

# Superação In Vitro da dormência de embriões de Pereira oriundos de hibridações

Cláudia Simone Madruga Lima<sup>\*1</sup>, Gabriela Gerhardt da Rosa<sup>2</sup>, Zeni Fonseca Pinto Tomaz<sup>3</sup>, Marcia Wullf Schuch<sup>3</sup> e Andrea De Rossi Rufato<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul, Paraná, Brasil. E-mail: claudia.lima@uff.edu.br

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Botânica, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: birela89@gmail.com

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Fitotecnia, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

E-mail: zftomaz@yahoo.com.br; marciaws@ufpel.tche.br

<sup>4</sup> Embrapa Uva e Vinho, Estação Experimental de Fruticultura de Clima Temperado, Vacaria, Rio Grande do Sul, Brasil.

E-mail: andrea.rufato@embrapa.br

\* Autora para correspondência: claudia.lima@uffs.edu.br

ISSN 2448-0479

**Resumo** - Objetivou-se verificar a influência de diferentes meios de cultura na superação *in vitro* da dormência de embriões oriundos de hibridação. Embriões foram retirados de sementes oriundas de hibridações controladas e inoculados nos meios de cultivo: MS; MS/2; QL e QL/2, mantidos em sala de crescimento a  $25\pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dois fatores analisados (hibridações e meios de cultura), em esquema fatorial  $3\times 4$ , sendo que cada repetição constituiu-se de um frasco, com cinco embriões cada. Aos 60 dias de cultivo, o material foi avaliado. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Tuckey ( $\alpha=0,05$ ). Houve interação entre os fatores (meios de cultura e hibridações) para todas as variáveis respostas analisadas. A maior porcentagem de germinação (53,49%), foi obtida na associação do meio de cultura QL/2 com embriões oriundos do tratamento 2. O maior número e comprimento de brotações foi verificado na combinação de embriões do tratamento 1 cultivadas em meio QL e o maior crescimento radicular foi observado no cultivo realizado em meio MS com os embriões oriundos dos tratamentos 1 e 2. O meio QL/2 proporcionou o maior número de embriões de porta-enxertos de pereira germinados. Entretanto o meio QL completo é o mais adequado para multiplicação.

**Palavras-Chave** - Porta-enxerto. Polinização aberta. *Packham's Triumph*. *In vitro*. Melhoramento vegetal.

**Abstract** - This study aimed to investigate the influence of different culture media on the *in vitro* overcoming dormancy of embryos derived from hybridization. Embryos were removed from seeds from controlled hybridizations and inoculated in culture media: MS; MS /2; QL and QL /2, maintained in a growth room at  $25\pm 2^\circ\text{C}$  and 16 h of photoperiod. The experimental design was completely randomized with two factors analyzed (hybridizations and culture media) in a factorial  $3\times 4$ , each repetition consisted of a bottle with five embryos each. After 60 days of culture, the material was analyzed. The data were submitted to analysis of variance and treatment means compared statistically by the Tukey test ( $\alpha = 0.05$ ). There was interaction between the factors (culture media and hybridizations) for all variables. The highest percentage of germination (53.49%) was obtained from the association of culture medium QL / 2 with embryos from the 2 treatment. The greater number and length of sprouts was observed in the combination treatment of embryos cultured in medium 1 QL and root growth was observed in the cultivation carried out on MS medium with the embryos from treatments 1 and 2. The medium QL / 2 provided the greatest number of germinated pear rootstocks embryos. However, QL medium is suitable is the most suitable for multiplication.

**Keywords** - Rootstocks; Open cross; *Packham's Triumph*; *In Vitro*; Breeding.

**Recebido em:** 07 de maio de 2016

**Aprovado em:** 08 de agosto de 2016

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura da pereira na Região Sul do Brasil é uma excelente alternativa para a diversificação da fruticultura de clima temperado, uma vez que é uma das frutas com maior volume de importações. Contudo, vários problemas técnicos e ecofisiológicos vêm limitando o cultivo econômico da pereira, destacando-se a falta de porta enxertos adequados (PIO *et al.*, 2007; PASA *et al.*, 2012).

A busca por novos genótipos de pereira que apresentem boa compatibilidade de enxertia e adaptação às condições edafoclimáticas do Sul do país são contínuas, e o uso de técnicas do melhoramento genético como a hibridação e a micropropagação são ferramentas importantes para obtenção de porta enxertos para pereira.

A baixa porcentagem e desuniformidade de germinação, principalmente nos cruzamentos em que são produzidas sementes em pequeno número, constituem um dos fatores limitantes à obtenção de materiais híbridos (NEVES *et al.*, 2001). Em plantas como as pereiras que apresentam um longo intervalo de tempo a partir do cruzamento até a germinação, torna-se mais difícil e longos os programas de melhoramento genético para esta espécie, que podem ter seu período juvenil encurtado com técnicas de micropropagação (BRUCKNER, 2008).

Com o desenvolvimento de técnicas de cultivo *in vitro*, tornou-se possível, entre outras, obter plantas viáveis em menos tempo. Isto pode ser obtido mediante o isolamento do embrião e seu cultivo asséptico em meios de cultura adequados que permitam a superação da dormência, o desenvolvimento embrionário e a germinação (DANTAS *et al.*, 2002).

Entre os aspectos importantes na cultura de embriões estão a definição do meio de cultura, condições de luminosidade e temperatura, condições da planta matriz, a qualidade dos explantes, entre outros (MINARDI *et al.*, 2011). Conforme Costa e Aloufa (2007) um dos aspectos mais importante da cultura de embriões, é a determinação do meio de cultura, pois este é que sustentará o crescimento dos embriões. Os nutrientes requeridos variam dependendo da idade do explante (BURUN; POYRAZOGLU, 2002). De acordo com Hu e Ferreira (1998), embriões

excisados no estágio maduro ou próximo a este, são quase autotróficos, dispensando a utilização de reguladores vegetais.

Diversas formulações de meio de cultura têm sido empregadas na cultura de embriões, as quais diferem entre si basicamente em relação à concentração dos sais (REZENDE *et al.*, 2008). Segundo Jesus *et al.* (2010), o meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) é conhecido por apresentar elevado conteúdo de sais. Já o meio proposto por Leblay *et al.* (1991) possui o dobro da concentração de vitaminas na sua composição, quando comparado com o meio de cultura MS. Reis *et al.* (2008) analisando o desenvolvimento *in vitro* de embriões de *Melissa officinalis* L., relacionando-o com a redução da concentração dos sais do meio MS, observaram uma correlação direta com a diminuição da concentração e o melhor desenvolvimento das plântulas.

Diante do exposto, o objetivo neste trabalho foi verificar a influência de diferentes meios de cultura na superação *in vitro* da dormência de embriões oriundos de hibridação de porta-enxertos de pereira.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Frutos de pereira oriundos de hibridações controladas foram colhidos maduros, mantendo-se a identificação das polinizações dirigidas. Esta etapa foi realizada em pomar comercial no município de Vacaria/RS, Brasil. Os cruzamentos foram definidos como: T1- Polinização aberta; T2- autopolinização de Packham's Triumph e T3- Packham's Triumph X Clapps Favorite.

A etapa laboratorial foi conduzida no Laboratório de Micropropagação de Plantas Frutíferas, FAEM/UFPEL. As sementes oriundas das hibridações foram removidas mediante corte transversal do fruto, sendo submetidos a uma desinfestação em álcool 70% por 10 segundos e, em hipoclorito de sódio a 2,5%, adicionado de 2 gotas de Tween 20, durante 10 minutos, seguidas de três lavagens com água esterilizada autoclavada.

Os embriões foram então retirados das sementes e inoculados em frasco de vidro, contendo 30mL dos seguintes meios: 1) MS; 2) MS/2; 3) QL (Quiorin; Lepoivre 1977) modificado por Leblay *et al.* (1991) e 4) QL/2, com a metade dos sais. Os meios foram acrescidos de sacarose (30gL<sup>-1</sup>), ágar (6 gL<sup>-1</sup>) e suplementado com os seguintes fitorreguladores: ácido indol acético (1mL L<sup>-1</sup> AIB), 6-benzilaminopurina (5

ml L<sup>-1</sup> BAP). Para as vitaminas, adicionadas no meio Leblay, as quantidades utilizadas foram de 10 mL L<sup>-1</sup> para tiamina, ácido nicotínico e piridoxina, já para glicina utilizou-se 20 mL L<sup>-1</sup>. Após a inoculação, as sementes foram mantidas em sala de crescimento a 25±2°C, no escuro, por um período de sete dias. Depois desse período, o material foi transferido para luz, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 27 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Os tratamentos constituíram-se das três populações de hibridações (T1, T2 e T3) e quatro meios de cultura (MS, MS/2, L, L/2), num fatorial 3x4, totalizando doze tratamentos. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento, sendo que cada repetição constituiu-se de um frasco, com cinco embriões cada. Aos 60 dias de cultivo, o material foi avaliado quanto à índice de velocidade de emergência, percentagem (%) de germinação, número e comprimento (cm) de brotações, número e comprimento (cm) das raízes e percentual (%) de calos. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Tuckey (α=0,05), por meio do uso do programa estatístico Winstat (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2002). Os dados representados em porcentagem foram transformados em arco seno da raiz quadrada de x/100, em que x é o percentual obtido.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve interação entre os fatores (meios de cultura e hibridações) para todas as variáveis respostas analisadas. Considerando-se o fator meio de cultura, a maior percentagem de germinação foi obtida na associação de meio de cultura L/2 (LEBLAY *et al.*, 1991) para todos os tratamentos (Tabela 1). Porém para os embriões submetidos ao meio L completo, observou-se o necrosamento de alguns embriões.

De acordo com Reis *et al.* (2008) e Hu e Ferreira (1998), uma maior concentração de sais no meio de cultura pode interferir no potencial osmótico e, conseqüentemente, na disponibilidade de água para o processo de embebição da semente e na germinação, pois a adição de componentes ao meio de cultura, especialmente macronutrientes e fontes de carbono, representam decréscimo no potencial osmótico do meio. Isso explica os resultados encontrados, pois o meio L/2 possui a metade da concentração de sais.

**Tabela 1** - Percentagem de germinação e índice de velocidade de emergência (IVE) de embriões de pereira, oriundos de diferentes hibridações controladas e cultivados em meio de cultura MS, MS/2, L, L/2. Pelotas/FAEM-UFPel, 2012.

Variável resposta	Meio de cultura	Hibridações - Tratamentos		
		T1	T2	T3
Germinação (%)	MS	39,02 cA	39,10 cA	39,00 cA
	MS/2	39,00 cA	39,29 cA	38,34 dB
	L	40,33 bB	42,34 bA	40,22 bB
	L/2	49,34 aB	53,49 aA	47,39 aC
CV (%)		6,45		
IVE	MS	6,45 bB	7,32 bA	7,67 cA
	MS/2	6,97 bC	8,00 aA	7,88 cB
	L	6,00 cC	7,19 bB	8,00 bA
	L/2	7,13 aB	7,99 aB	8,89 aA
CV (%)		9,33		

\*Médias seguidas por letras iguais minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05). \*\*Hibridações - Tratamentos: T1- Polinização aberta; T2- autopolinização de Packham's Triumph e T3- Packham's Triumph X Clapps Favorite.

Pérez-Hernández e Grajal-Martín (2011), estudando a porcentagem de germinação de híbridos de manga, cultivados em diferentes composições de meio de cultivo, obtiveram eficiência acima de 80% na germinação, para embriões cultivados em meio MS, o mesmo foi observado por Reis *et al.*, (2012) com híbridos de pessegueiro. Entretanto Arbeloa *et al.*, (2009) em teste para a porcentagem de germinação in vitro de genótipos da ameixeira 'Mirabolano', apresentou valores acima de 90% quando utilizou o meio C2d, além disso, Reis *et al.*, (2008) e Soares *et al.*, (2011), observaram que quando embriões foram postos em meio MS com redução da concentração dos sais e vitaminas, a percentagem de germinação foi sempre maior, quando comparado aos embriões postos em MS completo. Desta forma, podemos constatar que os resultados obtidos por esses autores corroboram com os encontrados neste trabalho onde, quando trabalhou-se com teores de sais reduzidos, a germinação dos embriões foi igual ou superior (meio L/2).

Já para o índice de velocidade de emergência o maior percentual ocorreu para embriões oriundos do T3 (Packham's Triumph X Clapps Favorite) associado ao meio de cultura QL/2. Segundo Neves *et al.* (2001), os embriões variam em tamanho e forma em função da espécie e variedade, existindo efeito do genótipo no índice de velocidade de emergência e germinação das plântulas, conforme observado neste trabalho. Reis *et al.* (2008) ao testar a influência do meio de cultura na germinação de sementes de *Melissa officinalis*, in vitro, observou que o maior índice de

velocidade de emergência ocorreu para o tratamento com meio MS/4, e concluiu que isso ocorre, devido a presença de maior concentração de sais no meio de cultura, a qual interfere no potencial osmótico dos tecidos dos embriões, e conseqüentemente, na disponibilidade de água para o processo de germinação.

Em relação ao número e comprimento de brotações a maior formação foi verificada na combinação de embriões oriundos de polinização aberta (tratamento 1) cultivadas em meio L. (Tabela 2). De acordo com Dantas *et al.* (2002) pequenas variações na quantidade de vitaminas e hormônios podem alterar a neoformação de brotos, principalmente para culturas com dificuldades na superação da dormência como macieira e pereira.

**Tabela 2** - Número e comprimento de brotações de embriões de pereira, oriundos de diferentes hibridações controladas e cultivados em meio de cultura MS, MS/2, L, L/2. Pelotas/FAEM-UFPel, 2012.

Variável resposta	Meio de cultura	Hibridações - Tratamentos		
		T1	T2	T3
Número de Brotações	MS	1,43 dA	1,32 cB	1,29 dB
	MS/2	2,76 cA	2,45 bB	2,19 cC
	L	3,19 aA	2,98 aB	2,96 aB
	L/2	2,97 bA	2,37 bB	2,38 bB
CV (%)		7,55		
Comprimento das Brotações (cm)	MS	2,19 dA	2,00 cB	1,98 dB
	MS/2	3,12 cA	2,98 bB	2,12 cC
	L	4,23 aA	3,98 aB	3,23 aB
	L/2	3,29 bA	3,15 bB	3,00 bC
CV (%)		9,34		

\*Médias seguidas por letras iguais minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). \*\*Hibridações - Tratamentos: T1- Polinização aberta; T2- autopolinização de Packham's Triumph e T3- Packham's Triumph X Clapps Favorite.

De acordo com Soares Filho *et al.* (2002), o comportamento dos embriões embora inerente a cada espécie ou cultivar, pode ser influenciado por fatores do meio e ambientais, a exemplo os parentais masculinos envolvidos na polinização que influenciam no crescimento e desenvolvimento do embrião no presente estudo.

O maior crescimento radicular foi observado no cultivo realizado em meio MS com os embriões oriundos dos tratamentos 1 e 2. Entretanto, o número e comprimento de raízes obtidas nestes tratamentos não possibilitam a projeção de aclimatização de plantas, pois os valores são baixos e as raízes são frágeis. Medeiros *et al.* (2006) em trabalho realizado com *Notocactus magnificus* concluiu que o maior número de raízes foi obtido em embriões cultivados em meio MS completo. Reis *et*

*al.* (2012) em estudo com a germinação de embriões de pessegueiro, perceberam que quando utilizado o meio MS completo, obtiveram maior número e comprimento de raízes (7,96 e 4,01cm respectivamente). Soares *et al.* (2011) ressalta que o aumento do número e do tamanho das raízes pode estar relacionado com o aumento da absorção dos nutrientes.

**Tabela 3** - Número e comprimento das raízes e percentual de calo de embriões de pereira, oriundos de diferentes hibridações controladas e cultivados em meio de cultura MS, MS/2, L, L/2. Pelotas/FAEM-UFPel, 2012.

Variável resposta	Meio de cultura	Hibridações - Tratamentos		
		T1	T2	T3
Número de raízes	MS	3,10aA	3,09aA	2,29aB
	MS/2	2,98bA	2,64bB	2,17bC
	L	2,76cA	2,28cB	2,00cC
	L/2	2,16dA	1,98dC	1,50dB
CV (%)		8,26		
Comprimento das raízes (cm)	MS	2,59aB	2,79aA	2,49aB
	MS/2	2,47bA	2,57bA	2,39aB
	L	2,00cB	2,48cA	1,99bB
	L/2	2,00cA	2,00dA	1,89bB
CV (%)		6,35		
Calo (%)	MS	3,44bB	3,55bB	3,90dA
	MS/2	3,00cB	3,46bA	3,73cA
	L	4,35aC	4,66aB	5,32bA
	L/2	4,88aB	4,99aA	5,00aA
CV (%)		8,34		

\*Médias seguidas por letras iguais minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). \*\*Hibridações - Tratamentos: T1- Polinização aberta; T2- autopolinização de Packham's Triumph e T3- Packham's Triumph X Clapps Favorite.

Para que ocorra a formação das raízes, além da disponibilidade de nutrientes é necessária a presença do fitohormônio auxina nos tecidos das plantas, este também é utilizado na cultura *in vitro*, muitas vezes, altas concentrações deste podem levar a formação de calos (RADMANN *et al.*, 2002). Observou-se que a maior percentagem de formação de calos, neste trabalho, ocorreu quando os embriões foram inoculados em meio QL/2, principalmente em combinação com o tratamento 3 (5%). Torres e Caldas (1990) ressaltam que os calos são massas de células desorganizadas, que se multiplicam desordenadamente podendo se diferenciar em tecidos ou órgãos e possuem a capacidade de responderem as injúrias, que podem ser químicas ou físicas.

#### 4 CONCLUSÕES

Para obtenção de maior número de embriões de porta-enxertos germinados, o meio L/2 é o indicado.

Entretanto para multiplicação de embriões oriundos de hibridações o meio L completo é adequado.

## REFERÊNCIAS

- ARBELOA, A. *et al.* In Vitro Culture of 'Myrobalan' (*Prunus cerasifera* Ehrh.) Embryos. **Hortscience**, v.1, n.44, p.672-1.674, 2009.
- BRUCKNER, C.H. **Fundamentos do melhoramento de fruteiras**. Viçosa: UFV, 2009.
- BURUN, B.; POYRAZOGLU, E. Ç. Embryo culture in Barley (*Hordeum vulgare* L.). **Turkish Journal of Biology**, Ankara, v. 8, n.26, p.175-182, 2002.
- COSTA, N.M.S.; ALOUFA, M.A.I. Desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de tamareira. **Revista Ciências Agrônômicas**, Fortaleza, v.38, n. 3, p.276-279, 2007.
- DANTAS, A.C.M. *et al.* Superação *in vitro* da dormência de embriões do porta-enxerto de macieira M9 (*Malus pumilla* Mill.). **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.1, p.10-14, 2002.
- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas: Cultura de embriões**. Brasília: EMBRAPA, 1998.
- JESUS, A.M.S. *et al.* Desenvolvimento *in vitro* de brotações de cafeeiro em diferentes meios de cultura e reguladores de crescimento de planta. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.11, n.6, p.431-436, 2010.
- LEBLAY, C. *et al.* Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaves of several pear cultivars (*Pyrus communis* L.). **Plant Cell, tissue and organ culture**, v.25, n.2. p.99-105, 1991.
- MACHADO, A.A.; CONCEIÇÃO, A.R. **Sistema de análise estatística para Windows**. WinStat. Versão 2.0. Pelotas: UFPel, 2003.
- MEDEIROS, L.A. *et al.* *In vitro* propagation of *Notocactus magnificus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.84, n.2, p.165-169, 2006.
- MINARDI, B.D. *et al.* Cultivo *in vitro* de embriões zigóticos de *Butia eriostatha* (Mart. ex Drude) Becc. **INSULA Revista de Botânica**, Florianópolis, v.40, p.70-81, 2011.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Wojtaszek, v.15, n. 3, p.473-497, 1962.
- NEVES, T.S. *et al.* Resgate *in vitro* de embriões em genótipos diplóides de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.2, p.285-290, 2001.
- PASA, M.S. *et al.* Desenvolvimento, produtividade e qualidade de peras sobre porta-enxertos de marmeleiro e *pyrus calleryana*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 3, p. 873-880, 2012.
- PÉREZ-HERNÁNDEZ, J.B.; GRAJAL-MARTÍN, M.J. *In vitro* culture of immature zygotic mango embryos and plantlet development. **Hortscience**, v.46, n.1, p.528-1.532, 2011.
- PIO, R. *et al.* Cultivares de pereira em diferentes porta-enxertos de marmeleiros na região sub-tropical. **Revista UDO Agrícola**, v.7, n.1, p.74-78, 2007.
- RADMANN, E.B. *et al.* Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira 'M-9'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.3, 2002.
- REIS, S. *et al.* Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. **Revista Ceres**, Viçosa, v.55, n.3, p.160-167, 2008.
- REIS, L. *et al.* Estratificação *in vitro* de embriões zigóticos de pessegueiro em diferentes meios de cultura e concentrações de sacarose. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.34, n. 3, p.653-660, 2012.
- REZENDE, J.C. *et al.* Influência do meio de cultura e concentração de ágar no crescimento e desenvolvimento de plântulas de café oriundas da embriogênese somática direta. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.9, n.1, p.21-26, 2008.
- RIBEIRO, L.S. *et al.* Desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de *Coffea arabica*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n.1, p.1479-1483, 2003.
- SIMONETTO, P.; GRELLMANN, E. **Pereira: Porta-enxertos e algumas cultivares**. Porto Alegre: IPAGRO, 1988.
- SOARES FILHO, W.S. *et al.* Frequência de híbridos em cruzamentos controlados de citros: cultivo de sementes *versus* cultivo *in vitro* de embriões. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.7, 2002.
- SOARES, J.D.R. *et al.* Germinação de embriões e crescimento inicial *in vitro* de macaúba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.5, p.773-778, 2011.
- TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1990.