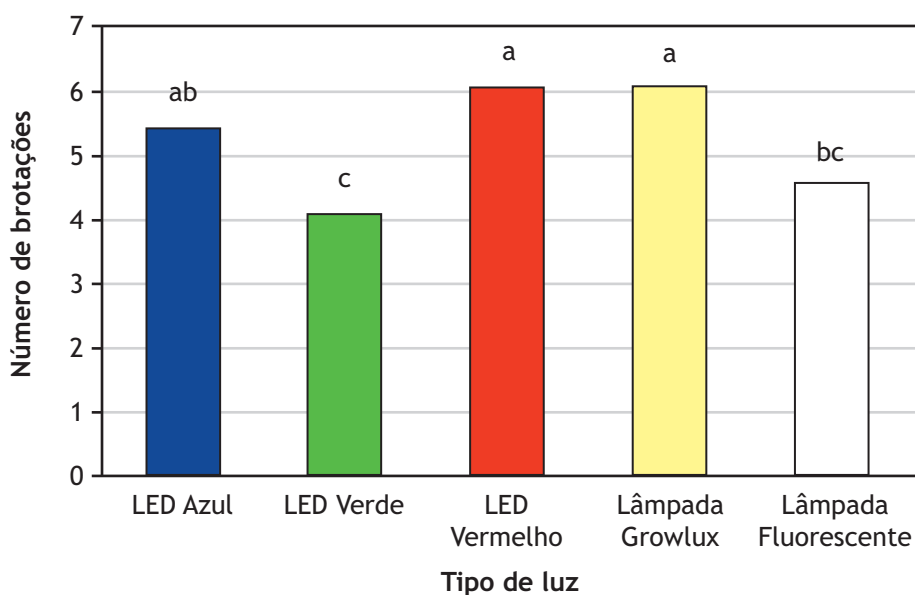


Figura 1. Número médio de brotações de amoreira-preta cv. Tupy cultivadas no meio de cultura MS e mantidas sob os LEDs azuis-EDEB 3LA1 470 nm, LEDs verdes-EDET 3LA1 530 nm, LEDs vermelhos-EDER 3LA3 630 nm, lâmpadas Growlux e lâmpadas fluorescentes.

azuis-EDEB 3LA1 470 nm, LEDs verdes-EDET 3LA1 530 nm, LEDs vermelhos-EDER 3LA3 630 nm, lâmpadas fluorescentes Growlux e lâmpadas fluorescentes brancas. Utilizaram-se dez repetições por tratamento, sendo as unidades experimentais constituídas por um frasco de 250 mL contendo 40 mL de meio semi-sólido com cinco explantes. A intensidade luminosa durante os subcultivos também foi fixada em $20 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Aos 30 dias, avaliaram-se a porcentagem de enraizamento, o número de raízes formadas por brotação, o comprimento e o diâmetro da maior raiz, o peso fresco da parte aérea e das raízes e o aspecto visual da muda micropropagada.

Os resultados relativos a cada fase de cultivo foram submetidos à análise da variância, comparando-se as médias do fator fonte de luz pelo teste de Duncan. Os dados relativos às porcentagens de plantas enraizadas foram transformados em arco seno $(x / 100)^{1/2}$, os do número de brotações e raízes foram transformados em $(x + 0,5)^{1/2}$, enquanto os das demais variáveis não foram transformados. Para as análises estatísticas, foram adotados 5 % de probabilidade.

3. Resultados e discussão

Na fase de multiplicação da amoreira-preta observou-se que o número médio de brotações formadas por explante foi influenciado pelo tipo de luz utilizado. Os maiores números de brotações por explante foram obtidos sob os LEDs vermelhos (6,07) e lâmpadas Growlux (6,03) e LEDs Azuis (5,43). Sendo o menor número de brotações obtido sob os LEDs verdes (4,1) o qual não diferiu dos resultados observados sob as lâmpadas fluorescentes (4,59) (Figura 1 e 2).

Para as condições usadas no presente experimento de multiplicação é possível inferir que a qualidade da

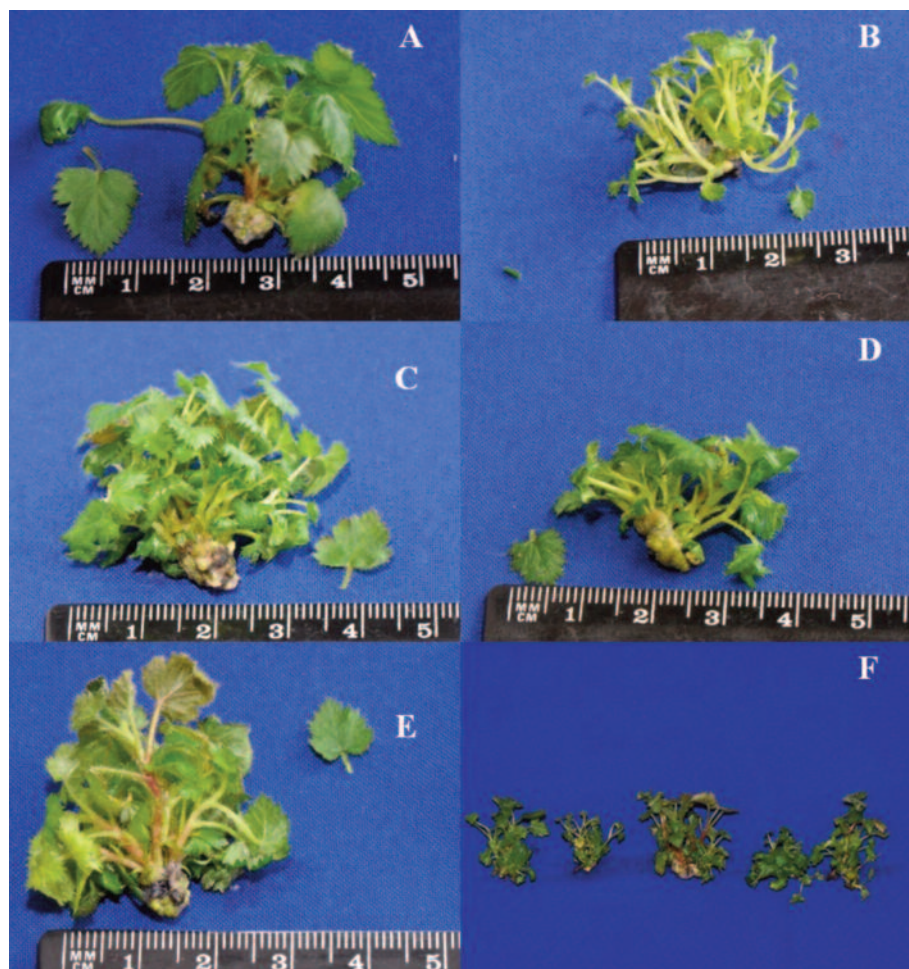


Figura 2. Aspectos das brotações de amoreira-preta cv. Tupy provenientes do cultivo sob os LEDs azuis-EDEB 3LA1 470 nm, LEDs verdes-EDET 3LA1 530 nm, LEDs vermelhos-EDER 3LA3 630 nm, lâmpadas Growlux e lâmpadas fluorescentes (A, B, C, D e F), sendo F as brotações dos tratamentos citados (esquerda/direita).

luz, mais especificamente o comprimento de onda, pode exercer influência no número de brotações adventícias formadas na amoreira-preta cultivada *in vitro*. De acordo com Victório *et al.* (2007), um dos fatores determinante para a eficiência fotossintética das plantas é o comprimento de onda da luz. Ainda segundo os mesmos autores, os picos máximos de absorção de luz pelas clorofilas a ocorrem com os comprimentos de onda correspondentes à faixa da luz vermelha e azul. A luz vermelha está relacionada com o desenvolvimento do aparato fotossintético e a acumulação de amido; por outro lado, a luz azul é considerada relevante para o desenvolvimento dos cloroplastos, formação das clorofilas e abertura dos estômatos (Wu *et al.*, 2007).

Deste modo, mesmo sendo os LEDs emissores de luz monocromática, diferentemente da lâmpada growlux e lâmpada fluorescente, esses conjuntos de eventos desencadeados pela luz vermelha e azul podem con-

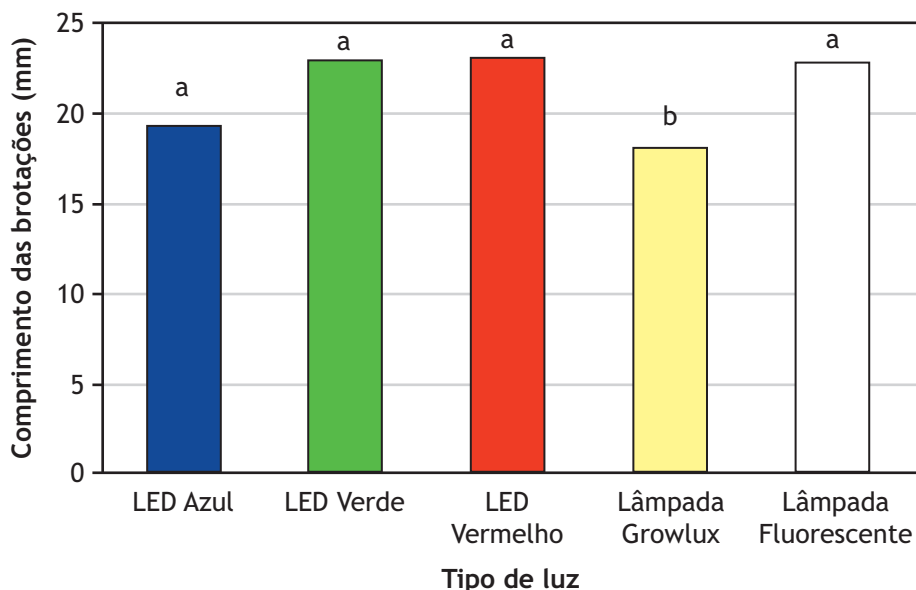


Figura 3. Comprimento médio de brotações de amoreira-preta cv. Tupy cultivadas no meio de cultura MS e mantidas sob os LEDs azuis-EDEB 3LA1 470 nm, LEDs verdes-EDET 3LA1 530 nm, LEDs vermelhos-EDER 3LA3 630 nm, lâmpadas Growlux e lâmpadas fluorescentes.

sentarem comprimentos de onda entre 400 e 750 nm, imitem luz nos espectros do azul, amarelo e verde, mas parte deste largo espectro não são usados no processo fotossintético. Pois, elas emitem comprimento de onda correspondente à luz ultravioleta, a qual é prejudicial ao cultivo *in vitro* das plantas. Contudo, os LEDs (100.000 horas) destacam-se das lâmpadas fluorescentes (4.000 horas) por apresentarem, entre outras vantagens, a maior vida útil, podendo durar mais 20 vezes.

Quanto ao comprimento da brotação, ainda na fase de multiplicação, notou-se efeito significativo para o tipo de luz. Obteve-se brotação com

tribuir de forma positiva para o incremento no número de brotações formadas por explante. Podendo contribuir para a obtenção de taxas de multiplicação igual ou até superior as obtidas com as lâmpadas tradicionalmente usadas como à lâmpada fluorescentes branca e growlux. A lâmpada growlux destaca-se por possui espectros azul, amarelo e vermelho distante (Sylvania, 2000). A presença do espectro do vermelho distante na lâmpada growlux, em vez do verde emitido pela lâmpada fluorescente, pode está relacionado com o maior número de brotações ao se comparar os dois tipos de lâmpadas fluorescentes. Segundo Taiz & Zeiger (2004) a luz monocromática verde pouco contribui para a eficiência fotossintética, devido ao fato da luz verde ser refletida pela clorofila *a*.

Diferentemente da luz monocromática dos LEDs, as lâmpadas fluorescentes brancas caracterizam por apre-

comprimento variando entre 18,1 mm (lâmpada growlux) a 23,1 mm (LEDs vermelhos). As brotações de menor comprimento foram obtidas sob as lâmpadas Growlux, não houve diferença entre as brotações cultivadas sob os demais tipos de luz (Figura 3). De modo geral, o comprimento obtido nas brotações pode ser considerado adequado. Entretanto, o melhor equilíbrio entre número de brotações formadas por explante e comprimento da mesma ocorreu quando os explantes em multiplicação foram cultivados sob os LEDs vermelhos e LEDs azuis (Figura 1 e 3). O efeito positivo dos LEDs na micropropagação de plantas já havia sido relatado em crisântemo (Kim *et al.*, 2004), videira (Poudel *et al.*, 2008) e morangueiro (Rocha *et al.*, 2010).

Na Tabela 1, observa-se que, de modo geral, a porcentagem de enraizamento das brotações de amoreira-

Tabela 1. Variáveis avaliadas em brotações de amoreira-preta cv. Tupy enraizadas em meio de cultura MS e cultivadas sob diferentes tipos de luz durante 30 dias.

Variáveis avaliadas	Tipos de luz					CV (%)
	LEDs azuis	LEDs verdes	LEDs vermelhos	Lâmpadas Growlux	Lâmpadas Fluorescentes	
% Enraizamento	99,87 a	93,08 b	99,84 a	98,29 ab	99,82 a	12,49
Número de raízes	4,67 c	3,79 d	6,03 a	5,56 ab	5,27 bc	6,51
Comprimento da >raiz (mm)	2,74 b	2,24 b	3,45 a	2,66 b	3,30 a	18,51
Diâmetro da >raiz (mm)	0,81 b	0,63 c	0,99 a	0,89 ab	0,90 ab	16,30
Massa fresca da parte aérea	0,20 b	0,03 c	0,38 a	0,18 b	0,30 a	47,89
Massa fresca das raízes	0,15 b	0,004 c	0,32 a	0,062 bc	0,12 bc	96,76

*Médias seguidas por diferente tipo de letra, na linha, diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ao nível de 5 % de probabilidade.

preta foi elevada. A menor porcentagem de enraizamento foi observada nas brotações cultivadas sob os LEDs verdes (93,08 %), a qual não diferiu dos resultados obtidos sob as lâmpadas Growlux (98,29). Nota-se portando a facilidade de enraizamento *in vitro* da amoreira-preta cultivar Tupy. Contudo, mesmo não existindo diferença na porcentagem de enraizamento sob os LEDs azuis, LEDs vermelhos, lâmpadas fluorescentes e lâmpadas Growlux, observou-se que o maior número de raízes formadas por brotação e o comprimento da maior raiz foi obtido nas brotações cultivadas sob os LEDs vermelhos, porém estes não diferiram das obtidas nas brotações cultivadas sob as lâmpadas fluorescentes (Figura 4). De acordo com Bobrowski *et al.* (1996), que avaliaram a micropropagação *in vitro* de três cultivares de amoreira-preta, o sucesso na aclimatização das brotações micropropagadas depende tanto da presença de raízes como também da qualidade das mesmas, tais como número e comprimento das raízes.

Em relação ao peso da massa fresca da parte aérea, os maiores valores foram obtidos com as brotações cultivadas sob os LEDs vermelhos ($0,38 \text{ mg} \cdot \text{planta}^{-1}$) e lâmpadas fluorescentes ($0,30 \text{ mg} \cdot \text{planta}^{-1}$), os quais não diferiram entre si, sendo a massa fresca das brotações cultivadas sob os LEDs verdes a menor ($0,034 \text{ mg} \cdot \text{planta}^{-1}$) (Tabela 1). Quanto ao peso fresco do sistema radicular, o maior valor foi observado nas brotações cultivadas sob os LEDs vermelhos e o menor sob os LEDs verdes (Tabela 1). Nhut *et al.* (2003) avaliando o enraizamento de morangueiro também obteve a maior quantidade de matéria fresca da parte aérea e maior quantidade de matéria seca das raízes nas brotações cultivadas sob o LED vermelho. O maior peso obtido na parte aérea e radicular nas brotações cultivadas sob os LEDs vermelhos pode ser atribuído a maior armazenamento de carboidratos. De acordo com Wu *et al.* (2007) a luz vermelha contribui para a acumulação de amido. Vale ressaltar que as brotações enraizadas, quando submetidas a fase de aclimatização apresentam mais chances de sobrevivência quando elas possuem maior quantidade de reserva acumulada em seus tecidos.

Diante do exposto, pode-se afirmar os LEDs con-



Figura 4. Aspectos das brotações de amoreira-preta cv. Tupy enraizadas no meio de cultura MS e cultivadas por 30 dias sob os LEDs azuis-EDEB 3LA1 470 nm, LEDs verdes-EDET 3LA1 530 nm, LEDs vermelhos-EDER 3LA3 630 nm, lâmpadas Growlux e lâmpadas fluorescentes (esquerda/direita).

tribuem positivamente na taxa de multiplicação de explantes e no processo de enraizamento. Por isso os LEDs são recomendados para a propagação *in vitro* de amoreira-preta, pois são vantajosos pelo menor consumo de energia elétrica, por aquecerem menos o ambiente de cultivo e por terem maior vida útil 20 vezes mais que as lâmpadas fluorescentes (Yeh & Chung, 2009).

4. Conclusões

A luz emitida pelos LEDs vermelhos-EDER 3LA3 630 nm e lâmpadas Growlux proporcionam maior número de brotações da amoreira-preta cv. Tupy do que as lâmpadas fluorescentes brancas tradicionais. O comprimento das brotações é influenciado pelo tipo da luz, sendo os LEDs vermelhos-EDER 3LA3 630 nm a fonte de luz que melhor contribui para a obtenção do maior número de brotações por explante e que são de maior comprimento.

5. Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto e a concessão de bolsas de estudo.

6. Bibliografia

Abadi, A.J.N. & Hamidoghli, Y. 2009. Micropropaga-

- tion of thornless trailing blackberry (*Rubus* sp.) by axillary bud explants. Australian Journal of CropScience, 3(4): 191-194.
- Bobrowski, V.L.; Mello-Farias, P.C. & Peters, J.A. 1996. Micropropagation of blackberries (*Rubus* sp.) cultivars. 1996. Revista Brasileira de Agrociência, 2(1):17-20.
- Couto, M.; Antunes, L.E.C.; Carpenedo, S. & Trevisan, R. 2009. Crescimento de plantas micropropagadas de amoreira-preta. Revista Brasileira de Fruticultura, 31(3):792-797.
- Hassimotto, N.M.A.; Pinto, M.S. & Lajolo, F.M. 2008. Antioxidant status in humans after consumption of blackberry (*Rubus fruticosus* L.) juices with and without defatted milk. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56: 11727-11733.
- Kim, S.J.; Hahn, E.J.; Heo, J.W. & Paek, K.Y. 2004. Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of Chrysanthemum plantlets *in vitro*. Scientia Horticulturae, 101: 143-151.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15:473-497.
- Nhut, D.T.; Takamura, T.; Watanabe, H. & Tanaka, M. 2003. Efficiency of a novel culture system by using light-emitting diode (led) on *in vitro* and subsequent growth of micropropagated banana plantlets. Acta Horticulturae, 616:121-127.
- Nhut, D.T. & Nam, N.B. 2010. Light-emitting diodes (LEDs): An artificial lighting source for biological studies. Proceedings of the 3rd International Conference on the Development of BME, 133-138.
- Oliveira, R.P.; Nino, A.F.P. & Ferreira, L.V. 2008. Potencial de multiplicação *in vitro* de cultivares de amoreira-preta. Revista Brasileira de Fruticultura, 30(3): 585-589.
- Poudel, P.R.; Kataoka, I. & Mochioka, R. 2008. Effect of red and blue light-emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 92(2): 47-153.
- Rocha, P.S.R.; Oliveira, R.P.; Scivittaro, W.B. & Santos, U.L. 2010. Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morango. Ciência Rural, 40(9):1922-1928.
- Santos, A.M. & Raseira, M.C.B. 1988. Lançamento de cultivares de amoreira-preta. Pelotas: Embrapa-CNPFT. (EMBRAPA: Informativo 23).
- Sylvania. 2000. Light and plants; standard and wide spectrum Sylvania Grow-Lux fluorescent lamps. Danvers: Osram Sylvania. 5p. (Technical Information Bulletin, 1).
- Skin, H.S.; Murthy, H.N.; Heo, J.W.; Hahn, E.J. & Paek, K.Y. 2008. The effect of light quality on the growth and development of *in vitro* cultured Doritaenopsis plant. Acta Physiologia & Plantarum, 30:339-343.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2004. Fisiologia vegetal. Porto Alegre: Artmed. 719p.
- Victório, C.P.; Kuster, R.M. & Lage, C.L.S. 2007. Qualidade de luz e produção de pigmentos fotossintéticos em plantas *in vitro* de *Phyllanthus* Roxb. Revista Brasileira de Biociências, 5(2): 213-215.
- Wu, M.C; Hou, C.Y.; Jiang, C.M.; Wang, Y.T. & Wang, C.Y. 2007. A novel approach of LED light radiation improves the antioxidant activity of pea seedlings. Food Chemistry, 101:1753-1758.
- Yeh, N. & Chung, J.P. 2009. High-brightness LEDs: energy efficient lighting sources and their potential in door plant cultivation. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 13:2175-2180.