

CULTURA DE EMBRIÕES IN VITRO PARA O MELHORAMENTO DE PESSEGUEIROS PRECOCES (1)

WILSON BARBOSA (2, 3), FERNANDO ANTONIO CAMPO DALL'ORTO (2, 4) e
MÁRIO OJIMA (2)

RESUMO

Efetuiu-se o experimento de germinação das sementes de quinze seleções de pêssegos e nectarinas, a maioria de maturação bem precoce, através do método da cultura in vitro, de embriões imaturos, em confronto com a germinação obtida pelo processo de estratificação prévia das amêndoas a frio úmido, em substrato de algodão. Para a cultura in vitro, utilizaram-se embriões acompanhados de cotilédones, extraídos de frutos semimaduros, que foram "semeados" em meio de cultura, compostos de macro e microelementos de Murashige e Skoog, acrescido de tiamina a 0,1mg/litro, ácido nicotínico a 0,5mg/litro, inositol a 100mg/litro, glicina a 20mg/litro, ácido giberélico a 0,1mg/litro, glicose a 3% e ágar a 0,7%. Os resultados mostraram que houve excelente desenvolvimento dos embriões in vitro para a maioria das seleções de ciclo bem precoce, e os "seedlings" resultantes tiveram crescimento normal. Ao contrário, o processo de estratificação prévia para as mesmas seleções proporcionou porcentagem de germinação mediana, quando as sementes foram estratificadas logo que extraídas dos frutos, e bastante baixa ou nula quando elas ficaram expostas ao ambiente natural por 96 horas antes da estratificação. Tais resultados indicam que o método de cultura in vitro de embriões imaturos constitui prática indispensável ao programa de melhoramento de pessegueiro, com vista à obtenção de cultivares cada vez mais precoces.

Termos de indexação: pêssego, melhoramento, germinação, cultura de embriões in vitro.

(1) Trabalho de pesquisa integrante do projeto: "Melhoramento genético de frutíferas do gênero *Prunus*: pessegueiro, nectarineira e ameixeira e desenvolvimento das técnicas de cultura embrionária visando à obtenção de cultivares precoces". Auxílio à Pesquisa - FAPESP. Recebido para publicação em 18 de abril de 1984.

(2) Seção de Fruticultura de Clima Temperado, Instituto Agrônomo, IAC, Caixa Postal 28, 13100 - Campinas (SP).

(3) Com bolsa de aperfeiçoamento do CNPq.

(4) Com bolsa de suplementação do CNPq.

1. INTRODUÇÃO

A escassez de bons cultivares de pêssegos de maturação precoce e o crescente interesse dos persicultores paulistas ao cultivo comercial desses materiais, motivaram maior atenção para esse aspecto no programa de melhoramento genético do pessegueiro, em execução no Instituto Agrônômico.

No sentido de obter novos cultivares para as diversas faixas de precocidade, vêm sendo realizados anualmente numerosos cruzamentos controlados entre as seleções de pessegueiros precoces existentes nas coleções de manutenção de germoplasma. A deficiente germinação das sementes obtidas, porém, tem prejudicado a formação de "seedlings" em quantidade suficiente, dificultando o desenvolvimento desse trabalho de melhoramento, nos moldes desejados.

A má germinação das sementes de pessegueiros precoces tem explicação no processo de maturação do fruto, em que um rápido endurecimento do caroço restringe o acúmulo de matéria orgânica na amêndoa, o que causa um desenvolvimento anormal do embrião, tornando-o pouco vigoroso e incapaz de germinar naturalmente. Entretanto, o cultivo *in vitro* desses embriões viabiliza a sua germinação e obtenção de maior número de plântulas vigorosas, possibilitando a constituição de grandes lotes de genótipos precoces, para posterior seleção dos descendentes mais promissores.

O cultivo em meio artificial de embriões de sementes de frutíferas, especialmente do gênero *Prunus*, é bastante conhecido, e foi desenvolvido há meio século, através do emprego dos mais diversos métodos. DAVIDSON (1933, 1935) e TUKEY (1933, 1938), na década de 30, utilizavam o meio asséptico de cultura para induzir a germinação das sementes de plantas decíduas, entre elas o pessegueiro, pesquisando, concomitantemente, a vernalização dos embriões e o desenvolvimento das plantas resultantes. SKIRM (1942) fez uso do "meio de cultura" para proporcionar condições de germinação às sementes de cruzamentos interespecíficos dentro do gênero *Prunus*. LAMMERTS (1942) utilizou a técnica de cultura de embrião para encurtar o ciclo de melhoramento das plantas decíduas. GILMORE (1950) descreveu técnicas para melhor desenvolvimento dos embriões de pêssego, em meio de cultura. KESTER & HESSE (1955) trabalharam com a cultura de embriões de pêssegos, em relação às épocas de maturação dos frutos. SMITH et alii (1969) descreveram métodos para a germinação das sementes de diferentes espécies frutíferas, detalhando particularmente a cultura do embrião de pêssego. Esses pesquisadores foram os pioneiros no emprego desse método, oferecendo novas perspectivas aos melhoristas, na obtenção de cultivares superiores, especialmente no que tange à precocidade de maturação.

BARBOSA et alii (1984), trabalhando com sementes de pêsegos, observaram que quando extraídas dos frutos e estratificadas imediatamente, elas se apresentavam com a germinação significativamente aumentada, principalmente em se tratando de material precoce.

Na Seção de Fruticultura de Clima Temperado, procurou-se desenvolver um método da cultura embrionária, inicialmente de modo improvisado, com utilização dos equipamentos precários disponíveis, tais como câmaras de vidro com lâmparas e painéis de pressão comuns. Apesar da improvisação e das dificuldades encontradas, obtiveram-se resultados preliminares bastante promissores. A recente montagem dos equipamentos básicos necessários, com câmara asséptica de fluxo laminar, autoclave, balança, possibilitou, finalmente, a adoção rotineira do processo padrão de cultura embrionária, como uma etapa imprescindível ao programa de melhoramento genético do pessegueiro, visando à obtenção de cultivares cada vez mais precoces.

O presente trabalho mostra os índices de germinação de sementes de quinze cultivares de pessegueiro, a maioria de maturação precoce, alcançados através do processo de cultura de embrião imaturo in vitro, em confronto com os obtidos pela estratificação prévia de sementes a frio úmido, e relaciona esses resultados com o índice de precocidade de maturação de cada material.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se, para esta experimentação, sementes de quinze seleções de pêsegos e nectarinas, constantes dos lotes de manutenção de germoplasma da Seção de Fruticultura de Clima Temperado, localizados na Estação Experimental de Jundiá. Trata-se, em sua maioria, de seleções precoces introduzidas da Flórida, EUA, e de seleções do IAC de várias épocas de maturação de frutos: ultraprecoce ('Fla. 7-3P'); bem precoce ('Flordaprince', 'Sunlite', 'Flordawon', 'Fla. 6-3N' e 'Fla. 3-4N'); precoce ('Jóia-1', 'Sunlite', 'Precoce de Itupeva', 'Rubro-sol' e 'Doçura-2'); semiprecoce a mediana ('Setembrino', 'Talismã' e 'Catita') e tardia ('Bolão') (CAMPINAS, 1980; OJIMA et alii, 1983a, 1983b, 1984; RIGITANO et alii, 1975; SHERMAN et alii, 1982).

No ano agrícola de 1982, colheram-se os frutos semimaduros dessas seleções, e, no laboratório, extraíram-se os caroços, que foram superficialmente esterilizados com hipoclorito de sódio a 2,5% por 30 minutos, e deixados 24 horas em água destilada. Após esse período de hidratação, partiram-se os caroços, e as amêndoas túrgidas e íntegras, após contadas e separadas em três grupos de 50 cada um por seleção, foram colocadas em béque-

res de 100ml, e esterilizadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 1% e Tween a 0,1% por 10 minutos. A seguir, foram enxaguadas várias vezes em água estéril e mantidas em ambiente asséptico.

Constituíram exceção a esse procedimento as sementes de seleção Fla. 7-3P, cujas amêndoas, bastante rudimentares, se apresentaram completamente atrofiadas. Com o primeiro grupo de 50 amêndoas, destinadas à cultura *in vitro*, fez-se a retirada da película parda envolvente, em condições assépticas da câmara de fluxo laminar, mantendo-as em placas de Petri esterilizadas em autoclave. Procedeu-se, em seguida, à “semeadura” asséptica dos embriões, acompanhados sempre de seus respectivos cotilédones, em tubos de ensaios, com o meio nutritivo para germinação e desenvolvimento.

O meio foi composto de macro e microelementos de MURASHIGE & SKOOG (1962), acrescido de: tiamina a 0,1mg/litro; ácido nicotínico a 0,5mg/litro; inositol a 100mg/litro; glicina a 20mg/litro; ácido giberélico a 0,1mg/litro; glicose a 3% e ágar a 0,7%. O pH foi controlado para 5,6 com 0,1N de KOH.

Após a “semeadura” dos embriões, em número de 50 para cada seleção, os tubos de ensaio, devidamente vedados e identificados, foram mantidos em ambiente de geladeira ao redor de 5°C por 50 dias (1.200 horas de frio).

Paralelamente à cultura dos embriões *in vitro*, procedeu-se à estratificação das 100 amêndoas remanescentes de cada seleção em estudo, mantendo-as por 50 dias em algodão levemente umedecido, a 5-10°C de temperatura. Cinquenta delas foram estratificadas logo após extraídas dos frutos, e as outras 50, depois de permanecerem em ambiente de laboratório, por 96 horas.

Transcorridos os 50 dias, foi possível fazer a avaliação da germinação e o confronto dos três métodos adotados.

Para determinar o ciclo de precocidade de maturação dos frutos, efetuou-se o controle fenológico da frutificação de cada seleção, estimando-se, em dias, o período compreendido entre o pleno florescimento das plantas e o estágio comercial de colheita. Esse controle foi realizado em 1983, nos lotes experimentais localizados na Estação Experimental de Jundiá, onde se verificaram as seguintes médias mensais de temperatura e precipitação pluvial em grau Celsius e milímetro, respectivamente, no período de observação: junho: 16,9 e 229,8; julho: 17,6 e 281,0; agosto: 17,6 e 165,0; setembro: 17,9 e 291,6; outubro: 20,7 e 169,8; novembro: 22,3 e 175,4 e dezembro: 23,1 e 224,0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após permanecerem durante 1.200 horas na geladeira, os embriões em meio de cultura apresentavam um bom início de crescimento, medindo aproximadamente 4mm de comprimento nos cultivares precoces, e cerca de 9mm, nos medianos e tardios. Retirados do ambiente frio e colocados no natural, a cerca de 25°C de temperatura, no escuro, verificou-se um mais rápido desenvolvimento dos embriões, notavelmente da radícula. Transcorridos apenas sete dias, ainda no escuro, o epicótilo já media cerca de 2 e de 3cm de comprimento e o hipocótilo, ao redor de 5 e 7cm respectivamente para os cultivares de ciclos de maturação entre 80 e 95 dias, e entre 112 e 200 dias. Após essa fase, os embriões expostos à luz contínua por vinte dias, apresentavam-se com desenvolvimento normal, em condições de serem transplantados para vasos com terra esterilizada.

Como se pode observar no quadro 1, houve acentuada diferença na germinação, dependendo do método utilizado. As sementes dos cultivares das faixas de maturação mais precoce e que ficaram expostas por 96 horas ao ambiente natural antes de serem estratificadas, perderam rapidamente o poder germinativo, devido à desidratação das amêndoas, mostrando percentagens de germinação muito baixas, enquanto as seleções semiprecoces, medianas e tardias, não se desidrataram tão facilmente e apresentaram-se com germinação normal.

Ao contrário, as sementes recém-extraídas dos frutos e imediatamente estratificadas, mesmo nos cultivares de maturação mais precoce, que normalmente germinam mal pelo processo rotineiro, apresentaram-se com índices de germinação satisfatórios. As demais seleções mostraram altas porcentagens de germinação.

O método da cultura embrionária in vitro, por sua vez, proporcionou os mais altos índices de germinação, tanto para os cultivares mais precoces, 80 a 95%, como para os demais, que germinaram praticamente 100%. A seleção Fla. 7-3P, por ser extremamente precoce, com ciclo de maturação dos frutos ao redor de 70 dias, e por apresentar embrião bastante atrofiado, foi a única exceção ao pleno êxito desse método. Nesse caso, talvez, a única possibilidade que se vislumbra para a obtenção de resultados positivos seria o emprego da cultura in vitro do material embrionário, em uma fase mais antecipada de desenvolvimento dos frutos, ou seja, antes que ocorra o aborto do embrião.

As altas germinações alcançadas através do método da cultura in vitro de embriões imaturos, evidentemente, conduzem a um maior rendimento na formação de "seedlings", possibilitando a desejada dinamização dos trabalhos de melhoramento, com vista à obtenção de novas seleções cada vez

QUADRO 1 — Germinação de sementes de pessegueiros de diferentes ciclos de precocidade de maturação, com o emprego de três processos: 1. estratificação imediata das amêndoas; 2. estratificação após 96 horas; 3. cultura embrionária in vitro. Instituto Agrônômico, Campinas, 1983

Cultivar	Precocidade de maturação (*)	Germinação		
		Estratificação		Cultura in vitro
		Imediata	Após 96 horas	
	dias	%	%	%
'Fla. 7-3 P'(**)	70	0	0	0
'Flordaprince' (Fla. 5-2 P)	80	54	5	80
'Maravilha' (Fla. 13-72 P)	83	40	2	85
'Flordawon'	85	45	3	90
'Fla. 6-3 N'	86	80	5	90
'Fla. 3-4 N'	90	60	6	95
'Jóia' (IAC 771-1)	95	95	5	100
'Sunlite'	95	88	15	100
'Precoce de Itupeva' (IAC 4474-5)	112	85	25	100
'Rubro-sol' (Sunred)	112	94	30	100
'Doçura-2' (IAC 2370-3)	115	97	30	100
'Setembrino' (IAC 2-70)	120	98	45	100
'Talismã' (IAC 1353-11)	138	98	90	100
'Catita' (IAC TC-37)	150	100	95	100
'Bolão' (IAC 158-2)	200	100	100	100

(*) Tempo decorrido desde o pleno florescimento até a colheita comercial.

(**) Amêndoas com embriões abortivos.

mais precoces, não só de pessegueiros, inclusive nectarinas — mas também de outras espécies do gênero *Prunus*, que apresentam sementes com características similares.

Vale observar que os "seedlings" obtidos em decorrência do presente trabalho foram inicialmente desenvolvidos em vasos com terra esterilizada, sob condições controladas de ripado, à meia sombra, com 50% de luminosidade, onde o crescimento das plantas foi dos mais satisfatórios.

Os materiais descendentes dos paternais precoces, juntamente com outros resultantes de polinizações livres e controladas num total de 1.600, foram destinados à formação do novo lote de seleção de pessegueiros hem precoces, em 1983, na Estação Experimental de Jundiaí.

SUMMARY

IN VITRO EMBRYO CULTURE FOR EARLY RIPENING PEACH BREEDING

This paper compares the results of an embryo culture with those of the usual seed stratification process. One hundred seeds obtained from early ripening peach were stratified either immediately after extraction from fruits (50 seeds) or after exposure to room temperature for 96 hours (50 seeds). Embryos from mature fruits were cultured aseptically in vitro on nutrient media containing the macro and microelements of Murashige & Skoog, inositol, thiamine, nicotinic acid, glycine, GA3, sucrose and agar at 5°C for 50 days. Results showed that the culture media increased the seed germination as compared with the stratification treatments. The embryo-culture technique had the highest percentage of germination and of the seedlings and could well be used in the breeding program to shorten the ripening cycles of peaches.

Index terms: peach breeding, germination, in vitro embryo culture.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, W.; CAMPO DALL'ORTO, F.A. & OJIMA, M. Relação entre precocidade de maturação e desidratação das sementes de pêsego. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 19(3):337-339, 1984.
- CAMPINAS. Instituto Agrônômico. Cultivares lançados pelo IAC no período 1968-1979. O Agrônômico, Campinas, 32:39-168, 1980.
- DAVIDSON, O.W. The germination of "non-viable" peach seeds. Proceedings of the American Society Horticultural Science, 30:129-132, 1933.
- . Growing trees from "non-viable" peach seeds. Proceedings of the American Society for Horticultural Science, 32:308-312, 1935.
- GILMORE, A.E. A technique for embryo culture of peaches. Hilgardia, 20:147-170, 1950.
- KESTER, D.E. & HESSE, C.O. Embryo culture of peach varieties in relation to season of ripening. Proceedings of the American Society of Horticultural Science, 65:265-273, 1955.
- LAMMERTS, W.E. Embryo culture an affective technique for shortening the breeding cycle of deciduous trees and increasing germinations of hybrid seed. American Journal of Botany, 29:166-171, 1942.

- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497, 1962.
- OJIMA, M.; CAMPO DALL'ORTO, F.A.; BARBOSA, W. & TOMBOLATO, A.F.C. Comportamento do pêssego 'Flordaprince' – Nova seleção bem precoce introduzida da Flórida. *Bragantia*, Campinas, 43(1):261-266, 1984.
- ; —————; RIGITANO, O.; TOMBOLATO, A.F.C. & BARBOSA, W. Melhoramento da nectarina em São Paulo. I. Cruzamento de 1970: Seleção nas gerações F1 e F2. *Bragantia*, Campinas, 42:1-14, 1983a.
- ; —————; —————; SCARANARI, H.J.; MARTINES, F.P.; TOMBOLATO, A.F.C. & BARBOSA, W. Quatro novos cultivares IAC de pêssegos amarelos para mesa. *Bragantia*, Campinas, 42:271-279, 1983b. (Nota, 8)
- RIGITANO, O.; OJIMA, M.; CAMPO DALL'ORTO, F.A. Comportamento de novas seleções de pêssegos introduzidos da Flórida. Campinas, Instituto Agrônômico, 1975. 12p. (Circular, 45)
- SHERMAN, N.B.; LYRENE, P.M.; NORTENSEN, J.A. & SHARPE, R.H. Flordaprince, a peach for Central Florida. Gainesville, University of Florida, 1982. 4p. (Circular, S-294)
- SKIRM, G.W. Embryo culturing as an aid to plant breeding. *Journal of Heredity*, 33:211-215, 1942.
- SMITH, C.A.; BAILEY, C.H. & HOUGH, L.F. Methods for germinating seeds of some fruit species with special reference to growing seedlings from immature embryos. New Jersey, Agricultural Experiment Station, 1969. 29p. (Bulletin, 823)
- TUKEY, M.B. Growth of peach embryo in relation to growth of fruit and season of ripening. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science*, 30:209-218, 1933.
- . Growth patterns of plant development from immature embryos in artificial culture. *Botanical Gazette*, 99:630-665, 1938.