

Multiplicação fotoautotrófica *in vitro* de pereiras 'Abate Fetel'

Photoautotrophic multiplication *in vitro* of 'Abate Fetel' pears

Fernando José Hawerth^{1*} André Luiz Külkamp de Souza¹ Luana Borges Affonso¹
Daniele Camargo Nascimento¹ Márcia Wulff Schuch¹

-NOTA-

RESUMO

Novas cultivares de pereira têm sido introduzidas no Brasil, como a 'Abate Fetel'. A produção de mudas de qualidade dessa cultivar é necessária, sendo possível obter tal cultivar pelo uso de técnicas de micropropagação. Objetivou-se avaliar diferentes concentrações de sacarose e tipos de vedação dos frascos na multiplicação *in vitro* de pereiras 'Abate Fetel'. Segmentos nodais contendo de duas a três gemas axilares, de aproximadamente 1cm de comprimento, oriundos de plantas pré-estabelecidas *in vitro*, foram inoculados em meio de cultura 'QL', suplementados com mio-inositol (100mg L⁻¹), sacarose (0, 15, 30, 45g L⁻¹), BAP (1mg L⁻¹), AIB (0,1mg L⁻¹) solidificado com 6,5g L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,7. Os frascos foram vedados com algodão, alumínio ou filme plástico de PVC e mantidos em sala de crescimento a 25±2°C, com intensidade luminosa de 42µmoles m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas. Os frascos vedados com algodão apresentaram o maior número de folhas na ausência de sacarose, não sendo observado efeito das concentrações de sacarose presentes no meio de cultura sobre o número de brotações e número de folhas formadas. O comprimento médio das brotações e a massa fresca total não diferiram entre os tipos de vedação empregados, porém observou-se aumento expressivo dessas variáveis frente ao aumento da sacarose no meio de cultura. A vedação dos frascos com filme de PVC proporcionou o maior número de brotações por explante quando utilizadas altas concentrações de sacarose.

Palavras-chave: *Pyrus communis*, vedação dos frascos, sacarose, explantes.

ABSTRACT

New pear cultivars have been introduced in Brazil as the 'Abate Fetel'. Seedling production with higher quality

of this cultivar is needed, and this can be obtained by use of micropropagation techniques. The objective of the present study was to evaluate different sucrose concentrations and types of closure flasks on micropropagation of 'Abate Fetel' pears. Nodal segments with two to three axillary buds, about 1 cm in length, from plants pre-established *in vitro*, were inoculated on 'QL' culture medium supplemented with myo-inositol (100mg L⁻¹), sucrose (0, 15, 30, 45g L⁻¹), BAP (1mg L⁻¹), IBA (0.1mg L⁻¹) solidified with 6.5g L⁻¹ agar and pH adjusted to 5.7. The flasks were closed with cotton, aluminum or PVC plastic film and kept in a growth chamber at 25±2°C, light intensity of 42µmoles m⁻² s⁻¹ and 16h of photoperiod. The flasks closed with cotton showed the highest number of leaves formed in the absence of sucrose and it was not observed effect of sucrose concentration in the culture medium of shoots number and number of leaves formed. The average shoot length and the total fresh weight did not differ between the types of closure flasks used, but there was a significant increase of these variables against the sucrose increase in the culture medium. The closure flasks with PVC film showed the highest number of shoots per explant, when high sucrose concentrations was used.

Key words: *Pyrus communis*, flasks closure, sucrose, explants.

A utilização de mudas com elevado padrão de qualidade morfofisiológica e fitossanitária na implantação de pomares é decisiva para viabilização do sistema de produção de frutas, sobretudo em culturas em expansão, a exemplo da cultura da pereira (*Pyrus* spp.) no Sul do Brasil. Novas cultivares têm sido introduzidas no país, podendo ser destacada a cultivar 'Abate Fetel', a qual pode ser propagada por

¹Programa de Pós-graduação em Agronomia, concentração em Fruticultura de Clima Temperado, Departamento de Fitotecnia, Faculdade de Agronomia 'Eliseu Maciel' (FAEM), Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Campus Universitário Capão do Leão, CP 354, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: fjhawerth@gmail.com.br. *Autor para correspondência.

meio da micropropagação, proporcionando a obtenção de mudas sadias em curto espaço de tempo. Entretanto, o emprego da micropropagação em escala comercial na produção de mudas pode ser limitado, devido, entre outros fatores, ao elevado custo para obtenção da muda (ERIG & SCHUCH, 2005).

Em busca de alternativas para reduzir os custos da micropropagação convencional e melhorar a qualidade fisiológica das plantas produzidas, aumentando a sobrevivência durante o período de aclimatização, destaca-se o desenvolvimento da micropropagação fotoautotrófica (DAMIANI & SCHUCH, 2009). Esse método consiste na produção de micropropágulos sob condições ambientais que maximizem a fotossíntese, de modo a diminuir riscos de contaminação microbiana pela diminuição de sacarose no meio de cultura, reduzir custos de produção e melhorar características fisiológicas da planta, facilitando sua aclimatização às condições *ex vitro* (AFREEN et al., 2002).

Entre as práticas utilizadas para promover o crescimento fotoautotrófico das plantas *in vitro*, destaca-se a eliminação total ou parcial da sacarose do meio de cultura (KOZAI & KUBOTA, 2001), visto que a sacarose, açúcar mais utilizado na micropropagação, em teores elevados, pode inibir a síntese de clorofila nas espécies cultivadas (RODRIGUES et al., 2006). A utilização de diferentes sistemas de vedação de frascos pode ser efetiva em sistemas de micropropagação fotoautotrófica, visto que, segundo KOZAI & KUBOTA (2001), o aumento da concentração de CO₂ e diminuição da concentração de etileno e da umidade relativa dentro dos frascos de cultivo, assim como o aumento da intensidade luminosa, também podem aumentar a atividade fotossintética das plantas *in vitro*. Nesse sentido, objetivou-se avaliar diferentes concentrações de sacarose e tipos de vedação dos frascos na multiplicação *in vitro* de pereiras 'Abate Fetel' visando ao aperfeiçoamento de sistemas de micropropagação fotoautotrófica.

Segmentos nodais de pereiras 'Abate Fetel' (*Pyrus communis* L.), contendo de duas a três gemas axilares, com 1cm de comprimento, oriundos de plantas pré-estabelecidas *in vitro*, foram inoculados em meio de cultura 'QL' descrito por QUOIRIN & LEPOIVRE (1977) e modificado por LEBLAY et al. (1991), acrescido de diferentes concentrações de sacarose (0, 15, 30, 45g L⁻¹), 100mg L⁻¹ de mio-inositol, 1mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) e 0,1mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 antes da adição de 6,5g L⁻¹ de ágar. Foram distribuídos 50mL de meio de cultura em cada frasco 'Erlenmeyer' de 250mL de capacidade, sendo

esterilizados em autoclave por 20 minutos à temperatura de 120°C e 1,5atm de pressão.

Cinco explantes foram inoculados em cada frasco, em câmara de fluxo laminar, sendo os frascos vedados com algodão, alumínio e filme plástico de policloreto de vinila (PVC). Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento a 25±2°C, 16 horas de fotoperíodo e intensidade luminosa de 42μmol m⁻² s⁻¹. As avaliações foram realizadas 45 dias após a manutenção dos explantes em sala de crescimento, sendo mensurados o número e o comprimento médio das brotações, o número médio de folhas formadas e a massa fresca total.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições compostas de um frasco contendo cinco explantes, segundo um fatorial 4x3, obtido da combinação de quatro concentrações de sacarose (0, 15, 30, 45g L⁻¹) e três níveis do fator vedação dos frascos (alumínio, algodão e filme plástico de PVC). As variáveis foram transformadas a fim de atender as pressuposições da análise de variância, sendo efetuada a transformação raiz quadrada (x+0,5). As variáveis significativas tiveram as médias comparadas pelo teste Tukey, a 5% de significância, para o fator tipo de vedação, e para o fator sacarose foi efetuada a análise de regressão polinomial.

Em relação ao número de médio de brotações por explante, houve interação entre os fatores concentração de sacarose e tipo de vedação dos frascos (Tabela 1). Comparando os diferentes tipos de vedação estudados, foi verificada diferença significativa apenas na concentração de 30mg L⁻¹ de sacarose, destacando-se a vedação com alumínio, que apresentou média de 1,35 brotações por explante. O número médio de brotações apresentou resposta quadrática ao aumento da sacarose no meio de cultura, e a concentração de 23,3mg L⁻¹ de sacarose proporcionou máxima resposta para essa variável (Figura 1a). Concentrações de sacarose acima desse limite reduziram significativamente o número de brotações por explante com esse tipo de vedação, assim como observado por AHMAD et al. (2007) na multiplicação do porta-enxerto de pessegueiro 'GF-677'. De acordo com RODRIGUES et al. (2006), a sacarose em altas concentrações pode reduzir a síntese de clorofila, a qual, associada a menor passagem de luz e maior concentração de etileno e umidade no interior dos frascos vedados com papel alumínio, pode diminuir a fotossíntese, de forma a reduzir a formação de novos explantes, justificando a resposta observada neste estudo.

Quando os frascos foram vedados com filme de PVC, o número de brotações por explante aumentou

Tabela 1 - Número médio de brotações e número médio de folhas formadas em explantes de pereiras 'Abate Fetel', em função de concentrações de sacarose no meio de cultura e tipos de vedação nos frascos de multiplicação. FAEM/UFPeL, Pelotas/RS, 2009.

Tipo de vedação	Sacarose (g L ⁻¹)							
	0		15		30		45	
	-----Número médio das brotações-----							
Algodão	0,60	a	0,90	a	0,65	b	0,85	a
Alumínio	0,70	a	1,00	a	1,35	a	0,65	a
Filme de PVC	0,15	a	1,15	a	0,65	b	1,20	a
	F (tipo de vedação x sacarose) = 4,36*				Coeficiente de Variação = 11,84%			
	-----Número médio de folhas formadas-----							
Algodão	9,40	a	9,90	a	7,05	b	9,40	ab
Alumínio	7,50	ab	12,10	a	15,25	a	6,90	b
Filme de PVC	3,05	b	12,40	a	9,15	ab	14,00	a
	F (tipo de vedação x sacarose) = 4,92*				Coeficiente de Variação = 17,31%			

* Valor do teste F significativo a 5% de probabilidade de erro; Médias não seguidas de letras minúsculas iguais na coluna diferem significativamente pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

significativamente com o incremento das concentrações de sacarose, enquanto que, nos frascos vedados com algodão, o aumento da sacarose no meio de cultura

não foi significativo, e a média manteve-se em 0,75 brotações por explante (Figura 1a). O efeito não significativo das concentrações de sacarose no número

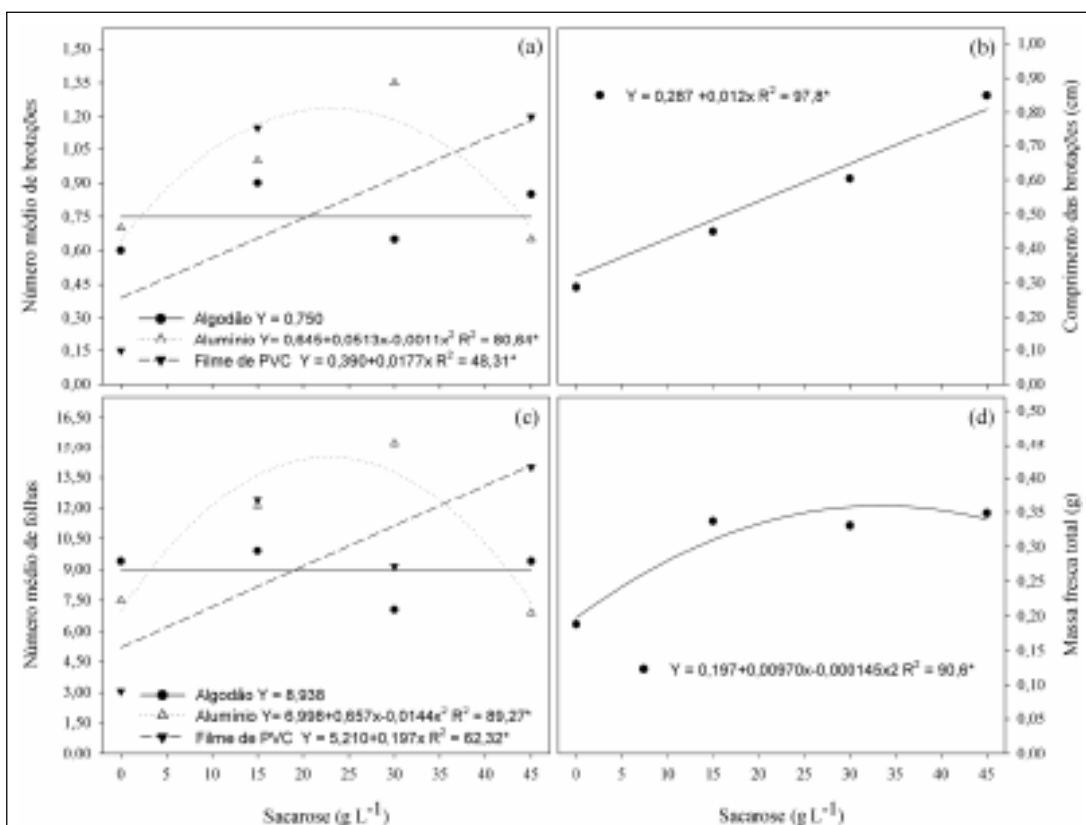


Figura 1 - Efeito de concentrações de sacarose no meio de cultura sobre o número médio de brotações (a), o comprimento das brotações (b), o número médio de folhas (c) e a massa fresca total (d) de explantes de pereiras 'Abate Fetel' micropropagadas em frascos com diferentes tipos de vedação. FAEM/UFPeL, Pelotas/RS, 2009.

médio de brotações por explante, observado nos frascos vedados com algodão, pode estar relacionado à maior permeabilidade a gases desse tipo de vedação. Segundo KOZAY & NGUYEN (2003), esse fechamento dos frascos de cultivo pode favorecer as trocas gasosas, aumentando a concentração de CO₂ e, simultaneamente, reduzindo a umidade relativa e a concentração de etileno. Tais condições podem ter maximizado a produção de fotoassimilados pela fotossíntese, diminuindo a necessidade da sacarose do meio de cultura como fonte de carboidratos para a formação de novos explantes.

O comprimento das brotações não foi afetado pelos tipos de vedação estudados, sendo verificado apenas efeito significativo da concentração de sacarose sobre essa variável (Figura 1b). O tipo de vedação dos frascos, além de interferir na passagem de luz para o interior dos frascos, altera a interceptação de luz pelos explantes, afetando, de acordo com SOUZA et al. (1999), sua capacidade de transpiração e, devido à retenção de água, a quantidade de massa fresca total produzida. A massa fresca das brotações foi influenciada unicamente pela concentração de sacarose no meio, exibindo resposta quadrática ao aumento da sacarose no meio de cultura (Figura 1d), e o máximo valor para essa variável foi obtido com 33,5mg L⁻¹. A massa fresca e o comprimento das brotações apresentaram aumento proporcional até essa concentração de sacarose, em que o aumento de sacarose a partir desse limite contribui unicamente para o aumento do comprimento das brotações.

Em relação ao número de folhas formadas, houve interação entre os fatores concentração de sacarose e tipo de vedação dos frascos (Tabela 1). A vedação das tampas com algodão proporcionou o maior número de folhas formadas na ausência de sacarose no meio, enquanto que, nas maiores concentrações de sacarose, o melhor desempenho foi observado com a vedação com filme de PVC. O aumento da sacarose no meio de cultura não alterou o número de folhas formadas quando os frascos foram vedados com algodão (Figura 1c). Nos frascos vedados com filme de PVC, o número de folhas formadas aumentou linearmente com o aumento da sacarose no meio, indicando que pode ser obtido aumento do número de folhas formadas com a utilização de concentrações de sacarose superiores às concentrações utilizadas neste estudo. Para os frascos vedados com alumínio, o número de folhas formadas apresentou resposta quadrática frente às concentrações de sacarose, e a concentração mais eficiente foi de 22,8mg L⁻¹. Para a vedação dos frascos com alumínio, o uso de concentrações de acima de 30g L⁻¹ causou drástica

redução do número de folhas formadas, assim como verificado por DAMIANI & SCHUCH (2008) na multiplicação de mirtilheiros (*Vaccinium ashei*) 'Delite'. A síntese de clorofila restringida pelo aumento da concentração de sacarose, associada ao aumento da concentração de etileno e à umidade no interior dos frascos e à diminuição da passagem de luz decorrente da vedação com papel alumínio, pode ter contribuído com a redução da atividade fotossintética, prejudicando a formação de novos tecidos foliares, assim como observado na formação de novos explantes.

De maneira geral, observou-se que a vedação dos frascos com algodão proporcionou maior número de folhas formadas na ausência de sacarose, não sendo observado efeito das concentrações de sacarose presentes no meio de cultura sobre o número de brotações e número de folhas formadas. O comprimento médio das brotações e a massa fresca total não diferiram entre os tipos de vedação empregados; porém, observou-se aumento dessas variáveis frente ao aumento da sacarose no meio de cultura. A vedação dos frascos com filme de PVC proporcionou o maior número de brotações e de folhas por explante quando utilizadas altas concentrações de sacarose.

REFERÊNCIAS

- AFREEN, F. et al. Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: photosynthetic ability and growth of different stage embryos. **Annals of Botany**, London, v.90, p.11-19, 2002.
- AHMAD, T. et al. Comparison of sucrose and sorbitol as main carbon energy sources in micropropagation of peach rootstock GF-677. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v.39, n.4, p.1269-1275, 2007.
- DAMIANI, C.R.; SCHUCH, M.W. Enraizamento *in vitro* de mirtilo em condições fotoautotróficas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.4, p.1012-1017, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782009000400009&script=sci_arttext>. Acesso em: 15 jan. 2010. doi: 10.1590/S0103-84782009005000031.
- DAMIANI, C.R.; SCHUCH, M.W. Multiplicação fotoautotrófica de mirtilo através do uso de luz natural. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, n.2, p.482-487, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452008000200037&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 15 jan. 2010. doi: 10.1590/S0100-29452008000200037.
- ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.961-965, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782005000400039&script=sci_arttext>. Acesso em: 15 jan. 2010. doi: 10.1590/S0103-84782005000400039.

KOZAI, T.; KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v.114, p.525-537, 2001.

KOZAY, T.; NGUYEN, Q.T. Photoautotrophic micropropagation of woody and tropical plants. In: JAIN, S.M.; ISHII, K. **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2003. p.757-781.

LEBLAY, C. et al. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaves of several pear cultivars (*Pyrus communis* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v.25, p.99-105, 1991.

QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de Prunus. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v.78, p.437-442, 1977.

RODRIGUES, M.M. et al. Propagação vegetativa *in vitro* e análise estrutural de macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.1, p.171-173, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2006000100024&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 12 jan. 2010. doi: 10.1590/S0100-204X2006000100024.

SOUZA, C.M. De et al. Influência dos fatores físicos na regeneração de brotos em repolho. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.4, p.830-835, 1999.