

**FERNANDA GRIMALDI**

**SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE *Pyrus communis* L. COM  
POTENCIAL PARA PORTAENXERTO E DESENVOLVIMENTO  
DE PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO**

Tese apresentada ao curso de pós-graduação em Produção Vegetal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Produção Vegetal.

Orientador: Dr. Leo Rufato

**LAGES  
2014**

G861s Grimaldi, Fernanda

Seleção de genótipos de *Pyrus communis* L. com potencial para porta enxerto e desenvolvimento de protocolo de micropropagação / Fernanda Grimaldi. - Lages, 2014.

128 p. : il. ; 21 cm

Orientador: Leo Rufato

Inclui bibliografia.

Tese (doutorado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveteinárias, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2014.

1. Pereira comum. 2. Melhoramento vegetal.

3. Propagação *in vitro*. 4. Reguladores de crescimento.

I. Grimaldi, Fernanda. II. Rufato Leo. III. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal. IV. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Setorial do  
CAV/UDESC

## FERNANDA GRIMALDI

### SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE *Pyrus communis* L. COM POTENCIAL PARA PORTAENXERTO E DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO

Tese apresentada ao curso de pós-graduação em Produção Vegetal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Produção Vegetal.

#### Banca Examinadora

Orientador: \_\_\_\_\_  
Doutor Leo Rufato  
Univeersidade do Estado de Santa Catarina

Co-orientador: \_\_\_\_\_  
Dra. Andrea De Rossi Rufato  
Embrapa Uva e Vinho

#### Membros

\_\_\_\_\_  
Dra. Aike Anneliese Kretzschmar  
Universidade do Estado de  
Santa Catarina

\_\_\_\_\_  
Dr. Leonardo Ferreira Dutra  
Embrapa Clima Temperado

\_\_\_\_\_  
Dra. Joseane de Souza Hipólito  
Universidade do Estado de  
Santa Catarina

\_\_\_\_\_  
Dra. Andrea De Rossi Rufato  
Embrapa Uva e Vinho

Lages, 30/07/2014



*Ao meu esposo e amigo Diego, dedico...*



## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Leo Rufato, pelo aprendizado, pelo incentivo, pelas ideias, por acreditar nos objetivos do trabalho e especialmente pela amizade.

Às minhas co-orientadoras Dra. Andrea De Rossi Rufato e professora Dr<sup>a</sup> Aike Anneliese Kretzschmar.

Ao grupo de trabalho da Fruticultura do CAV/UDESC, pelo aprendizado, pelo auxílio na execução das atividades, pela amizade de todos que serão sempre lembrados com muito carinho.

Aos pesquisadores Aleksander Westphal Muniz (EMBRAPA), Murilo Dalla Costa e Gilberto Luiz Dalagnol (Epagri) que sempre estiveram dispostos a ajudar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos na modalidade sanduíche.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

Em especial, à minha família e esposo, pelo apoio e compreensão durante este período.

Muito Obrigada!

I am pleased to express my deep gratitude to the researcher Chuck Leslie, for his guidance, knowledge and trust. Also to his family who received me with open arms.

I thank all the Walnut Lab members, specially Morgan, Reid, Nassim, Elham, Kali, Albie, Lu, Dio and Nicky, for their help and friendship.

In addition I want to thank all members of the Dandekar Lab, in special Lalani Walawage, for her kindness and friendship.





My sincere appreciation to the Plant Sciences Department, University of California – UC Davis, for granting me the opportunity to work with such amazing people.

Thank you!



## RESUMO

GRIMALDI, Fernanda. **Seleção de genótipos de *Pyrus communis* L. com potencial para portaenxerto e desenvolvimento de protocolo de micropropagação.** Tese (Doutorado em Produção Vegetal). 128 f. Centro de Ciências Agroveterinárias, CAV. Universidade do Estado de Santa Catarina, UDESC, Lages, 2014.

O desenvolvimento de um programa de melhoramento para a cultura da pereira é de grande importância para a expansão da cultura e a criação/seleção de novos portaenxertos com características de interesse é capaz de impulsionar sua produtividade. Diante disto o objetivo principal deste trabalho foi selecionar novos genótipos de portaenxertos originários de seedlings de *Pyrus communis* L. que confirmam menor vigor às plantas, e desenvolver um protocolo de micropropagação para estes genótipos, visando à sustentabilidade da cultura da pereira no sul do Brasil. Os experimentos foram conduzidos no Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV/UDESC). Foram utilizadas para os experimentos plantas da espécie *Pyrus communis* L. com potencial de portaenxerto para a cultura da pereira. O delineamento experimental utilizados foi inteiramente casualizado, as variáveis avaliadas foram: altura de planta, diâmetro do caule, número de gemas, número e comprimento de ramos do ano, número de lenticelas (artigo I) contaminação bacteriana, contaminação fúngica, sobrevivência de explantes (artigo II) número e comprimento de brotos, número de gemas, número de folhas, porcentagem de enraizamento, número e comprimento de raiz, comprimento de parte aérea,



intensidade de calo, sobrevivência de explantes (artigo III) produção de AIA, percentagem de enraizamento, número e comprimento de raiz, comprimento de parte aérea e intensidade de calo (artigo IV). Os genótipos 409, 548, 570 e 577 se mantiveram constantes no grupo de vigor médio e foram selecionados para a micropropagação, a fim de avaliar seu potencial em condições de pomar. No estabelecimento *in vitro* o PPM é um biocida eficaz no controle de contaminações microbianas e em baixas concentrações não afeta a sobrevivência do explante. A assepsia com álcool 70% + hipoclorito de sódio 2,5% + PPM 2 mL L<sup>-1</sup> no meio de cultura é eficaz para explantes oriundos de plantas matrizes acondicionadas em câmara de crescimento e as assepsias PPM 5% e PPM 5% + PPM 2 mL L<sup>-1</sup> no meio de cultura são eficazes para explantes oriundos de plantas do campo. O meio QL modificado acrescido de 3,5 mL L<sup>-1</sup> de BAP apresentou maior multiplicação dos explantes durante o estágio de multiplicação *in vitro*. O meio QL modificado acrescido de AIB na faixa entre 1,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup> apresentou melhor enraizamento *in vitro* durante o estágio de enraizamento. Maior sobrevivência foi verificada na aclimatização em copos transparentes com tampa, contendo a mistura substrato comercial + vermiculita + fibra de coco (2:2:1). Os explantes de *Pyrus communis* L. devem ser aclimatizados 60 dias após o enraizamento *in vitro*, possuindo raízes com até 30 mm. Conclui-se que foi possível selecionar genótipos com características superiores dentro da população de portaenxerto de *Pyrus communis* L., bem como, foi possível desenvolver um protocolo de micropropagação para as seleções.

**Palavras-chave:** Pereira comum, melhoramento vegetal, propagação *in vitro*, reguladores de crescimento.



## ABSTRACT

GRIMALDI, Fernanda. **Genotype selection of *Pyrus communis* L. with rootstock potential and development of a micropropagation protocol.** Thesis (Doctorate in Plant Production). 128 f. Center of Agroveterinaries Sciences. University of Santa Catarina State. Lages, 2014.

The development of a breeding program for the pear culture has great importance to the expansion of the culture and the creation/selection of new rootstocks with traits of interest is able to impulse its productivity. Thus, main objective of this study was to select new genotypes from rootstocks seedlings of *Pyrus communis* L. providing plants of low vigor, and to develop a micropropagation protocol for these genotypes, aiming at sustainability of the pear culture in southern Brazil. The experiments were conducted at the Agroveterinaries Sciences Center at University of Santa Catarina State (CAV / UDESC). Plants used for the experiments were *Pyrus communis* L. with potential as rootstock for pear culture. The experimental design was completely randomized and the variables evaluated were: plant height, trunk diameter, bud number, branches of the year number and height, lenticels number (paper I) bacterial contamination, fungal contamination, explant survival (paper II) shoots number and height, bud number, leaf number, rooting percentage, root number and height, shoot height, callus intensity, explant survival (paper III) IAA production, rooting percentage, root number and height, shoot height and callus intensity (paper IV). Genotypes 409, 548, 570 and 577 remained constant in the group of medium vigor and were selected for





micropropagation, in order to assess its potential in orchard conditions. At the *in vitro* establishment PPM is an effective biocide for controlling microbial contamination and in low concentrations do not affect survival of the explant. The asepsis with alcohol 70% + sodium hypochlorite 2,5% + PPM 2 mL L<sup>-1</sup> in media culture is effective for explants derived from mother plants placed in a growth chamber and the asepsis with PPM 5% and PPM 5 % + PPM 2 mL L<sup>-1</sup> in media culture are effective in explants derived from field mother plants. The QL modified medium plus 3,5 mL L<sup>-1</sup> BAP showed higher multiplication of explants during the stage of *in vitro* multiplication. The QL modified medium with IBA in the range between 1,0 and 1,5 mL<sup>-1</sup> showed better rooting during the rooting stage. The longest survival of explants was observed in the acclimatization using transparent cups with lid, containing the mix commercial substrate + vermiculite + coconut fiber (2:2:1). The explants of *Pyrus communis* L. should be acclimated 60 days after *in vitro* rooting having roots up to 30 mm. It was concluded that it was possible to select genotypes with superior characteristics within the population of *Pyrus communis* L. rootstocks, and it was possible to develop a micropropagation protocol for selections.

**Key-words:** Common pear, plant breeding, *in vitro* propagation, growth regulators.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Dendrograma de similaridade fenotípica entre 34 genótipos de uma população de <i>Pyrus communis</i> L., obtido por um conjunto de caracteres morfológicos avaliados no ano de 2011. ....	68
Figura 2. Dendrograma de similaridade fenotípica entre 32 genótipos de uma população de <i>Pyrus communis</i> L., obtido por um conjunto de caracteres morfológicos avaliados no ano de 2012. ....	69
Figura 3. Dendrograma de similaridade fenotípica entre 31 genótipos de uma população de <i>Pyrus communis</i> L., obtido por um conjunto de caracteres morfológicos avaliados no ano de 2013. ....	70
Figura 4. Esquema dos protocolos para melhoramento e seleção de portaenxertos de macieira do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, organizado por estágios e seus tempos de avaliação, de acordo com cada objetivo do programa. ....	71
Figura 5. Características de interesse avaliadas pelo Programa de Melhoramento de Portaenxertos de Macieira, com os respectivos anos e locais de avaliação. ....	72
Figura 6. Número de brotos por explante de <i>P. communis</i> em função da concentração de BAP no meio de cultura, em 2011 e 2013.....	103
Figura 7. Explantes de portaenxerto de <i>P. communis</i> cultivados com diferentes concentrações de BAP.....	104
Figura 8. Percentagem de enraizamento para explantes de <i>P. communis</i> em função da concentração de AIB no meio de cultura, nos anos de avaliação 2012 e 2013..	106
Figura 9. Número de raiz por explante de <i>P. communis</i> em função da concentração de AIB no meio de cultura, nos anos de avaliação 2012 e 2013. ....	107



Figura 10. Comprimento de parte aérea de explantes de <i>P. communis</i> em função da concentração de AIB no meio de cultura, nos anos de avaliação 2012 e 2013. ....	108
Figura 11. Intensidade de calo em explantes de <i>P. communis</i> em função da concentração de AIB no meio de cultura, nos anos de avaliação 2012 e 2013. ....	109
Figura 12. Curva padrão para definir a concentração de AIA produzido pelos isolados de <i>Adesmia latifolia</i> , de acordo com absorvância obtida através de espectrofotômetro.....	119
Figura 13. Número de raízes por explante de <i>Pyrus communis</i> L. em função da concentração de AIA no meio de cultura, na condição autoclavado. ....	120
Figura 14. Percentual de enraizamento de explantes de <i>Pyrus communis</i> L. em função da concentração de AIA no meio de cultura, na condição autoclavado.....	121
Figura 15. Raízes adventícias formadas em explantes de <i>Pyrus communis</i> L. induzidas por 1 mg L <sup>-1</sup> de AIA comercial (A) e AIA produzido pelos isolados EEL0511 (B) e EEL6438 (C). ....	121
Figura 16. Explantes do portaenxerto 'OHxF87' cultivado em meio DKW e QL modificado (Leblay, 1991) com as fontes de ferro quelato FeEDTA e FeEDDHA. ....	128



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Agrupamento de genótipos de uma população de <i>Pyrus communis</i> L., realizados através de similaridade fenotípica, obtida por um conjunto de caracteres morfológicos avaliados em 2011, 2012 e 2013. Os genótipos realçados se encontram no mesmo grupo de vigor por dois anos de avaliação. ....	73
Tabela 2. Contaminação bacteriana de explantes de <i>P. communis</i> oriundos do campo e de câmara de crescimento, após 21 dias do estabelecimento <i>in vitro</i> . ....	83
Tabela 3. Contaminação fúngica de explantes de <i>P. communis</i> tratados com diferentes asspesias, após 21 dias do estabelecimento <i>in vitro</i> . ....	83
Tabela 4. Contaminação fúngica de explantes de <i>P. communis</i> oriundos do campo e de câmara de crescimento, após 21 dias do estabelecimento <i>in vitro</i> . ....	84
Tabela 5. Sobrevivência de explantes de <i>P. communis</i> oriundos do campo e de câmara de crescimento, após 21 dias do estabelecimento <i>in vitro</i> . ....	84
Tabela 6. Efeito do meio de cultura no número de brotos, número de gemas e número de folhas por explante de <i>P. communis</i> , nos anos de avaliação 2011 e 2013. ....	102
Tabela 7. Comprimento de brotos de explantes de <i>P. communis</i> em relação às concentrações de BAP nos meios de cultura QL modificado, MS e WPM, para o ano de 2011. ....	102
Tabela 8. Percentagem de sobrevivência de explantes de <i>P. communis</i> aos 15 e 40 dias após transferência do meio <i>in vitro</i> para o meio <i>ex vitro</i> , em função dos fatores embalagem para aclimatização e composição do substrato. ....	104
Tabela 9. Percentagem de sobrevivência de explantes de <i>P. communis</i> aos 15 e 40 dias após transferência do meio <i>in vitro</i> para o meio <i>ex vitro</i> , em função dos fatores data de enraizamento e tamanho de raiz. ....	105





Tabela 10. Quantidade de AIA produzido por nove isolados de <i>Adesmia latifolia</i> e um controle, estimada através da curva padrão estabelecida por concentrações conhecidas de AIA.....	119
Tabela 11. Comprimento de raiz em explantes de <i>Pyrus communis</i> L. em função da fonte de AIA no meio de cultura, na condição autoclavado. ....	120
Tabela 12. Intensidade de calo em explantes de <i>Pyrus communis</i> L. em função da fonte e da concentração de AIA no meio de cultura. ....	120
Tabela 13. Comprimento e número médio de folhas por explante do portaenxerto 'OHxF87' em função do meio de cultura utilizado.....	128



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>33</b>
1.1. OBJETIVO GERAL.....	35
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>36</b>
2.1. CLASSIFICAÇÃO E DESCRIÇÃO DA PEREIRA..	36
2.2. SITUAÇÃO DA PEREIRA NO BRASIL.....	37
2.3. MELHORAMENTO VEGETAL DE PORTAENXERTOS.....	42
2.4. MICROPROPAGAÇÃO OU PROPAGAÇÃO <i>in vitro</i> .....	45
<b>2.4.1. Estabelecimento <i>in vitro</i> .....</b>	<b>46</b>
<b>2.4.2. Multiplicação <i>in vitro</i> .....</b>	<b>48</b>
<b>2.4.3. Enraizamento .....</b>	<b>49</b>
<b>2.4.4. Aclimatização .....</b>	<b>51</b>
2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52
<b>3. ARTIGO I – SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE <i>PYRUS COMMUNIS</i> L. COM POTENCIAL PARA PORTAENXERTO.....</b>	<b>61</b>
3.1. INTRODUÇÃO .....	61
3.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	63
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	64
3.4. CONCLUSÕES .....	66
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66
3.6. ANEXOS.....	68
<b>4. ARTIGO II – CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DURANTE O ESTABELECIMENTO DE EXPLANTES DE <i>PYRUS COMMUNIS</i> L. UTILIZANDO PLANT PRESERVATIVE MIXTURE™ .....</b>	<b>74</b>
4.1. INTRODUÇÃO .....	74
4.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	75
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	77
4.4. CONCLUSÕES .....	80
4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	80



4.6. ANEXOS.....	83
<b>5. ARTIGO III – PROTOCOLO DE MULTIPLICAÇÃO E ENRAIZAMENTO <i>IN VITRO</i> PARA EXPLANTES DE <i>PYRUS COMMUNIS</i> L. COM POTENCIAL PARA PORTAENXERTO, COMPREENDENDO A ETAPA DE ACLIMATIZAÇÃO.....</b>	<b>85</b>
5.1. INTRODUÇÃO .....	85
5.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	87
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	90
<b>5.3.1 Multiplicação <i>in vitro</i>.....</b>	<b>90</b>
<b>5.3.2 Enraizamento <i>in vitro</i>.....</b>	<b>93</b>
<b>5.3.3 Aclimatização.....</b>	<b>95</b>
5.4. CONCLUSÕES .....	96
5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	97
5.6. ANEXOS.....	102
<b>6. ARTIGO IV – ENRAIZAMENTO <i>IN VITRO</i> DE PORTAENXERTO DE <i>PYRUS COMMUNIS</i> L. UTILIZANDO ÁCIDO INDOLACÉTICO PRODUZIDO POR RIZÓBIOS DE <i>Adesmia latifolia</i>.....</b>	<b>110</b>
6.1. INTRODUÇÃO .....	110
6.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	111
6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	113
6.4. CONCLUSÕES .....	115
6.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	116
6.6. ANEXOS.....	119
<b>7. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NA UNIVERSIDADE DA CALIFÓRNIA – DAVIS.....</b>	<b>122</b>
7.1. CRONOGRAMA DAS ATIVIDADES EM UCDAVIS.....	122
7.2. ARTIGO DESENVOLVIDO NA UCDAVIS: UTILIZAÇÃO DE FeEDDHA NA ELONGAÇÃO DE EXPLANTES DO PORTAENXERTO OLD HOME X FARMINGDALE 87 (OHXF87).....	123
<b>7.2.1. Introdução .....</b>	<b>123</b>
<b>7.2.2. Material e Métodos .....</b>	<b>124</b>



<b>7.2.3.Resultados e discussão .....</b>	<b>125</b>
<b>7.2.4.Conclusões .....</b>	<b>126</b>
<b>7.2.5.Referências bibliográficas .....</b>	<b>126</b>
<b>7.2.6.Anexos.....</b>	<b>128</b>





## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A fruticultura brasileira é reconhecida mundialmente como uma das mais diversificadas. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de frutas, entretanto possui uma pequena participação no mercado internacional. Em 2008 houve aumento na exportação de frutas como a maçã, ameixa, laranja e morango, porém, a quantidade destas frutas exportadas ao longo de 2009 a 2012 não se manteve constante. Já a pera teve pequena participação no mercado de exportação apenas no ano de 2012, não havendo registros de exportação desta fruta em anos anteriores (ALICE WEB, 2012).

O cultivo da pereira no Brasil não é expressivo e segundo o IBGE, a produção nacional em 2012 foi de 21.990 toneladas, sendo a área de cultivo representada por 1.688 hectares. Apesar do cultivo da pereira ser praticado em poucas áreas do Brasil, o consumo desta fruta apresentou considerável expansão e a produção nacional de peras não é capaz de atender a demanda interna do produto. Em 2012 o Brasil importou pouco mais de 216 mil toneladas de peras frescas (ALICE WEB, 2012). Atualmente o cultivo da pereira tem maior intensidade no sul e sudeste do país, com destaque para os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, que representam 86,9% da produção nacional (IBGE, 2012). Nestes estados são cultivadas pereiras europeias de maior qualidade como Williams, Abate Fetel, Packham's Triumph, Rocha e Santa Maria, porém ainda não há um manejo adequado destas cultivares visando o aumento da produtividade (MACHADO et al., 2012).

A produtividade da pereira pode ser substancialmente aumentada com corretas técnicas de manejo. O manejo de água adequado aumenta a eficiência nutricional em pereiras, sendo crucial nas

fases de florescimento e maturação de frutos, resultando em maior tamanho de frutos e produtividade. O correto uso da poda regulariza a produção e melhora a qualidade de frutos; eficientes práticas de manejo de solo e, principalmente, a introdução de cultivares e portaenxertos adaptados às condições edafoclimáticas de determinada região, podem aumentar a produção de pereiras em até três vezes a produtividade média (SHARMA et al., 2010).

A demanda desta fruta no Brasil tem somente crescido e para alcançar esse ritmo de crescimento existe necessidade de integrar a biotecnologia à cultura da pereira. Com o desenvolvimento e aplicação de ferramentas biotecnológicas, programas de melhoramento de pereiras podem ser acelerados e intensificados. Ferramentas como micropropagação, mutações somaclonais, hibridização somática, conservação e caracterização de germoplasma e transformação genética possuem enorme potencial para incrementar a produtividade desta importante cultura, e são imprescindíveis no melhoramento de plantas que visa selecionar novos genótipos com características culturais como tamanho de planta, compatibilidade, precocidade e qualidade de fruto (SHARMA et al., 2010). No Brasil, a busca por novos genótipos de pereira que apresentem boa compatibilidade de enxertia e adaptação às condições edafoclimáticas do sul do país tem sido intensificada, e o uso de ferramentas biotecnológicas no melhoramento genético é importante para obtenção de novos portaenxertos para a cultura da pereira (RUFATO et al., 2011).

## 1.1.OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi selecionar novos genótipos de portaenxertos originários de seedlings de *Pyrus communis* L. que confirmam menor vigor às plantas, e desenvolver um protocolo de micropropagação para estes genótipos, visando à sustentabilidade da cultura da pereira no Sul do Brasil.

## 1.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar seleção de seedlings de *Pyrus communis* L. que possuam potencial para portaenxerto, por meio de avaliações durante o período de repouso vegetativo;
- Obter um protocolo de micropropagação de seleções de *Pyrus communis* L. para acelerar o processo de avaliação e validação das mesmas;
- Determinar o explante mais apropriado e a metodologia mais adequada para o controle da contaminação microbiana de explantes no estabelecimento *in vitro* de seleções de *Pyrus communis* L.;
- Determinar o melhor meio de cultura e testar o efeito de diferentes concentrações da citocinina 6-benzilaminopurina para a multiplicação *in vitro* de seleções de *Pyrus communis* L.;
- Testar o efeito de diferentes auxinas e concentrações no enraizamento *in vitro* de seleções de *Pyrus communis* L.;
- Avaliar diferentes embalagens e substratos para a aclimatização de seleções de *Pyrus communis* L.;
- Avaliar características de explantes para a aclimatização de seleções de *Pyrus communis* L.;
-

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. CLASSIFICAÇÃO E DESCRIÇÃO DA PEREIRA

A pereira é pertencente à família *Rosaceae*, subfamília *Pomoideae* e gênero *Pyrus*. Existem mais de 20 espécies de pereira, nativas do continente Europeu e Asiático. As espécies comercialmente importantes são: *Pyrus communis*, *P. pyrifolia*, *P. bretschneideri*, *P. betulaefolia* e híbridos entre *P. communis* e *P. pyrifolia*. A pereira mais cultivada no Brasil é a pereira europeia (*Pyrus communis*).

As espécies de *Pyrus* são autoestéreis, inférteis e diplóides, com exceção da *P. communis* que possui algumas cultivares poliploides. As plantas de pereiras podem ser árvores ou arbustos, possuem copa em formato piramidal, com folhas geralmente caducifólias. Possuem troncos altos e grossos, de diâmetro e cor variável de acordo com a cultivar, e sua raiz é profunda e pivotante. São plantas de tecido lenhoso fino e pesado. Apresentam gemas mistas, folhas largas e cerradas. O desenvolvimento floral ocorre no verão e no outono, suas flores originadas são hermafroditas. A frutificação da pereira europeia ocorre em cerca de três ou mais anos. No caso das asiáticas, a frutificação pode ocorrer em apenas um ano. A fruta da pereira é um pomo, de formato arredondado ou piriforme, de textura carnuda, suculenta e doce (MUNIZ, 2012).

Para o cultivo de pereira o ideal é clima seco, frio durante o inverno e quente durante o verão. As cultivares europeias precisam de no mínimo 700 horas de frio hibernal para atingirem boa superação de dormência, enquanto as peras asiáticas e híbridas requerem cerca de 300 a 800 horas de frio. Não somente é imperativa a presença de baixas temperaturas, mas também a

regularidade com que estas ocorrem, pois quando as exigências em frio da pereira não são satisfeitas ocorre uma série de anormalidades na brotação e floração, reduzindo o potencial produtivo e a longevidade do pomar (BRIGHENTI, 2012). Em termos mundiais, as principais cultivares de peras europeias são: Packham's Triumph, Williams e Red Bartlett. As principais cultivares de peras asiáticas são: Hosui, Kosui e Nijisseiki. Algumas cultivares híbridas muito consumidas são: Carrick, Garber, Smith, Primorosa e Seleta.

As principais doenças da pereira que atingem os pomares brasileiros são a entomosporiose, podridão negra, sarna da pereira e necrose de gemas. A pereira pode se apresentar como hospedeira para alguns vírus como o "Apple Chlorotic Leaf Spot Virus" (ACLSV), "Pear Stony Pit Virus" e "Pear Vein Yellow Virus". O vírus ACLSV é encontrado em diversas cultivares de *Pyrus*, *Prunus* e *Malus*, porém, os outros vírus supracitados não possuem relatos de incidência no Brasil (BOGO et. al, 2012). Os patógenos comprometem o vigor e longevidade das pereiras, permitindo que a cultura fique suscetível a outros patógenos, aumentando o custo de produção e reduzindo a qualidade das frutas.

## 2.2. SITUAÇÃO DA PEREIRA NO BRASIL

O cultivo da pereira no Brasil não possui destaque e a pera é entre as frutas de clima temperado, a que possui a menor expressão em termos de área cultivada, produção e valor da produção (FIORAVANÇO, 2007). Segundo o IBGE, a produção nacional em 2012 foi de 21.990 toneladas, sendo a área de cultivo representada por 1.688 hectares. Apesar do cultivo da pereira ser praticado em poucas áreas do Brasil, o consumo desta fruta apresentou um aumento

considerável e a produção nacional de peras não é capaz de atender a demanda interna do produto. Em 2012 o Brasil importou cerca de 216 mil toneladas de peras frescas (ALICE WEB, 2012).

A cultura da pereira apresenta grande potencial de expansão, principalmente no Sul do Brasil, onde existem condições de clima e solo favoráveis ao cultivo. Além disso, a expansão da cultura pode ser também favorecida pela estrutura de armazenagem, conservação e classificação já existentes, devido à possibilidade de aproveitamento das câmaras frias utilizadas para a cultura da macieira, uma vez que a comercialização das peras, colhidas no Brasil, ocorre entre os meses de janeiro e abril (FAORO; NAKASU, 2001). A região sul do Brasil é reconhecida internacionalmente como uma área com característica única e privilegiada no país para o cultivo de fruteiras de clima temperado, entre as quais se destacam a macieira, videira, pessegueiro, ameixeira, pereira, e caquizeiro. As culturas geram empregos diretos e indiretos, por meio das grandes empresas, e em pequenas propriedades garantem a subsistência com certo grau de satisfação dos produtores.

Em todos os países tradicionalmente produtores de maçãs, a produção de peras vem complementar a atividade dos produtores. No Brasil, apesar da produção de cerca de 900 mil toneladas por ano de maçãs, as peras de origem nacional representam somente 1,75% da comercialização desta fruta em nível nacional. Isso acontece, pois as cultivares utilizadas não se adaptaram satisfatoriamente às condições climáticas da região. O cultivo em escala comercial de peras de alta qualidade continua ainda incipiente. Os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina são os estados brasileiros que apresentam as melhores condições climáticas para a cultura da pereira, tanto europeia quanto asiática. Porém,

não se observa grande desenvolvimento da cultura evidenciando que existem problemas a serem resolvidos para possibilitar a viabilização da cultura no Sul do país (MUNIZ et al., 2012)

A cultura da pereira não tem conseguido se expandir devido a dois problemas limitantes para o seu cultivo, que são a falta de cultivares de qualidade adaptados às condições climáticas das regiões potencialmente produtoras e a indefinição ou mesmo inexistência de portaenxertos compatíveis com as cultivares copa. Tais problemas comprometem a produção e a longevidade das pereiras, permitindo que a cultura fique suscetível a patógenos, dificultando o manejo e conseqüentemente aumentando o custo de produção (OLIVEIRA et al., 2004; BECKER, 2004). Além da indefinição de copas e portaenxertos, existe uma carência de técnicas que possibilitem a obtenção deste material rapidamente, mantendo as características agrônômicas desejáveis aos fruticultores.

Atualmente, o custo de produção da pereira no Brasil é alto, devido à baixa produtividade e má qualidade dos frutos. Em média, no sistema atual de produção, uma pereira europeia leva de três a sete anos para entrar em produção. Os primeiros pomares de pereira no Brasil foram implantados com portaenxertos de *Pyrus calleriana*, *Pyrus betulaefolia*, *Pyrus communis* e híbridos, contudo, estes portaenxertos conferiram vigor excessivo para as plantas, dificultando o manejo do pomar. A utilização de portaenxertos menos vigorosos, como o marmeleiro, pode reduzir em até 30% o tempo para a pereira entrar em produção. Na Europa se observa uma progressiva intensificação dos novos pomares ligada ao emprego de genótipos de marmeleiros caracterizados por conferirem menor vigor à copa (MUSACCHI, 2007). Diante disto, iniciou-se a

adoção de marmeleiros no Brasil na tentativa de amenizar o problema de vigor excessivo. No entanto, tem-se observado que os portaenxertos de marmeleiros causam prejuízos na atividade vegeto-produtiva das pereiras quando empregados em terrenos menos vocacionados (MACHADO et al., 2012).

Dentre os marmeleiros usados na cultura da pereira, pode-se citar o marmeleiro BA 29 que é de fácil propagação por estacas lenhosas ou amontoa de cepa, apresenta um aparato radicular bem desenvolvido, proporcionando um bom suporte às plantas. O marmeleiro C, apresenta resistência ao pulgão lanígero e nematoides, possui boa capacidade de enraizamento, e controla bem o vigor da copa, sendo recomendado para plantios em alta densidade. O marmeleiro Adams apresenta grande facilidade de propagação, com sistema radicular fasciculado e superficial, exigindo terrenos frescos e férteis. Controla o vigor da copa, induz precocidade de frutificação e elevada produtividade. O marmeleiro Sydo controla o vigor da copa, induz precocidade e apresenta elevada produtividade, sendo recomendado para emprego em plantios em alta densidade. Possui fácil propagação por mergulhia de cepa (SANSVINI, 2007). O problema dos marmeleiros é que eles apresentam graus variáveis de incompatibilidade entre copa e portaenxerto com importantes cultivares como William's, Kaiser, Abate Fetel, Conference, Packham's Triumph, Cascatense (LUZ et al., 2012).

Apesar da adoção do marmeleiro ter determinado uma expansão da cultura da pereira, permitindo o emprego de densidade de plantio mais elevada, o seu emprego em terrenos menos vocacionados prejudica a atividade vegetativa e produtiva das plantas e a incompatibilidade com



importantes cultivares de pereira limita seu uso. Deste modo, a alternativa aos marmeleiros é a utilização de portaenxertos oriundos de *Pyrus sp.*, porém, como estes portaenxertos induzem elevado vigor e, comparativamente aos marmeleiros, aumentam o período de juvenilidade, faz-se imperativo desenvolver programas de melhoramento genético que tenham como metas a redução do porte da planta, frutificação precoce e facilidade de propagação (BREWER; PALMER, 2011).

A utilização de portaenxertos oriundos do gênero *Pyrus* é vantajosa, visto que, eles apresentam afinidade de enxertia, são resistentes a temperaturas extremamente baixas, são adaptáveis à maioria dos tipos de solo e em relação às doenças, a maioria apresenta alguma tolerância e/ou resistência (MACHADO et al., 2012). Os portaenxertos de *Pyrus betulaefolia* são resistentes ao fogo bacteriano, declínio da pereira e *psylla*. Os portaenxertos de *Pyrus calleriana* são tolerantes ao declínio da pereira e moderadamente resistentes ao fogo bacteriano. Os portaenxertos de *Pyrus communis* apresentam resistência ao fogo bacteriano, tolerância ao declínio da pereira e *psylla*, e principalmente apresentam diferentes classes de vigor, podendo conferir precocidade e alta produtividade (REIL et al., 2007).

A partir da seleção massal de plantas, já foram obtidos portaenxertos com características positivas de resistência a doenças e a condições adversas, oriundas de *Pyrus* capazes de controlar o vigor. É o caso da série Old Home x Farmingdale (Estados Unidos), série Fox (Itália), Pyriam e série Brossier (França), Pyrodwarf e Pyro 2-33 (Alemanha) e 708-36 (Inglaterra). A obtenção destes materiais mostra como é imperativo trabalhar no melhoramento de portaenxertos para a cultura da pereira e como é possível obter materiais com características

positivas de interesse adaptados para as regiões produtoras do Brasil.

### 2.3.MELHORAMENTO VEGETAL DE PORTAENXERTOS

O melhoramento vegetal de espécies frutíferas vem de muitos séculos atrás, onde antigos horticultores na tentativa de unir duas plantas desenvolveram o processo de enxertia. Inicialmente eram utilizados portaenxertos oriundos de sementes, mas com o tempo foi necessário propagar genótipos selecionados, levando ao emprego da propagação assexuada em diversas espécies. A espécie considerada precursora dos estudos que envolvem melhoramento de portaenxertos é o portaenxerto de cereja 'Mazzard'. Outras culturas inicialmente aperfeiçoadas em termos de portaenxertos foram determinadas em função do aparecimento das doenças *Phytophthora sp.* e *Phylloxera* que afetaram pomares de citros e videira, respectivamente, forçando o desenvolvimento de estudos de resistência a doenças para estas culturas (JUNIOR et al.,2008). Em termos mundiais, nos últimos 50 anos a espécie frutífera que recebeu maior atenção no melhoramento de portaenxertos foi a macieira, visando obtenção de portaenxertos menos vigorosos e resistente a doenças, culminando no desenvolvimento das séries 'M' e 'MM' (East Maling – Inglaterra), as séries 'P' (Polônia), 'MAC' (Estados Unidos), 'O' (Canadá), 'B' (Rússia), 'AR' (Inglaterra), 'JM' (Japão) e 'CG' (Estados Unidos) (DENARDI, 1986).

Os programas de melhoramento para a cultura da pereira na América do Norte e na Europa deram ênfase especialmente à procura de genótipos resistentes ao fogo bacteriano e *Psylla*. A sarna da pereira que afeta

tanto cultivares europeias como asiáticas também é uma preocupação nos programas de melhoramento do mundo todo, assim como a busca por cultivares que tenham qualidade de fruto e aparência atrativa. Na Nova Zelândia há programas que desenvolvem hibridações entre cultivares europeias e asiáticas na busca de novas cultivares que combinem qualidade de fruto, pouca exigência em frio e resistência a doenças. Porém, a cultura da pereira ainda está muito atrás da cultura da macieira em relação a disponibilidade de uma ampla gama de portaenxertos que controlam vigor, são fáceis de propagar e possuem ampla compatibilidade com as cultivares. A Europa continua a utilizar portaenxertos de marmeleiro para pomares em alta densidade e nas áreas em que a adoção do marmeleiro não é adequada a falta de portaenxertos de *Pyrus* acaba limitando a cultura (BREWER; PALMER, 2011). Os Estados Unidos possui um programa de melhoramento para portaenxerto de pereiras que testa extensivamente portaenxertos nacionais e provenientes de outros países, e de acordo com os Reil et al, (2007) apenas algumas seleções se mostrarão boas e ainda assim irão se adaptar apenas a um pequeno sítio local, sendo ainda de grande dificuldade encontrar portaenxertos que se mostrem adaptados a múltiplas condições edafoclimáticas.

No Brasil, destacam-se os programas de melhoramento do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e da EMBRAPA, envolvendo a avaliação e obtenção de portaenxertos para as culturas de citros, videira, pessegueiro e mangueira. A Epagri-SC foi a primeira empresa a trabalhar com melhoramento de portaenxertos de macieira, testando na região sul, cerca de 100 seleções de portaenxertos provenientes de outros países. Os programas de melhoramento da Epagri-SC visam a obtenção de portaenxertos de porte anão/semi-

anão, com facilidade de propagação, resistência a doenças e adaptabilidade as condições edafoclimáticas da região sul (DENARDI et al., 2006). Na região sul o projeto MelhorPera, um esforço conjunto entre pesquisadores da EMBRAPA, Epagri, e Universidades Federais e Estaduais da região, visa superar a deficiência de cultivares adaptadas às condições de cultivo da região sul do Brasil, capazes de produzir em quantidade e qualidade suficientes e com regularidade (OLIVEIRA, 2014). No entanto, o programa de melhoramento de portaenxertos para a cultura da pereira ainda é inicial, sendo de grande importância para a expansão da cultura a criação/seleção de novos portaenxertos com características de interesse capazes de reverter a situação de importador do Brasil (OLIVEIRA et al., 2011).

Por esse motivo a prioridade do presente trabalho é reunir conhecimento tecnológico/científico para a seleção e obtenção de genótipos de portaenxertos de *Pyrus communis* L. que controlem vigor de planta, sejam compatíveis com as cultivares europeias de interesse e sejam adaptados às condições edafoclimáticas da região sul do Brasil. A obtenção de novos genótipos de portaenxertos é imprescindível para a cultura da pereira na região Sul, pois no momento não há disponibilidade de material adaptado à região, que possa elevar o potencial produtivo das cultivares de interesse aos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Para a obtenção destes novos genótipos de *Pyrus communis* L. está sendo realizada a técnica de melhoramento vegetal que visa seleção seguida de propagação vegetativa, o que segundo Junior et al. (2008), é uma maneira eficiente no melhoramento de portaenxertos. A seleção consiste em identificar, por meio de características fenotípicas desejáveis, genótipos superiores dentro de

uma população. Estes genótipos precisam ser facilmente propagados de maneira vegetativa, possibilitando sua avaliação em ensaios com repetições e delineamento experimental, de modo a reduzir o efeito da interação genótipo x ambiente. Como a pereira se propaga vegetativamente por estaquia ou mergulhia, a obtenção de várias repetições de um genótipo pode ser demorada, atrasando ou até mesmo inviabilizando a avaliação. Deste modo, a micropropagação pode ser utilizada com a finalidade de produzir uma grande quantidade de mudas de um mesmo genótipo, considerando que esta técnica permite a rápida multiplicação de mudas a partir de pequenas estruturas da planta. A micropropagação ou micropropagação se faz uma ferramenta muito importante nos programas de melhoramento de portaenxerto, acelerando a avaliação e validação das plantas selecionadas.

#### 2.4. MICROPROPAGAÇÃO OU PROPAGAÇÃO *in vitro*

A micropropagação permite o controle das variáveis responsáveis pelo desenvolvimento da planta. Ela vem sendo utilizada desde 1902, quando se iniciou a cultura de células em soluções nutritivas (TORRES et al., 1998), porém o método foi introduzido com sucesso somente nos anos 30, e vem progredindo até hoje (BHATIA et al., 2004). Esta técnica consiste na regeneração e multiplicação de mudas a partir de uma célula ou de segmentos sadios de tecidos da planta, cultivados em meio nutritivo. O método permite a produção massal de mudas, independente da época do ano e com ótimas condições sanitárias. Mas também apresenta algumas desvantagens como variação

somaclonal e perda de caracteres devido à intensa multiplicação (SCHUCH; ERIG, 2005).

Para frutíferas a micropropagação tem sido utilizada com sucesso técnico e econômico, pela sua rapidez e eficiência de produção (ERIG; SCHUCH, 2005). As frutíferas herbáceas não apresentam muitas dificuldades durante a micropropagação, porém as lenhosas têm menor adaptabilidade à cultura de tecidos e algumas espécies são propagadas com sucesso (ROUT et al., 1999). Para a cultura da pereira se observam algumas limitações no processo de micropropagação devido à recalcitrância na fase de multiplicação, dificuldade na indução do enraizamento e ao lento crescimento das plantas durante a aclimatização (GRIMALDI et al., 2012).

A micropropagação se divide em quatro estádios de desenvolvimento: seleção e estabelecimento *in vitro* dos explantes; multiplicação *in vitro* dos explantes; enraizamento e subseqüente transplantio das mudas obtidas para condição *ex vitro*. Cada estádio será brevemente descrito a seguir.

#### **2.4.1. Estabelecimento *in vitro***

No estabelecimento de uma cultura *in vitro*, a escolha do explante apropriado e o nível de diferenciação do tecido são os aspectos mais importantes a considerar (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Os explantes podem ser gemas axilares, ápices caulinares e radiculares, segmentos nodais, meristemas e tecidos diferenciados (FACHINELLO; BIANCHI, 2005).

Para a obtenção dos explantes é necessária uma planta matriz sadia, pois seu estado fisiológico influencia no comportamento posterior da cultura. Uma planta matriz que apresenta estresse hídrico tem os estádios da

micropropagação afetados, pois a falta de água compromete os níveis endógenos de hormônios, alterando sua síntese e transporte (ASSIS; TEIXEIRA, 1998). Outro aspecto importante é a fitossanidade da planta matriz, pois ela determina a dificuldade de desinfestação dos explantes. Considerando que muitos contaminantes de natureza endógena não são expostos às substâncias desinfestantes, deve-se ter controle fitossanitário ainda na planta matriz (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Além dos pré-tratamentos dados à planta matriz, ao estabelecer *in vitro* os explantes é indispensável aplicar substâncias para controlar a contaminação exógena. As substâncias desinfestantes mais usadas para controlar a contaminação dos explantes são o etanol, hipoclorito de sódio e de cálcio, peróxido de hidrogênio e em casos mais extremos, o cloreto de mercúrio (DONINI et al., 2005). Após a desinfestação dos explantes, eles são introduzidos em meio de cultura, sob condições adequadas de temperatura e luminosidade, para que ocorra o seu desenvolvimento. O processo de estabelecimento *in vitro*, assim como os estádios subsequentes, é realizado em câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas.

A temperatura ideal para propagação de espécies frutíferas varia entre 21°C e 25°C, e a luminosidade neste estádio é reduzida nos primeiros dias de incubação a fim de evitar a oxidação fenólica dos explantes (CALVETE et al., 2002; LANE et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2004).

Os meios de cultura fornecem às plantas substâncias para seu crescimento e desenvolvimento. São suplementados com compostos orgânicos e minerais para suprir as necessidades energética, metabólica e estrutural das células da planta. Os

componentes do meio são água, macro e micronutrientes, carboidratos, vitaminas, inositol, fitorreguladores e ágar - para meio geleificado (CALDAS et al., 1998). Existem diversas formulações de meios de cultura, que são utilizados de acordo com a espécie que se deseja propagar, como exemplos o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), meio QL (QUOIRIN; LEPOIVRE, 1977), meio WPM (LLOYD; McCOWN, 1980). Os meios mais empregados em trabalhos com pereiras é o QL e o MS (DANTAS et al., 2002).

#### **2.4.2. Multiplicação *in vitro***

Quando estabelecida a cultura *in vitro* se dá início a multiplicação. Neste estágio os explantes são cultivados a fim de aumentar seu número (FACHINELLO; BIANCHI, 2005). As partes aéreas, produzidas na multiplicação devem apresentar homogeneidade e estabilização entre cultivos. A estabilização dos explantes determina o sucesso de enraizamento dos explantes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Os subcultivos podem ser feitos até se obter o número de explantes necessários, porém o número deve ser o menor possível para não acarretar em variações somaclonais. Os explantes que resultam em cópias mais uniformes são os oriundos de meristemas, gemas apicais e axilares (DANTAS et al., 2002). A temperatura ideal para a multiplicação dos explantes está na mesma faixa que a do estabelecimento, a luminosidade não tem necessidade de ser reduzida, onde o fotoperíodo é de 16 horas. A principal limitação encontrada neste estágio é a vitrificação dos explantes.

A formulação básica do meio de cultura deste estágio pode ser a mesma do estágio de estabelecimento *in vitro*. As variações mais frequentes



são feitas na concentração de macronutrientes, principalmente em relação ao nitrogênio. A redução deste nutriente aumenta a taxa de multiplicação e previne a vitrificação dos explantes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Os carboidratos, micronutrientes e vitaminas podem ser adicionados ao meio de multiplicação na mesma quantidade do meio de estabelecimento.

A principal diferença entre estes meios está na adição de citocininas, o principal grupo de fitorreguladores responsável pela multiplicação vegetal. As citocininas promovem a divisão e alongamento celular, auxiliam na superação de dormência apical e induzem a proliferação de gemas axilares, assim formando novas brotações (TAIZ; ZEIGER, 1991). O tipo e a concentração da citocinina são determinantes para este estágio. A citocinina amplamente utilizada é o BAP, porém existem outras como a Cinetina e o TDZ que também apresentam bons resultados em trabalhos de multiplicação (FRÁGUAS et al., 2004). As concentrações de citocinina podem variar de 0,1 a 5,0 mg L<sup>-1</sup>, e o acúmulo destas pode acarretar em formação de calo e vitrificação dos explantes.

### **2.4.3. Enraizamento**

O sucesso do enraizamento dos explantes é pré-requisito para qualquer protocolo de micropropagação, pois é importante para o estabelecimento da muda no solo (PATI et al., 2006). A resposta ao enraizamento também depende de fatores endógenos e exógenos, que vêm sendo estudados ao longo dos anos, principalmente para promover a formação de raízes em espécies lenhosas. Estes fatores quando empregados separadamente ou combinados mostraram efeitos

significativos no enraizamento de algumas espécies (COUVILLON, 1988).

A luminosidade é um fator exógeno que interfere nas fases de indução e iniciação do enraizamento. Durante estas fases faz-se necessário que as partes aéreas sejam mantidas em condições de pouca ou nenhuma luminosidade, pois a presença de luz diminui os níveis endógenos de auxina, inibindo o processo de formação de raízes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Assim como nos estádios anteriores, a temperatura ideal de incubação varia entre 21°C e 27°C. Espécies de *Prunus domestica*, *Mallus sp* e *Pyrus sp* enraizaram sob temperatura de 25°C (ERIG et al., 2004; ROCHA et al., 2007; SOUZA et al., 2007). Já para cultivares de Rosa híbrida foi observado uma melhor resposta de enraizamento a 21°C (PATI et al., 2006). De acordo com Grattapaglia; Machado (1998), temperaturas acima de 30°C não são favoráveis para as plantas e provocam a evaporação de água do meio, o deixando mais concentrado podendo causar toxidez.

Durante a rizogênese o meio de enraizamento tem seus sais diluídos cerca de 50 a 75% em relação ao meio de multiplicação. Segundo Hartmann et al. (1990) o meio de enraizamento tem quatro finalidades: Manter o explante no lugar durante o período de formação da raiz; prover umidade para o explante; permitir trocas gasosas na base do explante e criar um ambiente escuro ou opaco, reduzindo a penetração de luz na base do explante..

No estádio de enraizamento *in vitro* também é fornecido carboidrato ao explante, porém existe a importância da diminuição da sua concentração, a fim de promover a nutrição autotrófica à planta (LEITE et al., 2000). Neste estádio o meio de cultura é suplementado

com auxinas, o grupo de fitorreguladores que influencia diretamente no enraizamento, promovendo a formação de raízes adventícias. Apesar do AIA, ANA e AIB serem os fitorreguladores mais utilizados em trabalhos de enraizamento, alguns estudos mostram que o AIB apresenta melhores resultados para enraizamento de frutíferas de clima temperado (MIRANDA et al., 2004; RADMANN et al., 2002). O AIA é pouco usado, pois se degrada facilmente com a luz, tendo melhor resposta em altas concentrações (CENTELLAS et al. 1999). As auxinas Picloram, 2,4-D e ANOA também podem ser usadas para o enraizamento, porém estimulam maior formação de calo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). É importante ressaltar que a resposta às diferentes auxinas no enraizamento varia de acordo com a cultivar ou espécie (PATI et al., 2006) . O enraizamento pode também ser *ex vitro*, onde os explantes são imersos em uma solução de auxina e transplantados diretamente para o substrato. Essa técnica otimiza o processo de micropropagação, e em termos de qualidade, a indução de enraizamento diretamente no substrato tende a produzir um sistema radicular mais completo e funcional, porém essa técnica é usada eficientemente apenas em plantas herbáceas e plantas lenhosa que possuam grande capacidade de enraizamento.

#### **2.4.4. Aclimatização**

Este estágio consiste na transferência da plântula de uma condição *in vitro* para uma condição *ex vitro*. Esta transferência é uma fase crítica no processo de obtenção de uma nova planta, pois a plântula passa de uma situação de baixo fluxo respiratório, alta disponibilidade de nutrientes e suprimento de carbono, condicionando uma existência heterotrófica, para um

ambiente que exige autossuficiência desta plântula (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

De maneira geral, no transplante das plântulas deve haver um controle das condições ambientais, com a utilização de substrato e nutrição adequada. As plântulas devem ser acondicionadas em casa de vegetação ou estufas sombreadas, para que haja pouca incidência luminosa. Um sistema de nebulização intermitente é importante a fim de manter a alta umidade relativa do ambiente. Porém, durante as três primeiras semanas que precedem a aclimatização, faz-se necessário a diminuição gradativa desta. A aspersão deve ser realizada com pequenas gotículas de água para que as plantas não sejam danificadas, suas raízes não sejam expostas e o substrato não fique encharcado (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Como as plântulas saem de uma condição asséptica é necessário tomar cuidados em relação à fitossanidade da estufa ou casa de vegetação. As plântulas são frágeis e altamente susceptíveis a microorganismos saprofíticos ou patogênicos. Durante o período de aclimatização é importante estar atento para o surgimento de fungos, pulgões e ácaros, e assim, sendo necessário, deve-se fazer uso de controladores químicos.

## 2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALICE WEB MDIC. Disponível em <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>> Acessado em novembro de 2013.

ASSIS, T.F., TEIXEIRA S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 1998. Parte II, p.261-296.

BHATIA, P., ASHWATH, N., SENARATNA, T., et al. Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.78, p. 1-21, jul. 2004.

BOGO, A.; GONÇALVES, M.J.; GRIMALDI, F. Doenças da Pereira. In: RUFATO, L.; KRETZSCHMAR, A.A.; BOGO, A. **A Cultura da Pereira**. Florianópolis, DIOESC, 2012. 247p.

BREWER, L.R.; PALMER, J.W. Global pear breeding programmes: goals, trends and progress for new cultivars and new rootstocks. **Acta Hort.** (ISHS) 909:105-119, 2011.

BRIGHENTI, L.M. Dormência da Pereira. In: RUFATO, L.; KRETZSCHMAR, A.A.; BOGO, A. **A Cultura da Pereira**. Florianópolis, DIOESC, 2012. 247p.

CALDAS, L.S., HARIDASAN, P., FERREIRA, M.E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 1998. Parte II, p. 81-130.

CALVETE, E.O., KAMPF, A.N., SUZIN, M., et al. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 186-191, 2002.

CENTELLAS, A.Q., FORTES, G.R. de L., MULLER, N.T.G., et al. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.34, n.2, p.181-186, 1999.

COUVILLON, G.A. Rooting responses to razilian treatments. **Acta Horticulturae.**, Georgia, v.227, p.187-196, 1988.

DANTAS, A.C.M. NESI, A.M., MACHADO, L.B., et al. Estabelecimento e Multiplicação *in vitro* de Cultivares de *Pyrus spp.* **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.8, p. 19-23, 2002.

DENARDI, F. Porta-enxertos. In: **Manual da Cultura da Macieira**. Florianópolis, Epagri, 1986.

DENARDI, F. Cultivares e seleções de macieira do programa de melhoramento genético da Epagri são destaques na Europa. **Informativo SBF**, Caçador, v. 25, n. 4, 2006.

DONINI, L.P., FERREIRA-MOURA, I., GUISSO, A.P. et al. Preparo de lâminas foliares de aráceas ornamentais: desinfestação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.4, p.517-522, 2005.

ERIG, A.C., SCHUCH, M.W., BRAGA, E.J.B. Enraizamento *in vitro* de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Carrick. **Ciência Rural**, Santa Maria, 34(1): 275-277, 2004.

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.

FACHINELLO, C.A, BIANCHI, V.J. Produção de mudas certificadas. In: FACHINELLO, J.C., HOFFMANN, A., NACHTIGAL, J.C. **Propagação de Plantas Frutíferas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 2005. Cap.10, p.207-220.

FAORO, I.D.; NAKASU, B.H. Perspectiva da cultura da pereira japonesa no Brasil. In: SEMINÁRIO SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 1, 23-26 out. 2001, Florianópolis, SC. **Anais...** Florianópolis: Epagri, 2001. P. 53-61.

FIORAVANÇO J. C. A cultura da pereira no Brasil: situação econômica e entraves para seu desenvolvimento. **Informações Econômicas**, São Paulo v 37, n 3, Março 2007.

FRÁGUAS, C. B., PASQUAL, M., PEREIRA, A. R. Multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L.: efeito da cinetina e do ácido giberélico. **Ciência agrotecnologia**. Lavras, v. 28, n. 1, p. 49-55, 2004.

GRATTAPLAGLIA, D., MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S., BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 1998. Parte II, p.183-260.

GRIMALDI, F., GONÇALVES, M.J., PELIZZA, T.R. Micropropagação. In: RUFATO, L.; KRETZSCHMAR, A.A.; BOGO, A. **A Cultura da Pereira**. Florianópolis, DIOESC, 2012. 247p.

HARTMANN, H.T., KESTER, D.E., DAVIES, F.T. **Plant Propagation: principles and practices**. 5<sup>a</sup> ed. New Jersey. 1990. 647p.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. 88 p. Fev 2012.

JUNIOR, A.W. et al. Melhoramento de porta-enxertos. In: BRUCKNER, C. H. **Fundamentos do Melhoramento de Fruteiras**. Viçosa, UFV, 2008. 202p.

LANE, W. D. IKETANI, H., HAYASHI, T. Shoot regeneration from cultured leaves of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.54, p. 9-14, 1998.

LEITE, G.B., FINARDI, N., FORTES, G.R. de L. Efeitos de concentração de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento *in vitro* do portaenxerto de pereira OH X F97. **Ciência agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.2, p.353-357, abr./jun., 2000.

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.



LUZ, A.R. et al. Floração e Polinização. In: RUFATO, L.; KRETZSCHMAR, A.A.; BOGO, A. **A Cultura da Pereira**. Florianópolis, DIOESC, 2012. 247p.

MACHADO, B.D., HIPÓLITO, J.S., RUFATO, L. Cultivares. In: RUFATO, L.; KRETZSCHMAR, A.A.; BOGO, A. **A Cultura da Pereira**. Florianópolis, DIOESC, 2012. 247p.

MACHADO, B.D., RUFATO, A.D.R., FILHO, J.L.M. Porta Enxertos. In: RUFATO, L.; KRETZSCHMAR, A.A.; BOGO, A. **A Cultura da Pereira**. Florianópolis, DIOESC, 2012. 247p.

MINISTÉRIO da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/servlet/VisualizarAnexo?id=13008> Acesso em: janeiro 2014.

MIRANDA, C.S., CHALFUN, N.N.J., HOFFMANN, A., et al. Enxertia recíproca e AIB como fatores indutores do enraizamento de estaca lenhosas dos portaenxertos de pessegueiro “Okinawa” e “Umezeiro”. **Ciência Agrotécnica**, Lavras. V.28, n.4, p. 778-784, 2004.

MUNIZ, J.N., KRETZSCHMAR, A.A, HIPÓLITO, J.S. Classificação botânica, origem e evolução. In: RUFATO, L.; KRETZSCHMAR, A.A.; BOGO, A. **A Cultura da Pereira**. Florianópolis, DIOESC, 2012. 247p.

MURASHIGE, T., SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. – **Physiology plant**, Waterbury, v.15, p. 473-497, 1962.

MUSACCHI, E. Princípios para implantação e gestão de modernos pomares de pereira In: X ENFRUTE (Encontro Nacional sobre Fruticultura de Clima Temperado), 1, 24-26 jul.2007, Fraiburgo, SC. **Anais...** Caçador: EPAGRI, 2007. P. 145-159.

OLIVEIRA, R.P., NINO, A.F.P., NICKEL, O. Limpeza de Patógenos e Propagação *in vitro* de Cultivares de Pereira. **Comunicado Técnico**. EMBRAPA. Pelotas- RS, 2004.

OLIVEIRA, P.R.D., et al. The Brazilian pear breeding program. **Acta Hort.** (ISHS) 909:145-151. 2011.

OLIVEIRA, P.R.D., Consolidação do programa brasileiro de melhoramento genético da pereira. Disponível em <<http://www.cnpqv.embrapa.br/pesquisa/MelhorPera/>> Acessado em: junho 2014.

PATI, P.K. RATH, S.P., SHARMA, M., et al. *In vitro* propagation of rose – a review. **Biotechnology Advances**, Seoul, v. 24, p. 94-114, 2006.

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

RADMANN, E.B., FACHINELLO, J.C., PETERS, J.A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de portaenxertos de macieira ‘M-9’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – SP, v.24, n.3, p. 624-628, 2002.

REIL, W.O., IRELAND, J., ELKINS, R.B. Propagation and Rootstock Selection. In: MITCHAM, E.J., ELKINS, R.B. **Pear Production and Handling Manual**. California. University of California Agriculture and Natural Resources, 2007. 215p.

ROCHA, P.S.G. da., SCHUCH, M.W., BIANCHI, V.J., et al. Qualidade da luz na micropropagação do porta-enxerto de *Prunus* cv. MR .S.2/5. **Bioscience**. Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 32-40, 2007.

ROUT, G.R., SAMANTARAY, S., MOTTLEY, J., et al. Biotechnology of the rose: a review of recent progress. **Scientia Horticulturae**, Ohio, v.81, p. 201-228, 1999.

RUFATO, A. R.; OLIVEIRA, P.R. D. de; RITSCHER, P.S.; LIMA, C.S.M.; GONÇALVES, M.A. Manual cross-pollination, fruit set and development in pear. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 918, p.749-751, 2011.

SANSAVINI, S. Portinnesti. In: ANGELINI, R. **Il Pero**. Bologna, Italia. ART Servizi Editoriali, 2007. p.270-281.

SCHUCH, M.W.; ERIG, A.C. Micropropagação de Plantas Frutíferas. In: FACHINELLO, J.C., HOFFMANN, A., NACHTIGAL, J.C. **Propagação de Plantas Frutíferas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 2005. Cap.8, p.155-174.

SHARMA, R.M., PANDEY, S.N., PANDEY, V. Introduction. In: **The Pear: Production, Post-Harvest Management and Protection**. India, IBDC Publishers, 2010. 699p.

SOUZA, J. A., DONINI, L.P., SILVA, L.C., et al. Enraizamento in vitro do portaenxerto de macieira-M9 em função da vedação, sacarose e material de suporte no meio de cultura. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.8, n.2, p. 161-164, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. California: Cummings, 1991. Cap. 17-18.

TORRES, A.C., CALDAS, L.S., FERREIRA, A.T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S., BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 1998. Parte I, p.11-20.

### **3. ARTIGO I – SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE *Pyrus communis* L. COM POTENCIAL PARA PORTAENXERTO**

#### **3.1. INTRODUÇÃO**

A pereira é uma espécie de clima temperado de grande importância nacional, porém, seu cultivo no Brasil não é expressivo. Segundo o IBGE a produção nacional em 2010 foi de 16.367 toneladas, sendo a área de cultivo representada por 1.540 hectares. Apesar do cultivo da pereira ser praticado em poucas áreas do Brasil, o consumo desta fruta apresentou considerável expansão e a produção nacional de peras não é capaz de atender a demanda interna do produto. De acordo com o ALICE (2013), em 2012, o Brasil importou cerca de 216 mil toneladas de peras frescas para atender a demanda interna, sendo a pera uma das frutas de clima temperado mais consumidas do Brasil.

A cultura da pereira é um importante nicho de mercado no Brasil e apresenta grande potencial de expansão na região sul, porém, existem algumas limitações para produções economicamente satisfatórias, como a falta de conhecimento e indefinição de portaenxertos compatíveis com cultivares copa. Os primeiros pomares de pereira no Brasil foram implantados com portaenxertos de *Pyrus calleriana*, *P. betulaefolia*, contudo, estes portaenxertos conferem vigor excessivo para as plantas, dificultando seu manejo (MACHADO et al., 2012). Diante disto, iniciou-se a adoção de marmeleiros para amenizar o problema de vigor excessivo, porém, tem-se observado que os portaenxertos de marmeleiros apresentam grau variável de incompatibilidade entre copa e portaenxerto com

alguns cultivares de pereira europeia, prejudicando a produção (LUZ et al., 2012).

Os portaenxertos de *Pyrus communis* L. são compatíveis com todas as cultivares copa de pereira europeia e através do melhoramento vegetal, podem ter características importantes selecionadas, como controle de vigor, resistência a doenças, adaptabilidade e precocidade (SHARMA; RANA, 2010). É o caso da série Old Home (OH) x Farmingdale (F), produzida no Oregon – Estados Unidos, que vêm sendo estudada como portaenxerto de pereira nos últimos 40 anos. Os portaenxertos desta série apresentam cerca de 60-70% menos vigor que o portaenxerto padrão para a região (seedlings de Winter Nelis) bem como apresentam maior precocidade e produção, são resistentes ao fogo bacteriano e têm amplos níveis de tolerância à *Psylla* e ao declínio da pereira. Existem várias seleções da série OHxF (87, 69, 40, 220, 230, 333, 513 e 516) que vêm sendo testadas para controle de vigor, propagação, enraizamento, precocidade e produção na região do Oregon e Califórnia. No entanto, portaenxertos de programas de melhoramento do mundo todo estão sendo introduzidos nestas regiões para avaliação e acredita-se que apenas alguns destes tenham sucesso, pois serão necessários muitos anos até que o portaenxerto de uma determinada região consiga se adaptar a múltiplas condições (REIL et al., 2007).

Na região sul do Brasil os trabalhos que avaliam potencial de novos portaenxertos para a cultura da pereira ainda são escassos. Portanto, o objetivo deste estudo foi selecionar, através de caracteres de interesse, genótipos de *Pyrus communis* L. que possuam vigor médio e apresentem potencial como portaenxerto para a utilização na cultura da pereira.

### 3.2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em um pomar experimental do Centro de Ciências Agroveterinárias, UDESC, utilizando uma população de *Pyrus communis* L. estabelecida em 2008, contendo 320 seedlings.

Para a seleção dos seedlings foram realizadas avaliações de acordo com caracteres morfológicos relacionados ao vigor, no período de Julho 2011, Julho 2012 e Julho 2013, durante o repouso vegetativo das plantas. Seis caracteres morfológicos de interesse foram avaliados para seleção do material: altura da planta, diâmetro do caule, número de gemas, número e comprimento de ramos do ano e número de lenticelas. Estes caracteres morfológicos foram utilizados, pois possuem correlação positiva com o vigor de planta e hábito de crescimento, sendo auxiliares na seleção de plantas candidatas a portaenxerto (GALARÇA et al. 2010). A altura das plantas foi determinada a partir do nível do solo até a gema apical do ramo ortotrópico. O diâmetro do caule foi determinado com o auxílio de um paquímetro digital em uma região 20 cm acima do nível do solo. O número de gemas e ramos do ano foi determinado por contagem simples, o comprimento dos ramos do ano foi determinado com auxílio de trena. O número de lenticelas foi determinado com auxílio de paquímetro digital, realizando a contagem em uma área de 1 cm<sup>2</sup>.

No primeiro ano de avaliação (2011), após a obtenção dos dados, foi realizada a média de todos os caracteres avaliados e foram escolhidas as plantas que representaram 30% abaixo da média geral da população. Cada planta constitui um genótipo diferente e os dados avaliados foram submetidos à análise de agrupamento (análise de cluster) para determinar a similaridade entre

estes genótipos. Os dendrogramas foram pré-determinados a formar três grupos de vigor – baixo, médio e alto. A população de seedlings é avaliada anualmente durante o período de repouso vegetativo com a finalidade de verificar se as características de interesse se mantêm ao longo do tempo.

### 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os critérios de vigor avaliados, dentro da população de seedlings foram selecionadas 34 plantas que se caracterizaram por estarem 30% abaixo da média geral da população. Estas foram submetidas à análise de agrupamento, onde três grupos de vigor foram formados de acordo com a similaridade entre plantas, apresentada em relação às variáveis analisadas. A principal característica de interesse que está sendo visada no portaenxerto é controle de vigor da copa. Os portaenxertos não podem ser muito fracos a ponto de não fornecerem ancoragem para a planta, nem tão vigorosos a ponto de não controlarem o tamanho da planta.

Os dendrogramas formados apresentam em vermelho o grupo de maior vigor, em verde o grupo de vigor médio e em azul o grupo de menor vigor. No ano de 2011, foram observadas 02 plantas no grupo de maior vigor, 06 plantas no grupo de vigor médio e as demais plantas no grupo de baixo vigor (Figura 2). No ano de 2012 foi observada uma planta no grupo de maior vigor, 05 plantas no grupo de vigor médio e as demais plantas no grupo de baixo vigor (Figura 3). No ano de 2013 foram observadas 04 plantas no grupo de maior vigor, 14 plantas no grupo de vigor médio e as demais plantas no grupo de baixo vigor (Figura 4). As diferenças observadas entre os anos de avaliação mostram que as



plantas desta população ainda não possuem um crescimento estabilizado, caracterizando a importância da realização destas avaliações anualmente. Os genótipos que se mostraram constantes no mesmo grupo de vigor médio em dois anos de avaliação estão realçados na tabela 2. Não foi observado nenhum genótipo que se manteve constante num grupo de vigor nos três anos de avaliação. O número de plantas inicialmente avaliadas foi 34, porém, plantas que se demonstraram pouco promissoras ou que sofreram grandes injúrias foram retiradas da avaliação, bem como, outras plantas da população que se demonstraram promissoras foram introduzidas.

O melhoramento vegetal de portaenxertos de plantas frutíferas é um processo demorado, pois existe um complicador adicional no fato de que as avaliações finais dos genótipos precisam ser compostas pelo portaenxerto e pela cultivar copa. O programa de melhoramento de portaenxertos de macieira do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos em conjunto com a Universidade de Cornell (USDA, 2011) possui um protocolo para desenvolver e identificar genótipos superiores que pode levar cerca de 30 anos, dividido em 10 estágios de 3 anos (Figura 5), onde o número de genótipos avaliados é substancialmente reduzido e o número de replicações clonais dos genótipos promissores é simultaneamente aumentado. Anualmente no programa novos genótipos de interesse são introduzidos e os genótipos menos promissores descartados. O programa visa obter portaenxertos altamente produtivos e resistentes a doenças, e dentro deste escopo busca melhorar determinados traços de interesse (Figura 6). Alguns portaenxertos já foram lançados no mercado pelo USDA (G.16, G.30, G.202,

G.41, G.935, G.11) e o programa está constantemente em busca de novos materiais.

De acordo com Junior et al. (2008) o programa de melhoramento que se inicia com a produção de novos genótipos possui quatro etapas básicas: i) fase de plântula; ii) fase de plantas jovens; iii) ensaios iniciais sob condições de cultivo, com plantas jovens e adultas e iv) plantios pilotos em condições de pomares comerciais para avaliações complementares. No caso do presente estudo, as plantas da população foram obtidas a partir de sementes e cultivadas por três anos até a primeira avaliação iniciar. O presente estudo se encontra na fase de plantas jovens, onde se está selecionando genótipos visando à propagação clonal, para futuramente realizar as avaliações de portaenxerto em condições de pomar.

### 3.4. CONCLUSÕES

Os genótipos 409, 548, 570 e 577 se mantiveram constantes no grupo de vigor médio e serão propagados clonalmente para dar início às avaliações em condições de cultivo.

### 3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALICE WEB MDIC. Disponível em <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>> Acessado em Dezembro de 2013.

GALARÇA, S.P. et al. Correlação de Pearson e análise de trilha identificando variáveis para caracterizar porta-enxerto de *Pyrus communis* L. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.34, n.4, p.860-869. 2010.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola.** Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. 88 p. Fev 2012.

JUNIOR, A.W. et al. Melhoramento de porta-enxertos. In: BRUCKNER, C. H. **Fundamentos do Melhoramento de Fruteiras.** Viçosa, UFV, 2008. 202p.

LUZ, A.R. et al. Floração e Polinização. In: RUFATO, L.; KRETZSCHMAR, A.A.; BOGO, A. **A Cultura da Pereira.** Florianópolis, DIOESC, 2012. 247p.

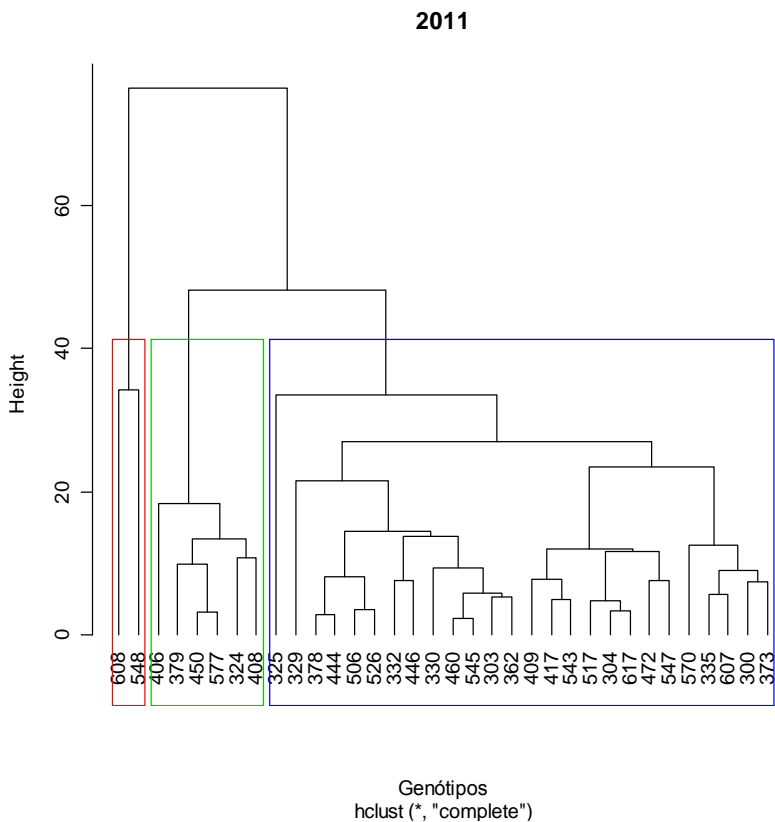
MACHADO, B.D., RUFATO, A.D.R., FILHO, J.L.M. Porta Enxertos. In: RUFATO, L.; KRETZSCHMAR, A.A.; BOGO, A. **A Cultura da Pereira.** Florianópolis, DIOESC, 2012. 247p.

REIL, W.O., IRELAND, J., ELKINS, R.B. Propagation and Rootstock Selection. In: MITCHAM, E.J., ELKINS, R.B. **Pear Production and Handling Manual.** California. University of California Agriculture and Natural Resources, 2007. 215p.

SHARMA, R.M., PANDEY, S.N., PANDEY, V. Breeding and Improvement. In: **The Pear: Production, Post-Harvest Management and Protection.** India, IBDC Publishers, 2010. 699p.

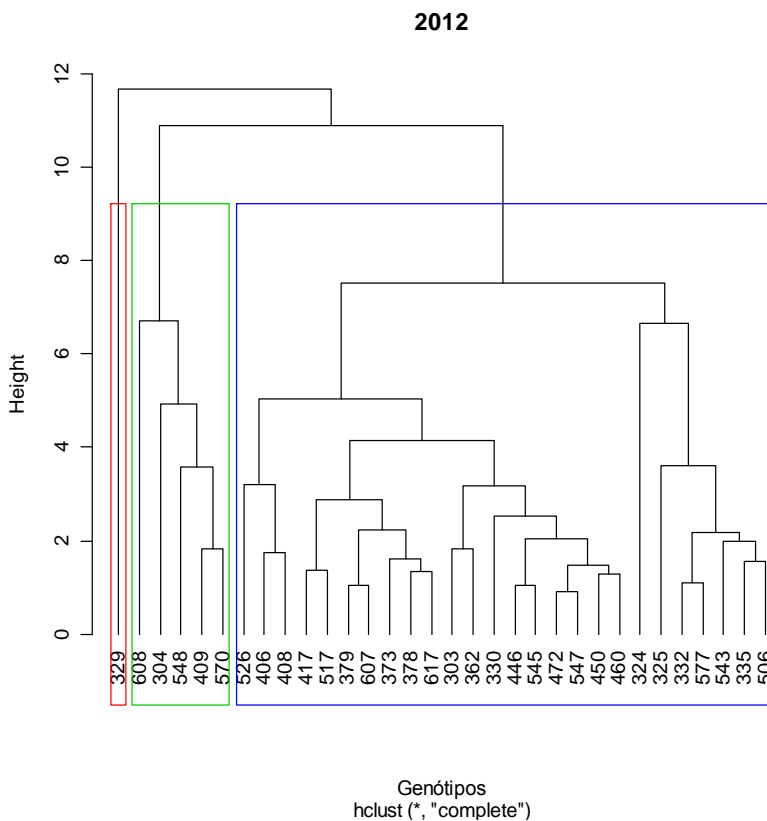
USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE Agricultural Research Service. A Journey Through the Development of Improved Apple Rootstock. Last update Feb 2011. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/Main/docs.htm?docid=15654>>. Acessado em: julho 2014.

## 3.6. ANEXOS



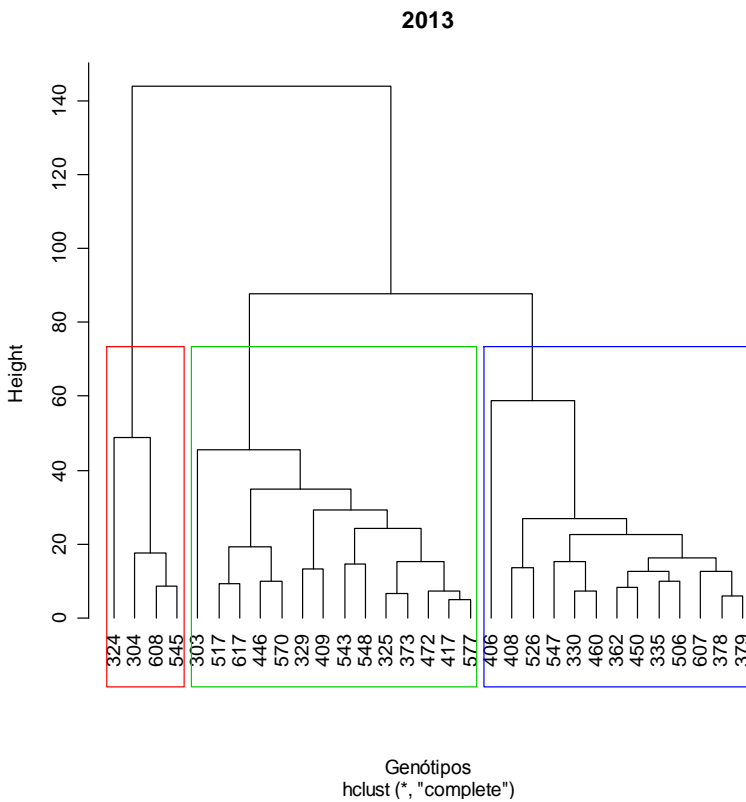
Fonte: produção do próprio autor

**Figura 1.** Dendrograma de similaridade fenotípica entre 34 genótipos de uma população de *Pyrus communis* L., obtido por um conjunto de caracteres morfológicos avaliados no ano de 2011.



Fonte: produção do próprio autor

**Figura 2.** Dendrograma de similaridade fenotípica entre 32 genótipos de uma população de *Pyrus communis* L., obtido por um conjunto de caracteres morfológicos avaliados no ano de 2012.

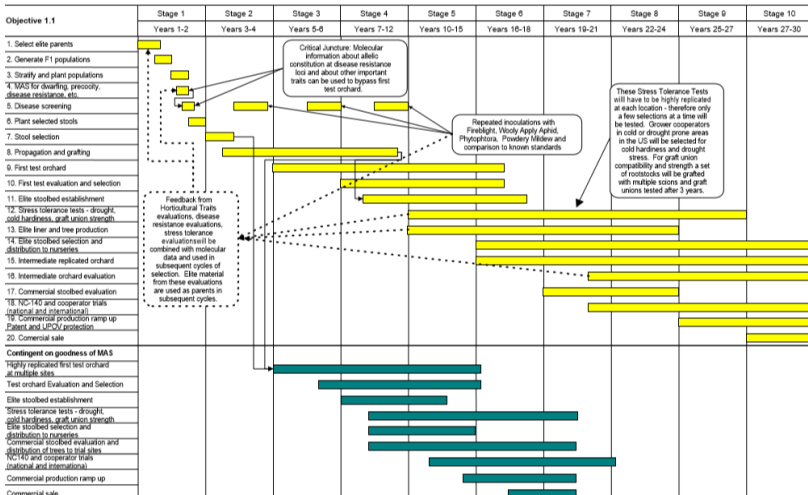


Fonte: produção do próprio autor

**Figura 3.** Dendrograma de similaridade fenotípica entre 31 genótipos de uma população de *Pyrus communis* L., obtido por um conjunto de caracteres morfológicos avaliados no ano de 2013.



# Apple Rootstock Breeding and Selection Protocols



Fonte: United States Department of Agriculture

**Figura 4.** Esquema dos protocolos para melhoramento e seleção de portaenxertos de macieira do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, organizado por estágios e seus tempos de avaliação, de acordo com cada objetivo do programa.

## Geneva Rootstock Selection Traits



TRAIT	EVALUATION YEARS	LOCATION
<b>Fire Blight resistance</b>	1 or 7	Greenhouse/Field
Phytophthora resistance	1	Greenhouse
<b>Replant Disease Complex</b>	1 or 7	Greenhouse/field
Wholly apple aphid res.	1	Greenhouse
Juvenility - Spines	3-4	Field/Stoolbed
Stoolbed rooting	3-4	Field/Stoolbed
Growth habit - Brittleness	3-4	Field/Stoolbed
Dwarfing	8-12	Orchard
Precocity	8	Orchard
Suckering	8	Orchard
Yield – Biennial bearing	12	Orchard
<b>Cold hardiness</b>	15	Orchard
<b>Drought tolerance</b>	4	Orchard
<b>Graft union compatibility</b>	5	Orchard

Fonte: United States Department of Agriculture

**Figura 5.** Características de interesse avaliadas pelo Programa de Melhoramento de Portaenxertos de Macieira, com os respectivos anos e locais de avaliação.



**Tabela 1.** Agrupamento de genótipos de uma população de *Pyrus communis* L., realizados através de similaridade fenotípica, obtida por um conjunto de caracteres morfológicos avaliados em 2011, 2012 e 2013. Os genótipos realçados se encontram no mesmo grupo de vigor por dois anos de avaliação.

2011			2012			2013		
Grupos de vigor			Grupos de vigor			Grupos de vigor		
Alto	Médio	Baixo	Alto	Médio	Baixo	Alto	Médio	Baixo
608	324	300	329	304	303	304	303	330
548	379	303		409	324	324	325	335
	406	304		570	325	608	329	362
	408	325		608	330	545	373	378
	450	329		548	332		409	379
	577	330			335		417	406
		332			362		446	408
		335			373		472	450
		362			378		517	460
		373			379		543	506
		378			406		570	526
		409			408		577	547
		417			417		617	607
		444			446		548	
		446			450			
		460			460			
		472			472			
		506			506			
		517			517			
		526			526			
		543			543			
		547			547			
		570			577			
		607			607			
		617			617			
		545			545			

Fonte: produção do próprio autor

#### **4. ARTIGO II – CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO *in vitro* DURANTE O ESTABELECIMENTO DE EXPLANTES DE *Pyrus communis* L. UTILIZANDO PLANT PRESERVATIVE MIXTURE™**

##### **4.1. INTRODUÇÃO**

Na micropropagação de plantas lenhosas a presença de contaminações fúngicas e bacterianas representa um entrave para o estabelecimento *in vitro* de uma cultura. A contaminação presente na superfície dos tecidos foliares, gemas e segmentos nodais pode ser controlada com substâncias desinfestantes como etanol, hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio. Além da contaminação superficial, é frequente encontrar contaminações endógenas, presentes no interior dos tecidos. A contaminação endógena é mais encontrada em explantes oriundos de plantas cultivadas no campo (TEIXEIRA, 2001). Para controlar contaminações endógenas existem métodos como tratamentos com antibióticos e fungicidas, que apesar de eficazes, podem acarretar fitotoxicidade e devem ser utilizados apenas para contaminantes específicos que estejam dentro do seu espectro de ação, pois do contrário podem diminuir a sensibilidade dos microorganismos aos tratamentos *in vitro* (LEIFERT et al., 1991).

O biocida de amplo espectro Plant Preservative Mixture (PPM™) tem sido utilizado com sucesso para controlar contaminações *in vitro* tanto de natureza exógena quanto endógena. A composição do PPM inclui metilisotiazolinona, nitrato de magnésio, sorbato de potássio e benzoato de sódio. Ele é estável ao calor, podendo ser autoclavado, e tem efeito na redução de microorganismos presentes em cultivos *in vitro*. De acordo com o fabricante recomenda-se a utilização do

PPM em concentrações entre 0,05 e 2,0 mL.L<sup>-1</sup> (PLANT CELL TECHNOLOGY, 2012). Concentrações na ordem de 10 a 20 mL.L<sup>-1</sup> causam fitotoxicidade aos explantes de plantas lenhosas como *Citrus sinensis* (NIEDZ e BAUSHER, 2002).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de PPM™ no controle da contaminação microbiana e na sobrevivência de explantes durante o estabelecimento *in vitro* de portaenxerto da espécie *Pyrus communis* L.

## 4.2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido durante o mês de novembro de 2013, no laboratório de Micropropagação de Plantas, do Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV/UEDESC, em Lages, SC. As plantas matrizes utilizadas são genótipos de uma população de *Pyrus communis* L. estabelecida em 2004 no pomar didático do CAV/UEDESC, previamente avaliados e selecionados quanto ao seu vigor.

Para o trabalho foram testadas duas origens de explantes: oriundos de plantas matrizes do campo e oriundos de plantas matrizes acondicionadas em câmara de crescimento; e seis assepsias mostradas no quadro a seguir:

<b>Assepsia</b>	<b>Solução de</b>	<b>PPM (mL L<sup>-1</sup>) meio de cultura</b>
A1	Álcool 70% (1 minuto) + NaOCl 2,5% + Twen 20 (15 minutos)	0
A2	Álcool 70% (1 minuto) + NaOCl 2,5% + Twen 20 (15 minutos)	2,0
A3	Álcool 70% (1 minuto) + NaOCl 2,5% + Twen 20 (15 minutos)	4,0
A4	Solução de PPM 5%, sob agitação durante quatro horas	0
A5	Solução de PPM 5%, sob agitação durante quatro horas	2,0
A6	Solução de PPM 5%, sob agitação durante quatro horas	4,0

Posteriormente à coleta de brotações das plantas matrizes, as brotações tiveram suas folhas excisadas e foram lavadas em água corrente por 15 minutos. Foram utilizadas como explantes apenas gemas laterais. O meio de cultura utilizado foi o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) sem adição de reguladores de crescimento, suplementado com 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de inositol e o pH ajustado para 5,8 antes da adição de 6,0 g L<sup>-1</sup> de ágar. Utilizaram-se tubos de ensaio (15x2cm) contendo 10 mL de meio de cultura. Após a inoculação, os explantes foram mantidos no escuro por 72 horas e posteriormente mantidos sob um fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, arranjado em fatorial 2 x 6 (origem do explante x assepsia) com 12 repetições por tratamento. Após três semanas as seguintes variáveis foram analisadas: contaminação bacteriana, contaminação fúngica e sobrevivência dos explantes. A sobrevivência foi considerada quando os explantes

(gemas laterais) brotaram. Os dados percentuais foram transformados em  $\sqrt{x}/100$ , submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas por Tukey em nível de significância  $p < 0,05$ , com auxílio do programa SAS 9.1.

#### 4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ANOVA para a variável contaminação bacteriana foi significativa para a interação origem do explante x assepsia. Realizando o desdobramento da interação, os explantes oriundos de plantas matrizes do campo tratados com as assepsias A1 e A2 apresentaram maior contaminação bacteriana, com 100 e 74,9% de contaminação, respectivamente. Os explantes oriundos de plantas matrizes acondicionadas em câmara de crescimento apresentaram, de modo geral, pouca contaminação bacteriana, porém, as menores foram observadas com as assepsias A3 e A6, com 8,3% de contaminação (Tabela 3). Estes dados corroboram com o que Dantas et al. (2002) observaram no estabelecimento *in vitro* de cultivares de pereira, onde os explantes oriundos de plantas matrizes do campo apresentaram maior contaminação bacteriana em relação às plantas em casa de vegetação. Jiménez et al., (2006) também observaram que maior quantidade de PPM adicionado ao meio de cultura foi mais eficaz para controlar a contaminação de explantes oriundos de plantas em casa de vegetação, porém, os autores não obtiveram resultados satisfatórios em relação ao controle da contaminação em explantes oriundos de plantas do campo, contrariando os resultados do presente estudo, em que as assepsias que utilizaram PPM como solução desinfestante foram mais eficazes para controlar

contaminação bacteriana de explantes oriundo do campo.

A ANOVA para a variável contaminação fúngica foi significativa para os fatores assepsia e origem do explante. Os explantes que apresentaram maior contaminação fúngica foram tratados com as assepsias A1 e A4, que não possuem PPM adicionado ao meio de cultura, com 33,4 e 12,45% de contaminação, respectivamente (Tabela 4). Os explantes oriundos de plantas matrizes do campo apresentaram maior contaminação fúngica que os explantes oriundos de plantas matrizes acondicionadas em câmara de crescimento (Tabela 5). Isso era esperado, pois as plantas do campo estão mais expostas a contaminações superficiais (TEIXEIRA, 2001). O PPM nas concentrações recomendadas pelo fabricante tem sido mais eficiente em controlar contaminações de fungos ou de bactérias quando em densidades menores de inóculo, porém quando expostos a maiores densidades de inóculo bacteriano, maiores concentrações de PPM são requeridas (NIEDZ, 1998).

A ANOVA para a variável sobrevivência dos explantes foi significativa para a interação origem do explante x assepsia. Desdobrando a interação, os explantes oriundos de plantas matrizes do campo apresentaram maior sobrevivência quando tratados com as assepsias A4 e A5, com 75,1 e 91,6% de sobrevivência, respectivamente (Tabela 6). Estas assepsias utilizaram PPM 5% como solução desinfestante com nenhuma ou menor dose de PPM no meio de cultura. A assepsia que utilizou somente álcool + hipoclorito não foi eficiente para controlar a contaminação microbiana em explantes oriundos de plantas matrizes do campo, não havendo sobrevivência neste tratamento. Já os explantes oriundos de plantas

matrizes acondicionadas em câmara de crescimento apresentaram alta sobrevivência em todos os tratamentos, com exceção do A6. Os explantes tratados com imersão em PPM e  $4 \text{ mg L}^{-1}$  de PPM no meio de cultura apresentaram menor sobrevivência, pois a alta concentração de PPM pode ter afetado o desenvolvimento da brotação. Este resultado confirma o que foi observado por Compton e Koch (2001) em explantes de petúnia, onde o número de brotos e gemas foi reduzido exponencialmente com o aumento da concentração de PPM no meio de cultura. Os autores George e Tripepi (2001) também observaram uma redução linear na formação de brotações à medida que se aumentou a concentração de PPM utilizada. Em espécies de briófitas o aumento de PPM no meio de cultura diminuiu o crescimento de protonemas, tanto em cultivos sem contaminação, quanto nos cultivos contaminados (ROWNTREE, 2006). Os autores Babaoglu e Yorgancilar (2000) observaram que  $2,0 \text{ mL L}^{-1}$  de PPM no meio de cultura é suficiente para controlar contaminações microbianas sem afetar a germinação de sementes e o desenvolvimento de explantes de *Poterium sanguisorba*. Já os autores Niedz e Bausher (2002) observaram um controle eficaz de contaminações microbianas de explantes oriundos de plantas em casa de vegetação com  $5 \text{ mL L}^{-1}$  de PPM ao meio de cultura, sem apresentar sinais de fitotoxicidade. Para explantes oriundos de plantas do campo o controle eficaz da contaminação foi obtido com  $20 \text{ mL L}^{-1}$  de PPM no meio de cultura, porém nesta quantidade de PPM houve uma severa fitotoxicidade.

As assepsias A4 e A5 apresentaram considerável taxa de sobrevivência e conseguiram controlar eficientemente as contaminações bacteriana e fúngica para explantes oriundos de plantas matrizes do campo.

As assepsias A2, A3, A4 e A5 apresentaram boa taxa de sobrevivência e conseguiram controlar eficientemente a contaminação fúngica, porém entre estas, a A3 foi mais eficiente para controlar a contaminação bacteriana.

#### 4.4. CONCLUSÕES

O PPM é um biocida eficaz no controle de contaminações microbianas e em concentrações mais baixas, não afeta a sobrevivência do explante.

A assepsia A3 realizada em explantes oriundos de plantas matrizes acondicionadas em câmara de crescimento apresentou controle das contaminações fúngica e bacteriana, bem como alta taxa de sobrevivência.

As assepsias A4 e A5 realizadas em explantes oriundos de plantas do campo apresentaram controle das contaminações fúngica e bacteriana, bem como uma alta taxa de sobrevivência.

#### 4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BABAUGLU, M.; YORGANCILAR, M. TDZ-specific plant regeneration in salad burnet. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 440: 31–34, 2000.

COMPTON, M. E.; KOCH, J. M. Influence of plant preservative mixture (ppm) on adventitious organogenesis in melon, petunia, and tobacco. **In Vitro Cellular e Developmental Biology Plant** 37:259±261; 2001.



DANTAS, A.C.M. NESI, A.M., MACHADO, L.B., et al. Estabelecimento e Multiplicação *in vitro* de Cultivares de *Pyrus spp.* **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.8, p. 19-23, 2002.

GEORGE, M. W., TRIPEPI, R. R. Plant Preservative Mixture (TM) can affect shoot regeneration from leaf explants of chrysanthemum, European birch, and rhododendron. **Hortscience** 36:768–769; 2001

JIMÉNEZ, V. M. et al. *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 86:389–395; 2006.

LEIFERT, C.; RITCHIE, J. Y.; WAITES, W. M. Contaminants of plant-tissue and cell cultures. **World journal of microbiology and biotechnology**. Volume 7, Number 4, 452-469, 1991.

MURASHIGE, T., SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. - **Physiology plant**, Waterbury, v.15, p. 473-497, 1962.

NIEDZ, R. P. Using isothiazolone biocides to control microbial and fungal contaminants in plant tissue cultures. **HortTechnology** 8:598–601; 1998.

NIEDZ, R. P.; BAUSHER, M. G. Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse- and field-grown trees. **In Vitro Cellular e Developmental Biology Plant** 38:468 – 471; 2002.

PLANT-CELL-TECHNOLOGY, INC. PPM: A powerful tool to prevent or eliminate microbial contamination in plant tissue culture. Accessed 28 April 2012 <<http://www.ppm4plant-tc.com/>>

ROWNTREE, J. K. Development of novel methods for the initiation of *in vitro* bryophyte cultures for conservation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 87:191–201; 2006.

TEIXEIRA, J.B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. Embrapa – **Recursos Genéticos e Biotecnologia**, simpósios, 2001.

## 4.6. ANEXOS

**Tabela 2.** Contaminação bacteriana de explantes de *P. communis* oriundos do campo e de câmara de crescimento, após 21 dias do estabelecimento *in vitro*.

Assepsia	Origem do Explante			
	Campo		Câmara de crescimento	
	Contaminação (%)			
A1	100	a A	33,2	a B
A2	74,9	a A	24,9	a B
A3	58,3	b A	8,3	b B
A4	24,9	c A	33,2	a A
A5	16,8	c A	16,8	a A
A6	0	c A	8,33	b A

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Fonte: produção do próprio autor

**Tabela 3.** Contaminação fúngica de explantes de *P. communis* tratados com diferentes assepsias, após 21 dias do estabelecimento *in vitro*.

Assepsia	Contaminação Fúngica (%)	
A1	33,4	A
A2	4,61	b
A3	4,61	b
A4	12,45	ab
A5	0	b
A6	0	b

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Fonte: produção do próprio autor

**Tabela 4.** Contaminação fúngica de explantes de *P. communis* oriundos do campo e de câmara de crescimento, após 21 dias do estabelecimento *in vitro*.

<b>Origem dos Explantes</b>	<b>Contaminação Fúngica (%)</b>
Campo	13,8 a
Câmara de crescimento	2,7 b

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Fonte: produção do próprio autor

**Tabela 5.** Sobrevivência de explantes de *P. communis* oriundos do campo e de câmara de crescimento, após 21 dias do estabelecimento *in vitro*.

<b>Assepsia</b>	<b>Origem do Explante</b>	
	<b>Campo</b>	<b>Câmara de crescimento</b>
	<b>Contaminação (%)</b>	
A1	0 c B	75 a A
A2	50 b B	83,4 a A
A3	16,7 c B	100 a A
A4	75,1 ab A	83,5 a A
A5	91,6 a A	83,4 a A
A6	41,6 b A	41,6 b A

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Fonte: produção do próprio autor

## 5. ARTIGO III – PROTOCOLO DE MULTIPLICAÇÃO E ENRAIZAMENTO *in vitro* PARA EXPLANTES DE *Pyrus communis* L. COM POTENCIAL PARA PORTAENXERTO, COMPREENDENDO A ETAPA DE ACLIMATIZAÇÃO.

### 5.1. INTRODUÇÃO

O estágio de multiplicação *in vitro* é caracterizado pela produção de um grande número de plantas. Fatores como idade do explante, composição do meio de cultura e concentração de fitorreguladores são de fundamental importância durante este estágio (HARTMANN et al., 1990). Vários meios de cultura podem ser utilizados, como o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), meio WPM (LLOYD e MCCOWN, 1986) e meio QL (QUOIRIN e LEPROIVRE, 1977). Diluições e variações dos meios de cultura também são utilizadas, apresentando bons resultados para diversas espécies lenhosas (SILVEIRA et al., 2001). Na multiplicação *in vitro* a classe de fitorregulador utilizada para induzir novas brotações é a citocinina, sendo empregada na faixa entre 0,5 e 5,0 mg L<sup>-1</sup>. O excesso de citocinina pode apresentar toxicidade à planta e comprometer seu desenvolvimento (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). A citocinina amplamente utilizada é o BAP (6-benzilaminopurina) e sua concentração é variável de acordo com as espécies e cultivares. Outras citocininas como cinetina, 2ip e TDZ também são utilizadas, porém o BAP apresenta maior taxa de multiplicação, partes aéreas mais longas, folhas menores e maiores quantidades de gemas em explantes de pereira (CHEVREAU et al., 1992).

O estágio de enraizamento *in vitro* é caracterizado pela formação de raízes adventícias nas partes áreas desenvolvidas anteriormente na fase de multiplicação *in*

*vitro*. Os fenômenos envolvidos na formação de raízes são difíceis de isolar e caracterizar, em decorrência de sua complexidade (ASSIS e TEIXEIRA, 1998). As raízes adventícias se formam a partir de células vivas do parênquima, primeiramente do floema secundário mais jovem (HARTMANN et al., 1990). Para plantas lenhosas há maior dificuldade durante a formação de raízes adventícias, pois elas possuem mais camadas de floema e xilema secundário. O tempo de desenvolvimento das raízes iniciais de lenhosas varia entre 10 a 25 dias, de acordo com a espécie ou cultivar (METIVIER et al., 2007; VIEIRA et al 2007). Os compostos vegetais diretamente responsáveis pelo enraizamento são as auxinas. Para lenhosas da família das rosáceas as auxinas que mais estimulam a rizogênese são o AIA, ANA e AIB (RADMANN et al., 2002). O AIB além de apresentar resultados positivos, tem sido muito utilizado por ser fotoestável, atóxico, de ação localizada (MIRANDA et al., 2004) e possuir menor custo em relação ao AIA e ANA.

Após o enraizamento os explantes passam para o estágio de aclimatização. Esta etapa é a mais crítica, pois a planta sai de sua condição heterotrófica para autotrófica. A aclimatização é fundamental para os explantes, pois durante sua permanência *in vitro* podem ocorrer anomalias de natureza morfológica, como a presença de estômatos não funcionais, e de natureza fisiológica, como menor capacidade fotossintética (ROGALSKI et al., 2003).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o meio de cultura e diferentes concentrações de BAP para a multiplicação *in vitro* de explantes de *Pyrus communis* L., bem como, avaliar diferentes concentrações de AIB no enraizamento *in vitro* e avaliar diferentes embalagens, substratos e características de explantes durante a

aclimatização do portaenxerto da espécie *Pyrus communis* L.

## 5.2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nas dependências do Laboratório de Micropropagação Vegetal, do Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV/UDESC, em Lages, SC.

### **Multiplicação *in vitro***

O experimento de multiplicação *in vitro* foi conduzido em setembro de 2011 e repetido em julho de 2013. Para o estudo foram testados três meios de cultura: MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), QL modificado (LEBLAY et al., 1991) e WPM (LLOYD e MCCOWN, 1986) e cinco concentrações de BAP: 0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>. Foram usadas como explantes partes aéreas de *Pyrus communis* L. previamente estabelecidas *in vitro*, com tamanho aproximado de 15 mm, contendo cerca de 4 a 6 gemas.

Os meios de cultura foram suplementados com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de inositol e o pH ajustado para 5,8 antes da adição de 6 g L<sup>-1</sup> de ágar. Utilizaram-se frascos de 250 mL, contendo 30 mL de meio de cultura. Os explantes foram mantidos sob um fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, arranjado em fatorial 3x5 (meio x BAP) com 5 repetições por tratamento e 3 explantes por frasco, perfazendo 15 unidades amostrais. Após 45 dias as variáveis analisadas foram número e comprimento de brotos, número de gemas e número de folhas. Os dados foram transformados em  $\sqrt{x + 0,5}$ , submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias

comparadas por Tukey em nível de significância  $p < 0,05$  ou por regressão polinomial com auxílio do programa SAS 9.1.

### **Enraizamento *in vitro***

O experimento de enraizamento *in vitro* foi conduzido em março de 2012 e repetido em julho de 2013. Foram testadas seis concentrações de AIB: 0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>. Utilizaram-se como explantes partes aéreas de *Pyrus communis* L. previamente multiplicadas *in vitro*, com tamanho aproximado de 20 a 25 mm, contendo cerca de 8 a 10 gemas. O meio de cultura utilizado foi QL modificado (LEBLAY et al., 1991) suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 100 mg L<sup>-1</sup> de inositol e o pH ajustado para 5,8 antes da adição de 6 g L<sup>-1</sup> de ágar. Utilizaram-se frascos de 250 mL, contendo 30 mL de meio de cultura. Os explantes foram mantidos sob um fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 9 repetições por tratamento e 4 explantes por frasco, perfazendo 36 unidades amostrais. Após 45 dias as variáveis analisadas foram percentagem de enraizamento, número e comprimento de raiz, comprimento de parte aérea e intensidade de calo (0 = ausência, 1 = pouca, 2 = média, 3 = alta). Os dados percentuais foram transformados em  $\arcsin \sqrt{x/100}$ , e os demais transformados em  $\sqrt{x} + 0,5$ , submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas por Tukey em nível de significância  $p < 0,05$  ou por regressão polinomial, com auxílio do programa SAS 9.1.



## **Aclimatização**

### *Experimento I*

O experimento de aclimatização foi conduzido em novembro de 2013. Utilizaram-se explantes previamente enraizados *in vitro* em meio QL modificado por Leblay et al. (1991). Foram testadas duas embalagens e três composições de substrato para aclimatização de *Pyrus communis* L. Os explantes com raízes foram transplantados para cumbucas plásticas com tampa e copos plásticos transparentes (300mL) com tampa. As composições de substrato testadas foram substrato comercial, substrato comercial + vermiculita (1:1) e substrato comercial + vermiculita + fibra de coco (2:2:1). Cada cumbuca plástica continha 12 plântulas, representando uma repetição. Cada copo plástico continha 1 plântula, onde 12 copos representaram uma repetição. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, arranjado em fatorial (2x3) com 3 repetições por tratamento. A sobrevivência foi avaliada aos 7, 15, 30 e 40 dias após o transplante. Os dados percentuais foram transformados em  $\arcsin \sqrt{x/100}$ , submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas por Tukey em nível de significância  $p < 0,05$ , com auxílio do programa SAS 9.1.

### *Experimento II*

O experimento de aclimatização foi conduzido em maio de 2014 Após a determinação da embalagem e substrato a ser utilizado para aclimatização de *Pyrus communis* L., foi testada a influência dos fatores tempo de enraizamento, número de raízes e comprimento de raízes na aclimatização. Para o fator tempo de enraizamento foram considerados dois tempos de exposição do explante ao meio de enraizamento *in vitro*:

120 e 60 dias. Para o fator número de raízes os explantes foram agrupados da seguinte maneira: de 1 a 4 raízes; 5 a 9 raízes; 10 a 14 raízes e 15 ou mais raízes. Para comprimento de raízes foram consideradas as seguintes classes: pequeno = 0 a 10 mm; médio = 11 a 30 mm e grande = + 31 mm. Foram aclimatizados 120 explantes, em copos plásticos transparentes com tampa contendo substrato comercial + vermiculita + fibra de coco (2:2:1). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, arranjado em fatorial (2x4x3) com 5 repetições, perfazendo 120 unidades amostrais. A sobrevivência foi avaliada aos 15 e 40 dias após o transplante, que ocorreu dia 05 de maio de 2014. Os dados percentuais foram transformados em  $\arcsin \sqrt{x/100}$ , submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas por Tukey em nível de significância  $p < 0,05$ , com auxílio do programa SAS 9.1.

### 5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.3.1. Multiplicação *in vitro*

O principal objetivo do estágio de multiplicação *in vitro* é produzir o maior número de plantas possível, com o mínimo de variação entre explantes (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Deste modo, uma das variáveis mais importantes a ser considerada é número de brotos. No presente estudo, a ANOVA para número de brotos foi significativa para os fatores meio de cultura e concentração de BAP nos dois anos avaliados. Em 2011 foi observado maior número médio de brotos quando os explantes foram cultivados em meio QL modificado com 2,64 brotos, porém não se diferenciando do WPM com 1,99 brotos. Em 2013 foi observado maior número médio de brotos com QL modificado, com 18,69 brotos

(Tabela 7). A diferença entre o número médio de brotos encontrado nos anos de avaliação se deve ao número de subcultivos que os explantes sofreram, visto que o material utilizado em 2013 foi o mesmo material utilizado em 2011. Os autores Almeida et al. (2002) e Santos et al. (2008) também observaram aumento exponencial no número de brotações, após períodos sucessivos de subcultivo, chegando a obter um máximo de 527 explantes após 5 subcultivos e 872,2 explantes após 6 subcultivos, respectivamente, na multiplicação de abacaxizeiro.

A concentração de BAP também apresentou efeito sobre o número de brotos observado. Foi então ajustada uma equação de regressão para este fator, onde se observou maior número de brotos (ponto de máxima) com a concentração de 3,5 e 3,6  $\text{ml L}^{-1}$  de BAP, nos anos 2011 e 2013, respectivamente (Figura 7). A concentração de BAP que induziu maior número de brotos é relativamente alta, porém os autores Bommineni et al. (2001) também observaram maior desenvolvimento de novas brotações ao utilizarem meio de cultura com nutrientes do QL e 3,0  $\text{mL L}^{-1}$  de BAP durante uma fase de condicionamento anterior à multiplicação de explantes de *Pyrus communis* L. cv. Bartlett. Kadota et al. (2001) observaram maior número de brotos com 2,5; 5,0 e 10,0  $\text{mL L}^{-1}$  de BA (benziladenina) em explantes de *Pyrus pyrifolia*. Já para explantes do portaenxerto Pyrodwarf foi observado o maior número médio de brotos (2,72) ao utilizar 1,0  $\text{mL L}^{-1}$  de BAP e 0,1  $\text{mL L}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$  (RUŽIĆ et al., 2008). Para *Pyrus calleriana*, foi observado o maior número de brotos (16,8) na combinação entre 1,5  $\text{mL L}^{-1}$  de BAP e 0,1  $\text{mL L}^{-1}$  de AIB (YEO e REED, 1995). Na figura 8 é apresentado o aspecto dos explantes de *P. communis* multiplicados sob as concentrações de BAP testadas em meio QL modificado, em 2013.

A ANOVA para comprimento de brotos foi significativa para a interação meio de cultura e concentração de BAP apenas em 2011. O maior comprimento de brotos foi observado nos meios MS acrescido de 0,5 e 4 mL L<sup>-1</sup> BAP, com 21,86 e 20,15 mm, respectivamente; e QL modificado acrescido de 0 e 0,5 mL L<sup>-1</sup> de BAP, com 17,79 e 20,32 mm, respectivamente (Tabela 8). Em 2013 a ANOVA para comprimento de brotos foi significativa somente para meio de cultura, onde os meios QL modificado e MS foram superiores em relação ao WPM (Tabela 7). Apesar da diferença encontrada na ANOVA para esta variável, em ambos os anos, os meios de cultura que apresentaram melhores resultados foram QL modificado e MS. De modo geral, em 2011, nas concentrações mais altas de BAP foi observado um menor comprimento de brotos. Embora as concentrações mais altas de BAP tenham induzido maior número de brotações, é importante para uma multiplicação eficiente que os explantes tenham além de uma boa taxa de multiplicação, tamanho adequado para facilitar o enraizamento *in vitro* (YEO e REED, 1995). Se as partes aéreas são muito pequenas podem não enraizar adequadamente, sendo então necessária uma fase intermediária de alongamento (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Para número de gemas e folhas, a ANOVA foi significativa apenas para o fator meio de cultura, em ambos os anos, onde as maiores médias foram observadas com o meio de cultura QL modificado e MS (Tabela 7). Isto também foi observado em explantes de *Pyrus communis* L. cv. Bartlett que foram cultivados em meio QL e apresentaram um aumento da densidade de gemas axilares e de folhas (BOMMINENI et al., 2001). Embora as variáveis número de gemas e folhas sejam secundárias na multiplicação *in vitro*, em espécies que

apresentam dificuldade para indução de brotações laterais, cortes longitudinais e/ou transversais podem ser realizados no explante como alternativa para propagação (ALMEIDA et al., 2002).

### 5.3.2. Enraizamento *in vitro*

O enraizamento *in vitro* é caracterizado pela indução de raízes adventícias, que é realizada pela presença de auxina no meio de cultura. Nesta etapa é muito importante que haja formação de raízes de qualidade, com pouca presença de calo, assegurando a posterior aclimatização. Em relação às concentrações de AIB testadas a ANOVA foi significativa para as variáveis percentagem de enraizamento, número de raiz, comprimento de parte aérea e intensidade de calo em ambos os anos avaliados (2012 e 2013). Para percentagem de enraizamento foi ajustada uma regressão linear, onde foi observada que a percentagem de enraizamento aumentou à medida que foi aumentada a concentração de AIB no meio de cultura (Figura 9). Os autores Pasqual e Lopes (1991) observaram um percentual de enraizamento de 85% com 5,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB, porém os explantes de *Pyrus calleryana* apresentaram raízes muito grossas e mal desenvolvidas, sendo mais apropriado utilizar 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB, que apesar de menor percentual de enraizamento (60%) apresentou raízes bem desenvolvidas. Iglesias et al. (2004) observaram percentagem de enraizamento de 82% com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB em explantes de *Pyrus communis* L. e em concentrações maiores foi observado a formação de muito calo. Da mesma forma, no presente estudo, os explantes tratados com 4,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB apresentaram grande incidência de calo.

Para número de raiz foi ajustada uma regressão quadrática, nos anos de 2012 e 2013, onde os pontos de

mínima observados foram 0,69 e 0,68 mg L<sup>-1</sup> de AIB e maiores concentrações a partir deste valor induziram maior formação de raízes adventícias (Figura 10). Trabalhos de enraizamento *in vitro* para a pereira 'Carrick' e para portaenxerto *Prunus sp.* obtiveram bom número de raiz com 1,2 e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB, respectivamente (ERIG et al., 2004; TIBOLA et al. 2004). No entanto, o experimento II de aclimatização deste trabalho revelou que o número de raízes presente em um explante não interfere na sobrevivência do mesmo na fase de aclimatização. Para comprimento de parte aérea e para intensidade de calo foram ajustadas regressões lineares, onde maiores concentrações de AIB induziram maior comprimento de parte aérea e também maior formação de calo (Figuras 11 e 12). A resposta linear em relação ao comprimento de parte aérea era esperada, visto que as auxinas são responsáveis por diversos processos fisiológicos nos vegetais, entre eles, o crescimento e alongamento de caules (TAIZ e ZEIGER, 1991). Porém, concentrações supra ótimas de auxina podem causar um efeito inibitório no crescimento de plantas, o que não foi verificado no presente estudo. A resposta linear em relação à formação de calo também era esperada, já que a mesma ocorre na presença de maiores concentrações de auxina, devido ao acúmulo de AIB nas células dos explantes. A formação do calo é indesejável na micropropagação, pois pode comprometer a qualidade do sistema radicular, afetando a conexão vascular da raiz com o explante, deste modo prejudicando a posterior aclimatização das brotações (FACHINELLO et al., 1995). Todas as variáveis analisadas tiveram o mesmo comportamento nos dois anos avaliados, demonstrando a reprodutibilidade do estudo.

### 5.3.3. Aclimatização

No experimento I a ANOVA foi significativa para os fatores embalagem e substrato, apenas aos 30 e 40 dias de avaliação. Durante as primeiras semanas de avaliação não houve diferenças entre o percentual de sobrevivência, porém após 30 dias foi possível observar que os copos individuais contendo a composição substrato comercial, vermiculita e fibra de coco (2:2:1) apresentaram maior sobrevivência em relação aos demais tratamentos (Tabela 9). Nas cumbucas plásticas contendo 12 plântulas foi possível observar uma maior contaminação por fungos, já que nenhum tipo de desinfestante foi utilizado nesta etapa. A elevada temperatura e umidade proporcionada pela embalagem possibilitaram a proliferação de patógenos e as plantas micropropagadas, mais frágeis com tecidos pouco lignificados, acabam sendo suscetíveis ao ataque de microrganismos nesta etapa (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Segundo Antunes et al. (2002), um bom substrato para produção de mudas não deve ter inóculo de microrganismos e/ou doenças, sendo importante promover a desinfestação do substrato previamente ao seu uso. Nos casos em que ocorreu contaminação, o fato de haver 12 plântulas em uma cumbuca foi agravante para o aumento de inóculo no substrato, já os copos plásticos individuais com tampa quando apresentaram alguma contaminação fúngica puderam ser descartados.

O substrato com fibra de coco apresentou maior sobrevivência em relação aos demais. Os autores Schuck et al. (2012) observaram que a fibra de coco em mistura com substrato comercial apresentou 100% de sobrevivência para explantes de videira. A fibra de coco resulta em um melhor desenvolvimento para plântulas,

pois apresenta maior retenção de umidade. É um dos fatores que causa menor sobrevivência de plântulas durante a aclimatização é a perda de água que estas sofrem por excessiva transpiração (SILVA et al., 2011).

Para o experimento II a ANOVA foi significativa para os fatores tempo de enraizamento e tamanho de raiz. Após 15 dias do transplântio, foi observado que o fator tempo de enraizamento teve efeito sobre o percentual de explantes vivos. Os explantes que foram aclimatizados após 120 dias de exposição ao meio de enraizamento *in vitro* apresentaram menor sobrevivência que os explantes aclimatizados após 60 dias (Tabela 9). O mesmo comportamento foi observado após 40 dias do transplântio. O tamanho de raiz dos explantes aclimatizados também apresentou influência no percentual de sobrevivência dos explantes, porém, somente 40 dias após o transplântio (Tabela 10). Foi observada maior sobrevivência nas raízes de tamanho pequeno e médio. A menor sobrevivência pode ter sido ocasionada por danos mecânicos que muitas vezes acontecem durante o transplântio de raízes muito grandes. Para algumas espécies é feita a poda de raiz, porém a manipulação do material de raiz nua pode resultar em má qualidade de transplântio e morte das plantas, devendo esta prática ser evitada. A aclimatização de explantes de *Pyrus communis* L. pode ser feita com raízes ainda pequenas, pois uma vez que os explantes tem a indução radicular estimulada, eles podem ser transplântados para outro substrato (HARTMANN et al. 1990).

#### 5.4. CONCLUSÕES

O meio QL modificado induziu maior formação de brotações durante o estágio de multiplicação *in vitro* e



apresentou melhor resultado para todas as variáveis analisadas.

Para obtenção de maior número de brotações os explantes de *Pyrus communis* L. podem ser cultivados em meio QL modificado acrescido de  $3,5 \text{ mL L}^{-1}$  de BAP por alguns subcultivos até a obtenção do número desejado de explantes. Se necessário, na repicagem anterior ao enraizamento, podem-se colocar os explantes em meio QL modificado sem adição de BAP, com a finalidade de alongar as brotações.

No enraizamento de explantes de *Pyrus communis* L. a utilização de AIB deve ser empregada na faixa entre  $1,0$  e  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ .

Para a obtenção de maior sobrevivência de explantes de *Pyrus communis* L., estes devem ser aclimatizados em copos transparentes com tampa, contendo a mistura substrato comercial + vermiculita + fibra de coco (2:2:1).

Os explantes de *Pyrus communis* L. podem ser aclimatizados 60 dias após o enraizamento *in vitro*, possuindo raízes com até 30 mm.

## 5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, W.A.B. et al. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, Aug. 2002

ANTUNES, L.E.C.; et al. Tratamento de substrato na produção de mudas de plantas frutíferas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.23, n.216, p.16-20, 2002.

ASSIS, T.F., TEIXEIRA S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 1998. Parte II, p.261-296.

BOMMINENI, V.R., et al. A New Method for Rapid *In Vitro* Propagation of Apple and Pear **HortScience**. v. 36, n. 6. p. 1102–1106. 2001.

CHEVREAU, E., THIBAUT, B., ARNAUD, Y. Micropropagation of Pear (*Pyrus communis* L.) **Biotechnology in Agricultura and Forestry**. Berlin, v. 18, 244-261, 1992.

ERIG, A.C., SCHUCH, M.W., BRAGA, E.J.B. Enraizamento in vitro de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Carrick. **Ciência Rural**, Santa Maria, 34(1): 275-277, 2004.

FACHINELLO, J.C. ; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2.ed. Pelotas : UFPel, 1995. 179p.

GRATTAPLAGLIA, D., MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S., BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 1998. Parte II, p.183-260.

HARTMANN, H.T., KESTER, D.E., DAVIES, F.T. **Plant Propagation: principles and practices**. 5<sup>a</sup> ed. New Jersey. 1990. 647p.

KADOTA, M.; IMIZU, K.; HIRANO, T. Double-phase *in vitro* culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear. **Scientia Horticulturae**. v. 89, n. 3, 2001, p. 207-215.

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.

LLOYD, G.; MCCOWN, B.; Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proc Int Plant Prop Soc** 30:420–427. 1980.

METIVIER, P.S.R., YEUNG, E.C., PATEL, K.R., et al. *In vitro* rooting of microshoots of *Cotinus coggygria* Mill, a woody ornamental plant. **In vitro cellular development biology plant**, Nova lorque v.43, p. 119-123, 2007.

MIRANDA, C.S., CHALFUN, N.N.J., HOFFMANN, A., et al. Enxertia recíproca e AIB como fatores indutores do enraizamento de estaca lenhosas dos portaenxertos de pessegueiro “Okinawa” e “Umezeiro”. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras. v.28, n.4, p. 778-784, 2004.

MURASHIGE, T., SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. - **Physiology plant**, Waterbury, v.15, p. 473-497, 1962.

PASQUAL, M.; LOPES, P. A. Influência de diversos fatores sobre o enraizamento do portaenxerto de pereira (*Pyrus calleryana*) *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 331-334, 1991.

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

RADMANN, E.B., FACHINELLO, J.C., PETERS, J.A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v.24, n.3, p. 624-628, 2002.

RUŽIĆ, D.J., et al. The influence of imidazole fungicides on multiplication *in vitro* of low vigorous pear and cherry rootstocks. **Acta Hort. (ISHS)** n. 839, p. 79-86, 2008.

SANTOS, M.D.M., RIBEIRO, D.G. TORRES, A.C. Brotações adventícias de abacaxizeiro ornamental sob o efeito de benzilaminopurina, ácido naftalenoacético e períodos de subcultivo. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília , v. 43, n. 9, Sept. 2008 . Available

SCHUCK, M. R. et al. Aclimatização de plantas micropropagadas de videira cv.Bordô (*Vitis labrusca* L.) Em diferentes substratos **J. Biotec. Biodivers.** v. 3, N.4: pp. 206-212, 2012.

SILVA, A.L.L. et al. Pré-aclimatização e aclimatização em cultivo hidropônico de plantas micropropagadas de *Eucalyptus saligna* Sm. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 179-184, abr./jun. 2011.

SILVEIRA, C.A.P., FACHINELLO, J.C., FORTES, G.R.de L., CITADIN, et al. Multiplicação *in vitro* de portaenxertos do gênero *prunus* sob diferentes concentrações de bap em dois meios de cultura **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.3, p.488-492, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. California: Cummings, 1991. cap. 17-18.

VIEIRA, R.L., LEITE, G.B., WAMSER, A.F. Efeito de substratos porosos no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira M-9 *Malus pumilla*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.29, n.1, 2007.

TIBOLA, C.S. et al. Diferentes meios de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* sp. **Rev. Bras. Agrobiologia**. V.10, n. 2, p. 191-195. 2004.

YEO, D.Y.; REED, B.M.; Micropropagation of Three *Pyrus* Rootstocks. **Hortscience** v. 30, n.3, p. 620–623. 1995.

## 5.6. ANEXOS

**Tabela 6.** Número de brotos, número de gemas e número de folhas por explante de *P. communis* sob efeito do meio de cultura, nos anos de avaliação 2011 e 2013.

Meio de Cultura	2011			
	Número de Brotos	Número de Gemas	Número de Folhas	Comprimento de Brotos
MS	1,57 b	8,38 a	9,80 a	*
QL modificado	2,64 a	9,36 a	10,7 a	*
WPM	1,99 ab	6,00 b	7,73 b	*
CV (%)	22,7	17,1	13,1	

2013				
MS	10,90 b	9,95 ab	12,92 ab	23,04 ab
QL modificado	18,96 a	11,08 a	15,66 a	25,08 a
WPM	8,93 b	8,86 b	11,2 b	21,16 b
CV (%)	19,7	12,7	13,9	17,5

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. \* Dados apresentados na tabela 8.

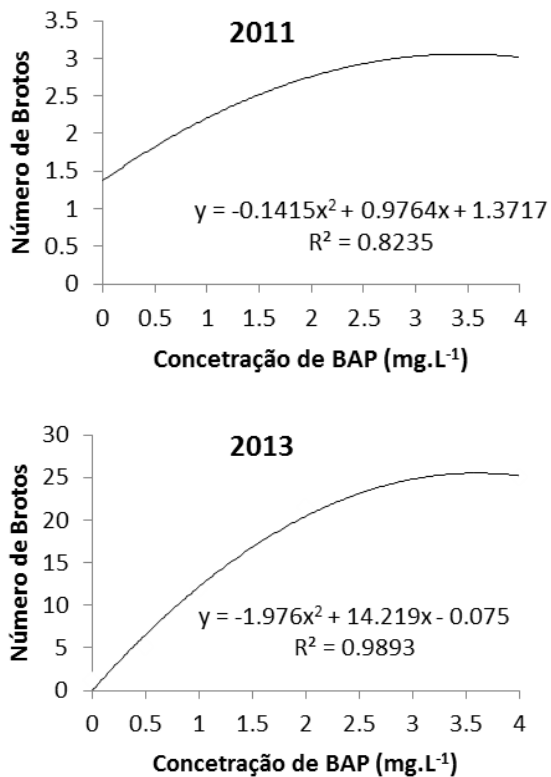
Fonte: produção do próprio autor

**Tabela 7.** Comprimento de brotos de explantes de *P. communis* nos meios de cultura QL modificado, MS e WPM, suplementados com diferentes concentrações de BAP, no ano de 2011.

Concentração BAP (mg L <sup>-1</sup> )	Comprimento de Brotos					
	QL modificado		MS		WPM	
0	17,79	abA	16,33	bcA	14,20	Ab
0,5	20,32	aA	21,86	aA	11,58	aB
1	13,46	bcA	13,27	cdA	14,20	aA
2	10,64	cA	12,86	dA	10,99	aA
4	13,46	bcB	20,15	abA	9,61	aB
CV (%)	25,0					

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Fonte: produção do próprio autor



**Figura 6.** Número de brotos por explante de *P. communis* em função da concentração de BAP no meio de cultura, em 2011 e 2013.  
Fonte: produção do próprio autor



Fonte: produção do próprio autor

**Figura 7.** Explantes de portaenxerto de *P. communis* cultivados com diferentes concentrações de BAP em meio QL modificado.

**Tabela 8.** Percentagem de sobrevivência de explantes de *P. communis* aos 15 e 40 dias após transferência do ambiente *in vitro* para o ambiente *ex vitro*, em função dos fatores embalagem para aclimatização e composição do substrato.

<b>Embalagens</b>	<b>Sobrevivência de explantes (%)</b>			
	7 dias	15 dias	30 dias	40 dias
Cumbuca	91,8 <sup>ns</sup>	83,3 <sup>ns</sup>	60,1 b	35,8 b
Copo	89,4 <sup>ns</sup>	81,2 <sup>ns</sup>	70,3 a	51,7 a
<b>Composição de substrato</b>				
Substrato comercial	91,6 <sup>ns</sup>	83,3 <sup>ns</sup>	59,6 b	29,1 c
Substrato comercial + Vermiculita (1:1)	99,8 <sup>ns</sup>	88,3 <sup>ns</sup>	61,1 b	43,2 b
Substrato comercial + Vermiculita + fibra coco (2:2:1)	91,6 <sup>ns</sup>	83,3 <sup>ns</sup>	75 a	59,6 a
CV (%)	25,6	22,5	12,1	22,3

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Fonte: produção do próprio autor

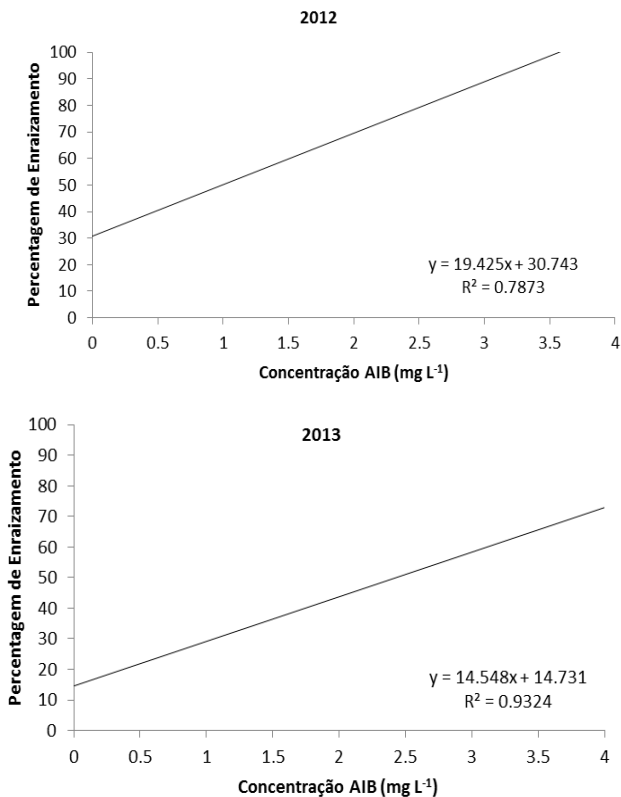


**Tabela 9.** Percentagem de sobrevivência de explantes de *P. communis* aos 15 e 40 dias após transferência do ambiente *in vitro* para o ambiente *ex vitro*, em função dos fatores data de enraizamento e tamanho de raiz.

Tempo de exposição	Sobrevivência de Explantes (%)				
	15 dias	40 dias	Tamanho de Raízes	15 dias	40 dias
60 dias em meio de cultura	84,1 a	60,2 a	Pequena (0–15mm)	78,5 <sup>ns</sup>	60,7 a
120 dias em meio de cultura	32,0 b	0 b	Média (16-40mm)	83,8 <sup>ns</sup>	66,8 a
			Grande (+41mm)	64,2 <sup>ns</sup>	24,3 b
CV (%)	16,4	21,8		16,4	21,8

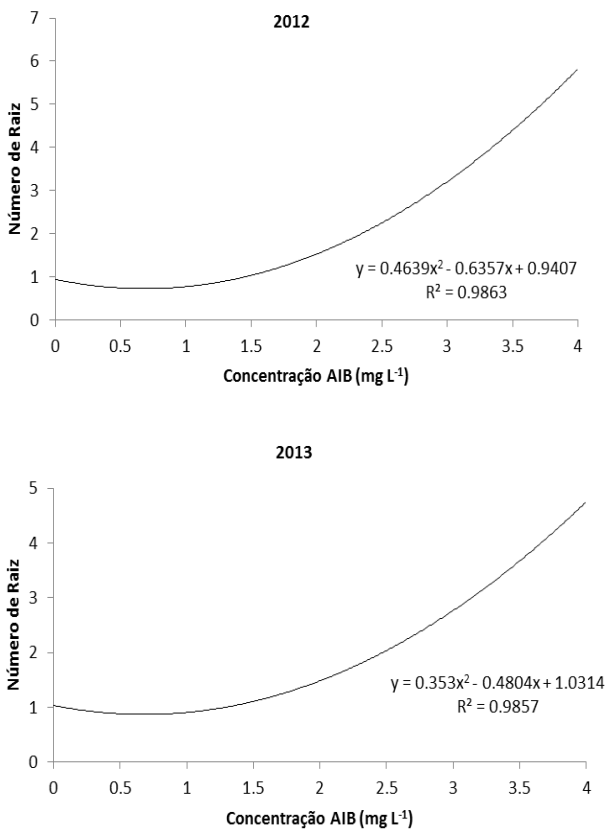
Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Fonte: produção do próprio autor



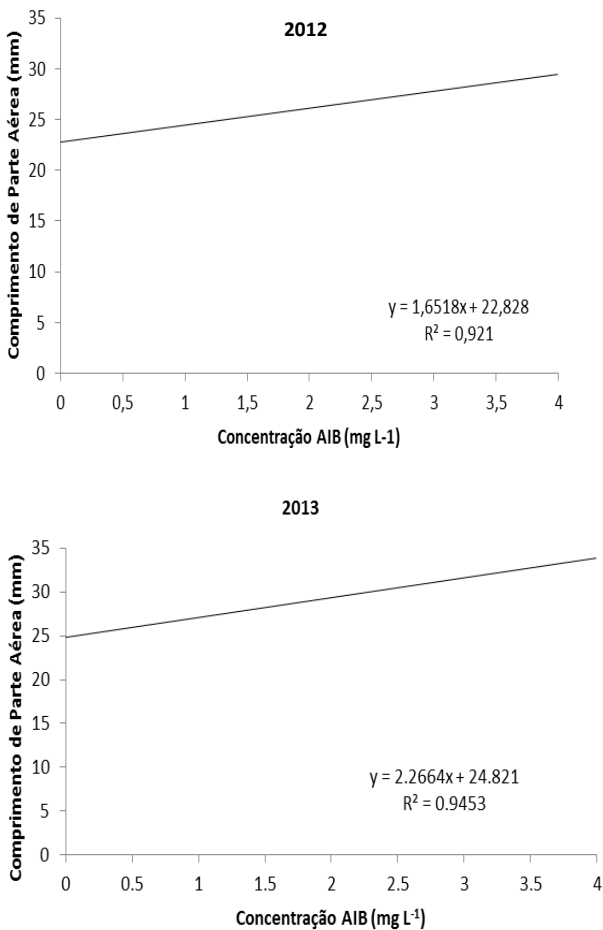
Fonte: produção do próprio autor

**Figura 8.** Percentagem de enraizamento para explantes de *P. communis* em função da concentração de AIB no meio de cultura, nos anos de avaliação 2012 e 2013.



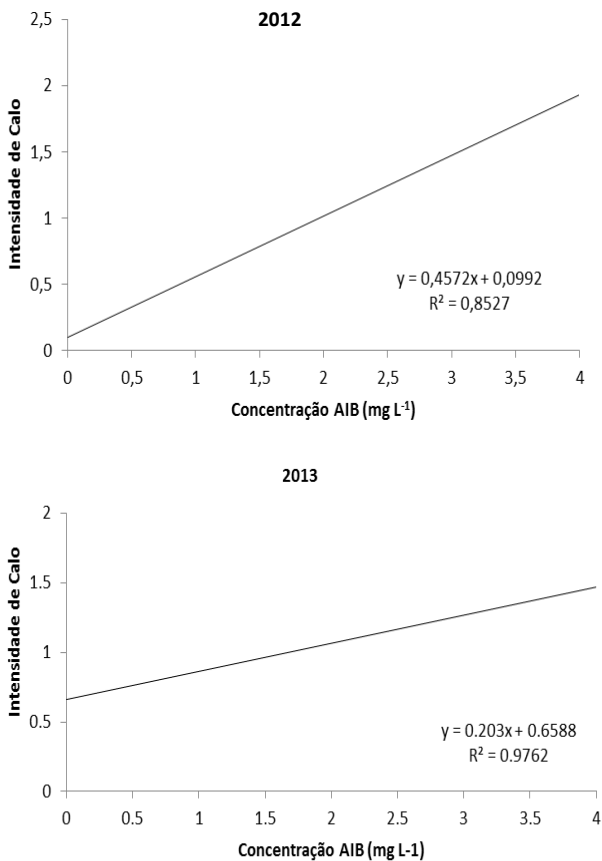
Fonte: produção do próprio autor

**Figura 9.** Número de raiz por explante de *P. communis* em função da concentração de AIB no meio de cultura, nos anos de avaliação 2012 e 2013.



Fonte: produção do próprio autor

**Figura 10.** Comprimento de parte aérea de explantes de *P. communis* em função da concentração de AIB no meio de cultura, nos anos de avaliação 2012 e 2013.



Fonte: produção do próprio autor

**Figura 11.** Intensidade de calo em explantes de *P. communis* em função da concentração de AIB no meio de cultura, nos anos de avaliação 2012 e 2013.

## **6. ARTIGO IV – ENRAIZAMENTO *in vitro* DE PORTAENXERTO DE *Pyrus communis* L. UTILIZANDO ÁCIDO INDOLACÉTICO PRODUZIDO POR RIZÓBIOS DE *Adesmia latifolia***

### **6.1. INTRODUÇÃO**

Interações entre vegetais e microrganismos da rizosfera são importantes do ponto de vista produtivo, pois a associação entre estes dois organismos pode aumentar o rendimento de uma determinada cultura. As rizobactérias que são capazes de beneficiar as plantas são denominadas Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas - PGPR. Estas bactérias são capazes de colonizar o sistema radicular de plantas e promover crescimento, onde as plantas resultantes desse tipo de interação podem ser maiores, mais vigorosas, com maior produtividade e mais sadias (CHEN et al., 2002). Dentre as rizobactérias, os rizóbios são conhecidos pela sua capacidade de fixar nitrogênio e promover crescimento de diversas espécies leguminosas (WERNER, 1992). Porém, estudos demonstram que os rizóbios tem potencial para promover crescimento em plantas não leguminosas e além da capacidade de fixação de nitrogênio, os rizóbios também são produtores de auxinas.

As auxinas são o grupo de hormônios em plantas, responsáveis por diversas atividades metabólicas, entre elas a indução do enraizamento. Na micropropagação são utilizadas auxinas exógenas para induzir a formação de raízes adventícias. As auxinas mais utilizadas são ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB) e ácido naftalenoacético (ANA). Porém, os custos do AIA comercial são altos, e esta auxina apresenta fotoinstabilidade, degradando-se facilmente com a luz. A

utilização de rizóbios produtores de AIA durante a etapa de enraizamento é uma alternativa ao uso do AIA comercial ou de outras auxinas. Existem alguns trabalhos utilizando bactérias na micropropagação de espécies de oliveiras, pinus e macieira (PEYVANDI et al.,2010), porém, dentro da abrangência da revisão realizada, não existem relatos na literatura sobre a utilização destes microrganismos no enraizamento *in vitro* de portaenxertos de pereira.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de rizóbios de *Adesmia latifolia* produtores de AIA, para promover o enraizamento de explantes de portaenxerto da espécie *Pyrus communis* L., em substituição ao AIA comercial.

## 6.2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido durante o mês de abril de 2012, no Laboratório de Micropropagação Vegetal, do Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV/UDESC e no Laboratório de Biotecnologia da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina– Epagri, em Lages, SC.

### **Quantificação de auxina**

Nove isolados de bactérias de nódulos radiculares de *Adesmia latifolia* pertencentes à coleção do Laboratório de Biotecnologia da Epagri foram avaliados quanto à produção de ácido indolacético (AIA) através do método colorimétrico de Asghar et al. (2002). Os isolados foram cultivados em meio de cultura 79 (VINCENT, 1970) suplementado com  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de L-triptofano, durante 72 horas a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ . Após o cultivo dos isolados, alíquotas de 2 mL foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 5 minutos a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  do sobrenadante foi

adicionado à 1,5 mL de solução de Salkowski ( $\text{FeCl}_3 + \text{HClO}_4$  35%). As amostras foram armazenadas no escuro por 30 minutos e após esse período foi verificada a mudança de coloração das amostras de amarelo para vermelho, indicando produção de AIA. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 530nm. A concentração de AIA produzida pelos isolados foi estimada por um ajuste à curva padrão, obtida através do cultivo do meio 79 com concentrações conhecidas de AIA comercial (0, 1, 2, 4, 6, 10, 20, 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com 3 repetições e os isolados que apresentaram maior produção de AIA foram utilizados para o enraizamento *in vitro* de explantes de *Pyrus communis* L.

### **Enraizamento *in vitro***

No enraizamento *in vitro* foram testadas duas condições de meio de cultura: autoclavado (isolados mortos) e filtroesterilizado (isolados vivos); três fontes de AIA: isolado EEL0511, isolado EEL6438 e AIA comercial; e quatro concentrações de AIA: 0; 0,5; 1,0; 2,0  $\text{mg L}^{-1}$ . Foram utilizadas como explantes partes aéreas de *Pyrus communis* L. previamente multiplicadas *in vitro*, com tamanho aproximado de 25 mm, contendo cerca de 8 a 10 gemas. O meio de cultura utilizado foi QL modificado por Leblay et al. (1991) suplementado com 30  $\text{g L}^{-1}$  de sacarose, 100  $\text{mg L}^{-1}$  de inositol e o pH ajustado para 5,8 antes da adição de 6  $\text{g L}^{-1}$  de ágar. Utilizaram-se frascos de 250 mL, contendo 30 mL de meio de cultura. Os explantes foram mantidos no escuro por 72 horas e posteriormente sob um fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 8 repetições por tratamento e 4 explantes por frasco, perfazendo 32



unidades amostrais. Após 45 dias as variáveis analisadas foram: percentagem de enraizamento, número e comprimento de raiz, comprimento de parte aérea e calo. Os dados percentuais foram transformados em  $\arcsin \sqrt{x/100}$ , e os demais transformados em  $\sqrt{x} + 0,5$ , submetidos à análise de variância e as médias comparadas por Tukey em nível de significância  $p < 0,05$  ou por regressão polinomial.

### 6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A curva padrão para estimar a quantidade de AIA produzida pelos isolados está representada pela figura 13. Os nove isolados testados, pertencentes à coleção da Epagri, apresentaram produção de AIA, que variou de 27,0 a 71,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . De acordo com a quantidade de AIA produzida, foram escolhidos os dois isolados que apresentaram as maiores concentrações da auxina, os isolados EEL6438 e EEL0511 com 62,1 e 71,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 11). As maiores concentrações de AIA produzidas pelos isolados sugere o potencial destes para promoção e indução de enraizamento em espécies leguminosas e não leguminosas (SOTTERO et al. 2006). Rizóbios isolados de uma mesma espécie podem apresentar grandes variações na produção de AIA, como observado por Schlindwein et al. (2008), Chagas Jr et al. (2009) e Stroschein et al. (2011) em acácia-negra, alfafa e caupi, respectivamente. Portanto, é importante a quantificação e escolha dos isolados a serem utilizados na indução de enraizamento.

Os tratamentos utilizando AIA filtroesterilizado, compostos por rizóbios vivos, apresentaram em todas as repetições contaminação gerada pela própria bactéria. Como foi observada uma grande contaminação bacteriana, que afetou a indução de enraizamento dos

explantes, apenas os resultados dos tratamentos utilizando AIA autoclavado foram apresentados.

As variáveis percentagem de enraizamento e número de raiz apresentaram apenas o fator concentração de AIA significativo, ajustando-se em regressão linear crescente, onde a medida que a quantidade de AIA aumentou foi observado maior percentual de enraizamento e maior quantidade de raízes (Figura 14 e 15). A variável comprimento de raiz apresentou apenas o fator fonte de AIA significativo, onde o AIA produzido pelos isolados EEL6438 e EEL0511 proporcionou maior crescimento de raiz quando comparado ao AIA comercial (Tabela 12). No presente estudo, os comprimentos de raízes observados nos explantes tratados com os isolados são maiores que os comprimentos observados pelos autores Erig et al. (2004) no enraizamento *in vitro* de *Pyrus communis* L. utilizando ANA, com 9,0 mm de comprimento médio.

No enraizamento *in vitro* do portaenxerto de macieira 'Marubakaido', ao serem testados isolados de *Adesmia latifolia* da coleção da Epagri, o isolado EEL1610B apresentou maior comprimento de raiz em relação ao AIA comercial, com 13,06 e 10,06 mm, respectivamente. Porém, assim como no presente estudo, não diferiu significativamente do AIA comercial para a variável número de raiz (MUNIZ et al. 2013).

Peyvandi et al. (2010) observaram no enraizamento de explantes de oliveira que o comprimento e número de raiz apresentaram aumento significativo quando tratados com caldo de rizobactérias, em comparação ao tratamento com AIB. Estes autores observaram também que as maiores densidades populacionais das rizobactérias ( $10^8$ ) apresentaram maiores valores de comprimento e número de raiz.

Para a variável calo houve interação entre os fatores analisados e o tratamento que apresentou maior formação de calo foi o que utilizou AIA comercial na concentração de 2 mg L<sup>-1</sup>. Os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre si (Tabela 13). Estudos de enraizamento *in vitro* de macieira, amoreira, framboeseira, pessegueiro e ameixeira documentam que maiores concentrações de auxinas comerciais (AIA, ANA e AIB) apresentam maior formação de calo (CENTELLAS et al., 1999; RADMANN et al., 2003; ROGALSKI et al., 2003; LEITZKE et al., 2009). No presente estudo, os explantes tratados com AIA produzidos pelos isolados apresentaram pouco ou nenhum calo, maior comprimento radicular e espessura radicular mais fina quando comparados aos tratamentos com AIA comercial, independente da concentração (Figura 16).

Os resultados mostram que os tratamentos autoclavados (isolados mortos) induziram a formação de raízes adventícias, portanto o AIA produzido pelos isolados estava presente e ativo mesmo após a autoclavagem do meio de cultura, resistindo à alta temperatura sem perder sua eficácia. Já os tratamentos utilizando AIA filtroesterilizado (isolados vivos), apresentaram em todas as repetições contaminação gerada pela rizobactéria. Portanto, os resultados destes tratamentos não foram apresentados, mostrando que nas condições do presente estudo, a utilização dos rizóbios vivos não foi viável.

#### 6.4. CONCLUSÕES

O ácido Indolacético produzido pelos isolados de *Adesmia latifolia* EEL6438 e EEL0511 pode ser utilizado

para indução do enraizamento *in vitro* de explantes de *Pyrus communis* L.

O ácido Indolacético produzido pelos isolados de *Adesmia latifolia* EEL6438 e EEL0511 promove maior comprimento radicular aos explantes de *Pyrus communis* L. que o AIA comercial.

A utilização dos isolados produtores de AIA deve ser feita na forma autoclavada, pois não afeta a produção de AIA e não apresenta nenhuma contaminação provocada pelo rizóbio.

## 6.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASGHAR, H.N. et al. Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.35, n.4, p.231-237, 2002.

CENTELLAS, A.Q.,. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* da macieira. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília , v. 34, n. 2, Feb. 1999 .

CHAGAS Jr., A.F. et al. Produção de ácido indol-acético por rizóbios isolados de caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, v.56, n.6, p.812-817, 2009.

CHEN, L.S.; FIGUEIREDO, A.; VILLANI, H. MICHAJLUK, J.; HUNGRIA, M. Diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from field-grown soybean nodules in Paraguai. **Biol. Fertil. Soils**. v. 35, p. 448-457, 2002.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W.; BRAGA, E.J.B. Enraizamento *in vitro* de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Carrick. **Cienc. Rural**, Santa Maria , v. 34, n. 1, Feb. 2004 .

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.

LEITZKE, L.; DAMIANI, C.R.; SCHUCH, M.W. Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, June 2009.

MUNIZ, A. W. et al. Rooting and acclimatization of micropropagated marubakaido apple rootstock using *Adesmia latifolia* rhizobia. **SpringerPlus** 2:437, 2013.

PEYVANDI, M. et al. Pseudomonas fluorescent and its ability to promote root formation of olive microshoots. **International Journal of Plant Production**, v.4, n.1, p.63-66, 2010.

RADMANN, E. B.; GONCALVES, E. D.; FORTES, G. R. de L. Concentrações de ácido indolbutírico e períodos de escuro, no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta (*Rubus* sp.), cv. ébano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 1, p. 124-126, 2003

ROGALSKY, M. et al. Aclimatização de porta-enxertos de *Prunus* sp. Micropropagados. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 25, n. 2, p. 279-281, 2003.

SCHLINDWEIN, G. et al. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.3, p.658-664, 2008.

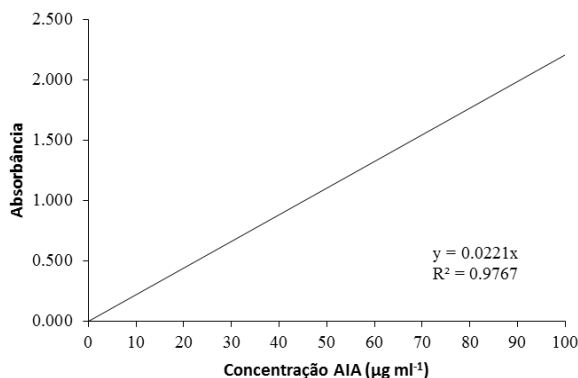
SOTTERO, A.N. et al. Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.30, n.2, p.225-234, 2006.

STROSCHEIN, Marcos Roberto Dobler et al . Caracterização e influência de rizóbios isolados de alfafa na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de arroz. **Cienc. Rural**, Santa Maria , v. 41, n. 10, Oct. 2011 .

VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. (International Biological Programme Handbook, 15)

WERNER, D. Physiology of nitrogen-fixing legume nodules. Compartments and functions. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H. AND EVANS, H. **Biological nitrogen fixation**. Chapman&Hall. New York, N.Y., U.S.A. p. 399-43. 1992.

## 6.6. ANEXOS



Fonte: produção do próprio autor

**Figura 12.** Curva padrão para definir a concentração de AIA produzido pelos isolados de *Adesmia latifolia*, de acordo com absorbância obtida através de espectrofotômetro.

**Tabela 10.** Quantidade de AIA produzido por nove isolados de *Adesmia latifolia* e um controle, estimada através da curva padrão estabelecida por concentrações conhecidas de AIA.

Amostra	Produção de AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
Controle	0
EEL0210	28,1
EEL 2211	46,1
EEL 1711	27,0
EEL 2111	45,7
EEL 6438*	62,1
EEL 0511*	71,0
EEL 2311	43,1
EEL 37810	43,8
EEL 15384	56,4

\*Isolados escolhidos por apresentarem maior produção de AIA.

Fonte: produção do próprio autor

**Tabela 11.** Comprimento de raiz em explantes de *Pyrus communis* L. em função da fonte de AIA no meio de cultura, na condição autoclavado.

Fonte AIA	Comprimento de Raiz
Isolado 0511	19,82 a
Isolado 6438	17,60 a
AIA comercial	6,60 b

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

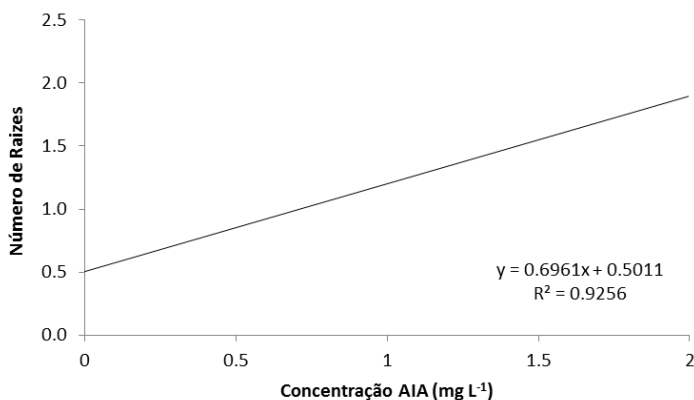
Fonte: produção do próprio autor

**Tabela 12.** Intensidade de calo em explantes de *Pyrus communis* L. em função da fonte e da concentração de AIA no meio de cultura.

Concentração AIA (mg L <sup>-1</sup> )	Fonte de AIA		
	AIA Comercial	Isolado EEL6438	Isolado EEL0511
0	0,707 bA	0,707 aA	0,707 aA
0,5	0,771 bA	0,707 aA	0,771 aA
1	0,836 bA	0,771 aA	0,771 aA
2	1,075 aA	0,707 aB	0,707 aB

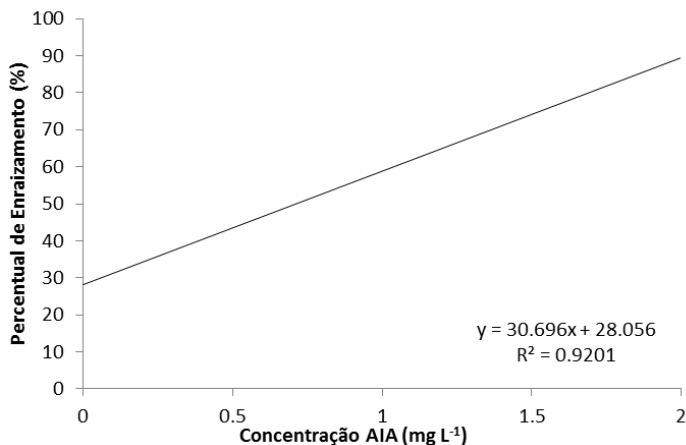
Médias seguidas da mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Fonte: produção do próprio autor



**Figura 13.** Número de raízes por explante de *Pyrus communis* L. em função da concentração de AIA no meio de cultura, na condição autoclavado.





Fonte: produção do próprio autor

**Figura 14.** Percentual de enraizamento de explantes de *Pyrus communis* L. em função da concentração de AIA no meio de cultura, na condição autoclavado.



Foto: próprio autor

**Figura 15.** Raízes adventícias formadas em explantes de *Pyrus communis* L. induzidas por 1 mg L<sup>-1</sup> de AIA comercial (A) e AIA produzido pelos isolados EEL0511 (B) e EEL6438 (C).

## 7. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NA UNIVERSIDADE DA CALIFÓRNIA – DAVIS

Este trabalho de doutorado foi realizado em conjunto com a Universidade da Califórnia, campus Davis, no Walnut Laboratory, um laboratório de cultura de tecidos que tem como enfoque principal o melhoramento genético de cultivares de noqueira e que também desenvolve trabalhos com pereira, videira e aveleira. As atividades realizadas no exterior compreenderam aprender técnicas de melhoramento genético e vegetal, visando conferir a genótipos de portaenxerto de noqueira e pereira resistência contra *Phytophthora*, nematóides, *Armillaria* e galha da coroa. Também foram aprendidas novas técnicas de cultura de tecidos envolvendo embriogênese somática, métodos modernos de enxertia em plantas micropropagadas, construção de vetores e desenvolvimento de transgênicos. Tais técnicas, utilizadas pela Universidade da Califórnia – Davis, no Brasil ainda não estão bem consolidadas, e seu aprendizado teve um grande impacto para o avanço científico do projeto.

### 7.1. CRONOGRAMA DAS ATIVIDADES EM UCDAVIS

Novembro: Avaliação de novos meios de cultura, propagação de porta enxertos de pereira e noqueira. Avaliação de amostras de frutos de noqueira obtidos através de melhoramento genético.

Dezembro: Enxertia convencional, microenxertia, testes de resistência a nematoides em porta enxertos de pereira. Avaliação de amostras de frutos de noqueira obtidos através de melhoramento genético.

Janeiro: Propagação *in vitro* de cultivares de pereira – Experimentos. Transformação genética de embriões de nogueira e videira. Participação no “Encontro Anual de Pesquisadores da UC Davis” (UC Davis Annual Research Meeting)

Fevereiro: Cruzamento dirigido de plantas de nogueira a campo. Propagação *in vitro* de cultivares de pereira – Experimentos. Transformação genética em explantes de nogueira para conferir resistência ao “cherry leaf roll vírus”.

Março: Testes de resistência para a doença Galha da Coroa, utilizando plantas transgênicas. Propagação *in vitro* de cultivares de pereira – Avaliações. Trabalho em conjunto com a USDA National Clonal Germplasm Repository.

Abril: Propagação *in vitro* de cultivares de pereira - Avaliações. Trabalho em conjunto com a USDA National Clonal Germplasm Repository.

## 7.2. ARTIGO DESENVOLVIDO NA UCDAVIS: UTILIZAÇÃO DE FeEDDHA NA ELONGAÇÃO DE EXPLANTES DO PORTAENXERTO OLD HOME X FARMINGDALE 87 (OHXF87).

### 7.2.1. Introdução

Cada vez mais há um interesse em propagar portaenxertos de *Pyrus communis* L. através da micropropagação, pois o conhecimento bem elucidado desta técnica permite o uso de ferramentas biotecnológicas para avançar o melhoramento genético destas espécies (MANGAL; SHARMA, 2010). No entanto ainda existem diversos aspectos limitantes na micropropagação de pereiras, que incluem a degeneração da cultura na fase de multiplicação, baixa

taxa de brotação e pouca alongação de explantes (JASROTIA et al., 2010). O meio de cultura tem grande interferência nos aspectos supracitados, pois ele é responsável por fornecer às plantas as substâncias necessárias para seu desenvolvimento metabólico e estrutural.

Dentre as substâncias que estão presentes no meio de cultura, o ferro é um micronutriente essencial para o crescimento e alongação das brotações, ele atua como cofator enzimático, atua no sistema de transporte de elétrons e na eficiência fotossintética das plantas (HANSEN et al., 2006). O ferro pode ser disponibilizado na cultura de tecidos na forma quelata (FeDTPA, FeEDTA, FeEDDHA e FeEDDHMA) ou inorgânica (FeSO<sub>4</sub> ou FeCl<sub>3</sub>). Nos meios de cultura mais utilizados para a cultura da pereira o ferro é disponibilizado na forma FeEDTA (MURASHIGE e SKOOG, 1962, QUOIRIN e LEPOIVRE, 1977).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a substância FeEDDHA em substituição ao FeEDTA, nos meios de cultura DKW e QL modificado (Leblay et al., 1991), visando maior alongação dos explantes.

### **7.2.2. Material e Métodos**

O experimento foi conduzido em fevereiro de 2013, no Laboratório de Melhoramento de Nozes, da Universidade da Califórnia, Davis, CA, Estados Unidos.

Para o trabalho foram testados quatro meios de cultura: DKW (DRIVER e KUNYUKI, 1984); DKW + Fe EDDHA; QL modificado (LEBLAY et al., 1991) e QL modificado + Fe EDDHA. O Fe EDDHA foi utilizado na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> em substituição ao Fe EDTA. Foram usadas como explantes partes aéreas de 'OHxF87' previamente estabelecidas *in vitro* em meio

DKW, com tamanho aproximado de 15 mm, contendo cerca de 5 gemas.

Os meios de cultura foram suplementados com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 100 mg L<sup>-1</sup> de inositol. O pH foi ajustado para 5,5 (DKW) e 5,8 (QL modificado) antes da adição de 2,2 g L<sup>-1</sup> de gelrite. Utilizaram-se tubos de ensaio, contendo 8 mL de meio de cultura. Os explantes foram mantidos sob um fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25 ± 2°C.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 12 repetições por tratamento e uma planta por tubo. Após 15 dias as variáveis analisadas comprimento de brotos e número de folhas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas por Tukey em nível de significância p<0,05, com auxílio do programa SAS 9.1.

### **7.2.3. Resultados e discussão**

As duas variáveis analisadas, comprimento de broto e número de folhas, apresentaram diferenças significativas na análise de variância. O maior comprimento médio de brotos foi observado com o meio de cultura QL modificado adicionado de FeEDDHA, com 49,38 mm. O maior número médio de folhas foi observado com os meios QL modificado + Fe EDDHA, QL modificado e DKW (Tabela 1). Os autores Garisson et al. (2013) observaram o maior comprimento de explantes de aveleira propagadas *in vitro* com FeEDDHA, onde os explantes não só apresentaram maior alongação, como maior concentração de clorofila e folhas mais largas quando comparados a explantes propagados com FeEDTA. Em explantes do portaenxerto de pessegueiro GF-677, o FeEDDHA incrementou

também a capacidade de enraizamento do portaenxerto após a utilização de FeEDDHA na multiplicação (ANTONOPOULOU et al., 2007). Os autores Christensen et al. (2008) verificaram incremento na elongação e na brotação de explantes de hibisco cultivados com FeEDDHA, e também a diminuição na vitrificação de alguns tecidos. De acordo com Pestana et al., (2003) o FeEDDHA é mais adequado para espécies frutíferas. Esta forma de ferro quelato também é mais fotoestável que o FeEDTA em uma ampla faixa de pH devido ao seu baixo potencial redox, como a absorção de ferro ocorre lentamente na superfície dos tecidos que estão em contato com o meio de cultura, ao usar uma fonte de ferro mais estável, este estará sendo disponibilizado para o explante por mais tempo evitando deficiências nutricionais que podem comprometer os estádios seguintes da micropropagação (GOMES-GALEGO et al., 2005). A figura 16 apresenta os aspectos dos explantes de OHxF87 nos diferentes tratamentos.

#### **7.2.4. Conclusões**

O meio QL modificado por Leblay et al. (1991) + Fe EDDHA incrementou a elongação dos explantes. do portaenxerto 'OHxF87' durante o estágio de multiplicação *in vitro*.

#### **7.2.5. Referências bibliográficas**

ANTONOPOULOU, C. et al., The effect of Fe-EDDHA and of ascorbic acid on *in vitro* rooting of the peach rootstock GF-677 explants. **Acta Physiol Plant.** 9:559–561. 2007

CHRISTENSEN B, SRISKANDARAJAH S, SEREK M, MULLER R. In vitro culture of *Hibiscus rosa-sinensis* L.: Influence of iron, calcium and BAP on establishment and multiplication. **Plant Cell Tiss. Org Cult** 93:151–161. 2008.

GARRISON, W., DALE, A., SAXENA, P.K. Improved shoot multiplication and development in hybrid hazelnut nodal cultures by ethylenediamine di-2-hydroxyphenylacetic acid (FeEDDHA) **Canadian Journal of Plant Science**. 93(3): 511-521, 2013.

GÓMEZ-GALLEGO M, PELLICO D, RAMÍREZ-LÓPEZ P, MANCHENÓ MJ, ROMANO S, DE LA TORRE MC, SIERRA M. Understanding of the mode of action of FeIII-EDDHA as iron chlorosis corrector based on its photochemical and redox behavior. **Chem Eur Jour** 11:5997–6005. 2005.

JASROTIA, A. KUMAR, S., MANGAL, M. Propagation. In: **The Pear: Production, Post-Harvest Management and Protection**. India, IBDC Publishers, 2010. 699p.

MANGAL, M. SHARMA, M. Applications of Biotechnology. In: **The Pear: Production, Post-Harvest Management and Protection**. India, IBDC Publishers, 2010. 699p.

PESTANA M, DE VERENNES A, ARAUJO FARIA E. Diagnosis and correction of iron chlorosis in fruit trees: a review. **Food, Agriculture and Environment**. 1 (1): 46-51. 2003.

### 7.2.6. Anexos

**Tabela 13.** Comprimento e número médio de folhas por explante do portaenxerto 'OHxF87' em função do meio de cultura utilizado.

Meio de cultura	Comprimento (mm)	Número de Folhas
QL	34,45 b	17,64 ab
QL + Eddha	49,38 a	22,42 a
DKW	33,91 b	16,13 ab
DKW + Eddha	23,27 c	13,96 b

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Fonte: produção do próprio autor

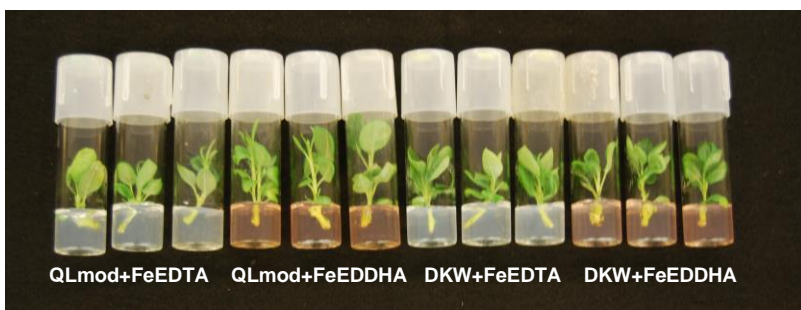


Foto: próprio autor

**Figura 16.** Explantes do portaenxerto 'OHxF87' cultivado em meio DKW e QL modificado (Leblay, 1991) com as fontes de ferro quelato FeEDTA e FeEDDHA.