

# REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE BROTAÇÕES DE PEREIRA (*Pyrus communis*), CULTIVAR 'SELETA'

REGENERATION *IN VITRO* OF PEAR TREE SHOOTS (*Pyrus communis*), 'SELETA' cv

ROCHA, Paulo S. G. da<sup>1</sup>; SCHUCH, Márcia W.<sup>2</sup>; BRAGA, Eugênia J. B.<sup>3</sup>

## RESUMO

Brotações de pereira estabelecidas no meio MS, suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> mio-inositol, 4 µM BAP e 0,025 µM ANA foram utilizadas como fonte de explantes para regeneração após trinta dias de cultivo. As brotações foram ou não pré-condicionadas em meio MS líquido durante 24h antes do isolamento das folhas, ápice caulinar e entrenó. Para regeneração, utilizou-se meio MS acrescido com 5, 10, 15, 20 e 25 µM de TDZ e 1 µM de ANA. O objetivo deste experimento foi verificar a influência do tipo de explante, meio de cultura e pré-condicionamento na regeneração de brotações de pereira cv 'Seleta'. Observou-se que, dos explantes testados, o ápice caulinar foi o melhor. A regeneração de brotações a partir de entrenó foi muito baixa e em, alguns meios, a regeneração foi nula. A folha não originou brotações. O pré-condicionamento não influenciou o aumento da regeneração de brotações. Para análise da variação somaclonal, foi utilizado tecido de folhas das brotações regeneradas, a partir de ápices caulinares com e sem pré-condicionamento, nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 µM de TDZ e do entrenó sem pré-condicionamento regenerado com 5 µM. Para a técnica RAPD, foram testados dezesseis primers e a partir destes, selecionados seis. A análise das brotações regeneradas mostrou que para os seis primers testados não ocorreu variação somaclonal.

Palavras-chave: organogênese, pêra, thidiazuron, RAPD.

## INTRODUÇÃO

A pereira cv 'Seleta' é proveniente do cruzamento 'Hood' x 'Packham's Triumph' e foi selecionada pelo IAC para substituir a pêra européia importada da Argentina (CAMPO-DALL'ORTO, 1996) e obter produção com cultivares mais adaptadas ao Brasil. A pêra é a terceira fruta mais produzida no mundo. No entanto, a produção mundial desta fruta é proveniente de apenas dez variedades (MOURGUES et al., 1996).

Uma das formas de aumentar o número de variedades de pêra existentes é através do melhoramento convencional, sendo que este requer vários anos, devido ao longo período juvenil e alto nível de heterozigose da pêra. Deste modo, a introdução de importantes características agrônômicas por meio da transformação genética poderá ser um método alternativo, rápido e sem causar um grande número de recombinações gênica (MOURGUES et al., 1996). De acordo com CABONI et al., (2000) o estabelecimento de um protocolo de regeneração é um dos pré-requisitos para programas de transformação genética.

Os explantes mais utilizados na regeneração de fruteiras lenhosas, geralmente, são folhas e entrenós (SEMEIRA et al., 1996) e em menor frequência, ápices caulinares (CABONI et al., 2000). A regeneração das brotações poderá ocorrer de

forma direta ou indireta, sendo a forma direta, sem a passagem pela fase de calo, a mais desejável quando se visa transformar geneticamente, porque proporciona menor risco de variação somaclonal.

O pré-condicionamento das brotações em meio líquido antes da retirada dos explantes pode contribuir positivamente na regeneração *in vitro* (BARTISH & KORKHOVOI, 1997). Os explantes, quando pré-condicionados em meio líquido podem eliminar inibidores e/ou introduzirem reguladores dentro da célula (SRISKANDARAJAH & GOODWIN, 1998). O objetivo deste trabalho foi testar a influência do tipo de explante, meio de cultivo e pré-condicionamento na regeneração *in vitro* de brotações de pereira.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas brotações de pereira cv. 'Seleta' estabelecidas *in vitro* em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescido com 30 g L<sup>-1</sup> sacarose; 100 mg L<sup>-1</sup> mio-inositol, 4 µM de BAP (6-Benzilaminopurina) e 0,025 µM de ANA (Ácido naftaleno acético). Antes do isolamento dos explantes (folha, ápice caulinar e entrenó), as brotações com trinta dias de cultivo *in vitro* foram ou não pré-condicionadas em meio MS líquido suplementado por 4,4 µM de TDZ e 1,0 µM de ANA (ácido naftaleno acético) durante 24 h. As folhas inteiras foram escarificadas, através de pequenos cortes na nervura principal e inoculadas com a superfície abaxial em contato com o meio. Os ápices caulinares e entrenós foram isolados das brotações com aproximadamente 3,0 mm de comprimento.

Para regeneração, utilizou-se o meio MS acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose; 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol; 5, 10, 15, 20 e 25 µM de TDZ; 1,0 de µM ANA e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH 5,8. Após a inoculação, o material foi colocado no escuro com temperatura de 25 ± 1 °C por dez dias. Após, transferiu-se para sala com 16 h de fotoperíodo e irradiância de 40 µmolm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com fatorial 5x3x2 e cinco repetições por tratamento. A unidade experimental foi um frasco com cinco explantes cada. A percentagem de regeneração, número médio de brotações por explante e comprimento médio do explante foram as variáveis analisadas aos 75 dias. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan ou analisados por regressão polinomial, com o uso do SANEST – Sistema de Análise Estatística (ZONTA & MACHADO, 1984). Os dados da percentagem de regeneração foram transformados em arco seno da raiz quadrada e número

<sup>1</sup> Engº. Agrônomo, Mestre em Fisiologia Vegetal. UFPel, Pelotas – RS. E-mail: rocha@ufpel.edu.br

<sup>2</sup> Engº. Agrônoma, Dra., Professora do Departamento de Fitotecnia, FAEM/UFPel, Pelotas – RS

<sup>3</sup> Bióloga, Dra., Professora do Instituto de Biologia e Bolsista do PRODOC/CAPES -UFPel, Pelotas – RS

(Recebido para Publicação em 31/01/2004, Aprovado em 19/07/2004)

médio de brotações por explante foram transformados em raiz quadrada de  $(x+0,5)$ .

Brotações sem pré-condicionamento, formadas a partir de ápices caulinares em meio suplementado com 5, 10, 15, 20 ou 25  $\mu\text{M}$  de TDZ, ápices pré-condicionados e regenerados nas mesmas concentrações acima e entrenó sem pré-condicionamento com 5  $\mu\text{M}$  de TDZ, tiveram o DNA extraído de 150 mg de tecido de folhas por meio do método descrito por FERREIRA & GRATTAPAG LIA (1996). As reações de PCR foram preparadas com um volume final de 25  $\mu\text{L}$  por: 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão de reação 10X (500 mM  $\text{MgCl}_2$  e 100  $\mu\text{M}$  Tris-HCl 10 mM pH 9,0) 2  $\mu\text{L}$  de dNTPs Mix (100 mM), 6  $\mu\text{L}$  de *primer*, 12,1  $\mu\text{L}$  de água ultra pura estéril, 2  $\mu\text{L}$  do DNA de amostra com concentração de 10  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ , 0,4  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase (5 U) e uma gota de óleo mineral.

A amplificação foi conduzida no termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.), iniciada em 40 ciclos repetidos de 1 minuto a 92 °C, 1 minuto a 35 °C, 2 minutos a 72 °C, seguido de 5 minutos a 72 °C. As amostras amplificadas foram visualizadas em gel de agarose a 1,2%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 é demonstrado que, dos explantes testados, o ápice caulinar foi o que apresentou maior percentagem de regeneração, nas diferentes concentrações de TDZ utilizadas. Este resultado está de acordo com CABONI et al. (2000), que obtiveram o maior percentual de regeneração a partir de ápices caulinares no estudo de regeneração da pereira e macieira.

Tabela 1 - Percentagem de regeneração de diferentes explantes de pereira cv. 'Seleta' aos 75 dias após o início do experimento. Pelotas, UFPEL, 2002.

Tipo de explante	Concentração TDZ ( $\mu\text{M}$ )				
	5	10	15	20	25
Ápice	69,21 a	85,62 a	87,00 a	82,03 a	97,42 a
Entrenó	0,25 b	0,00 b	0,00 b	1,18 b	0,25 b
Folha	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b

\*Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

Resultados semelhantes foram obtidos por ERIG (2002), que obteve regeneração de brotações de pereira cv Carrick, utilizando ápices caulinares, entrenós e folhas, sendo que, o ápice também proporcionou a maior percentagem de regeneração, este comportamento talvez esteja relacionado a dominância apical. O entrenó também resultou em capacidade regenerativa, entretanto baixos percentuais de regeneração foram alcançados e não houve regeneração em todos os tratamentos. Já HASSANEIN & SOLTAN (2000), trabalhando com *Solanum nigrum* testaram folhas, entrenó e ápices caulinares, e obtiveram a partir de entrenó a maior formação de brotações.

Dentre os explantes testados, não houve regeneração adventícia a partir de folhas, embora vários autores a tenham conseguido obtido (CHEVREAU et al., 1997). O sucesso e eficiência na regeneração dos explantes variam com o genótipo (LAIMER et al., 1988; TORNERO et al., 2000).

Vários fatores estão envolvidos na regeneração *in vitro* a partir da folha (BARTISH & KORKHOVOI, 1997). Para LAIMER et al. (1988), um dos fatores que parece ser essencial

é a idade da folha, de tal forma que é necessário um estágio mínimo de desenvolvimento para que este tipo de explante expresse a capacidade de organogênese. De acordo com CARPUTO et al. (1995), o tipo de explante ideal deve ser definido para cada genótipo em estudo, pois a folha pode apresentar bons resultados para um genótipo e em outro, não.

Pela análise de regressão para a interação meio de regeneração e tipo de explante, houve um comportamento linear crescente para o ápice, à medida que a concentração de TDZ aumentou (Figura 1).

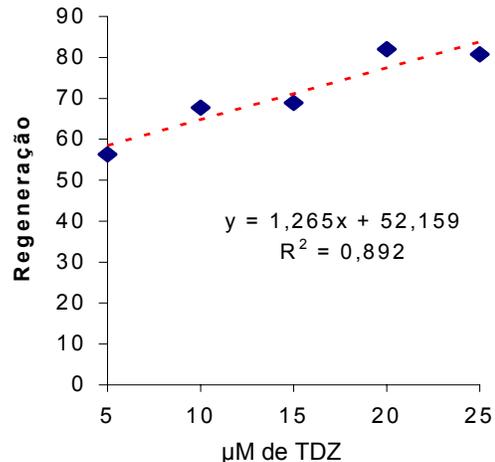


Figura 1 - Percentagem de regeneração de brotação a partir de ápice caulinar de pereira, cv. 'Seleta' em meio de regeneração acrescido com diferentes concentrações de TDZ. Pelotas, UFPEL, 2002.

Segundo YEPES & ALDWINCKLE (1994), a concentração de citocinina é um dos principais fatores que afeta a morfogênese. Em relação à melhor concentração de TDZ, foi observado que a maior percentagem de regeneração (82,03%) ocorreu com 20  $\mu\text{M}$  de TDZ. SANJUAN et al. (1991) observou em marmeleiro a maior formação de brotações com a utilização de 32  $\mu\text{M}$  de TDZ no meio de cultura.

Quanto ao número médio de brotações formadas, houve efeito significativo do tipo de explante. Conforme é exibido na Tabela 2, o ápice caulinar foi o explante que apresentou o maior número de brotações formadas. Este resultado está de acordo com CABONI et al. (2000), que obtiveram, a partir de ápice caulinar de pereira (*Pyrus communis*), o maior número de brotações quando comparado com o explante folha.

Tabela 2 - Número médio de brotações formadas a partir de diferentes explantes de pereira cv. 'Seleta', em meios de regeneração acrescido de diferentes concentrações de TDZ. Pelotas, UFPEL, 2002.

Tipo de Explante	Número médio de Brotos
Ápice	1,15 a
Entrenó	0,02 b
Folha	0,00 b

\*Medias seguida de mesma letra, nas linhas, não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

Entretanto, DANTAS (1999) observou em porta-enxertos de macieira que os entrenós formaram um maior número de gemas do que os explantes foliares. LU et al. (1990), também observaram que os entrenós originaram um maior número

médio de brotações em crisântemos do que os segmentos foliares.

Pode ser observado na Figura 2 um comportamento linear crescente no comprimento médio das brotações, à medida que ocorreu um aumento da concentração de TDZ. O maior crescimento das brotações a partir do explante ápice caulinar ocorreu com as concentrações de 20 e 25  $\mu\text{M}$  TDZ atingindo 5,0 e 4,7 mm, respectivamente. Para o entrenó a concentração de 20  $\mu\text{M}$  TDZ também permitiu o maior crescimento, sendo que de uma maneira geral o tamanho médio atingido pelas brotações regeneradas a partir deste explante foram bastante reduzidas.

ERIG (2002), utilizou três tipos de explantes (ápice caulinar, folha e entrenó) de pereira cv. Carrick, e verificou não haver diferença significativa entre o comprimento das brotações regeneradas a partir de ápice caulinar ou entrenó.

Os seis *primers* utilizados (A-07, BC-412, AC-19, AF-11, AF-13 e B-01) produziram um total de 35 fragmentos. O número de bandas formadas variou entre 4 a 11 e não indicou haver variação somaclonal (Figura 3). ERIG (2002), trabalhando com regenerantes de pereira cv. Carrick não detectou variação somaclonal, o número de fragmentos obtidos foi 66 e obteve uma média de 9,4 bandas. CABONI et al. (2000), constataram a existência de variação somaclonal em 10% das brotações regeneradas a partir de ápices de macieira e pereira através de análise RAPD utilizando vinte *primers*.

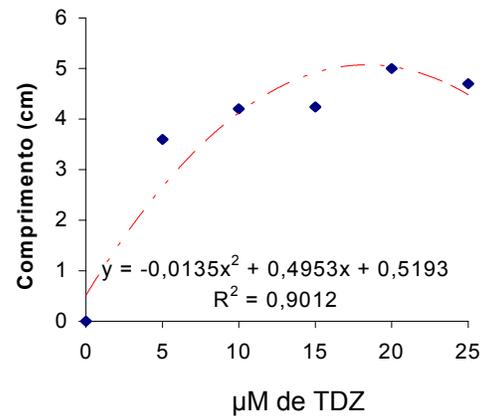


Figura 2 - Comprimento médio das brotações (cm) regeneradas a partir de ápice caulinar de pereira, cv 'Seleta' em meio de cultura acrescido com diferentes concentrações de TDZ, Pelotas, UFPEL, 2002.

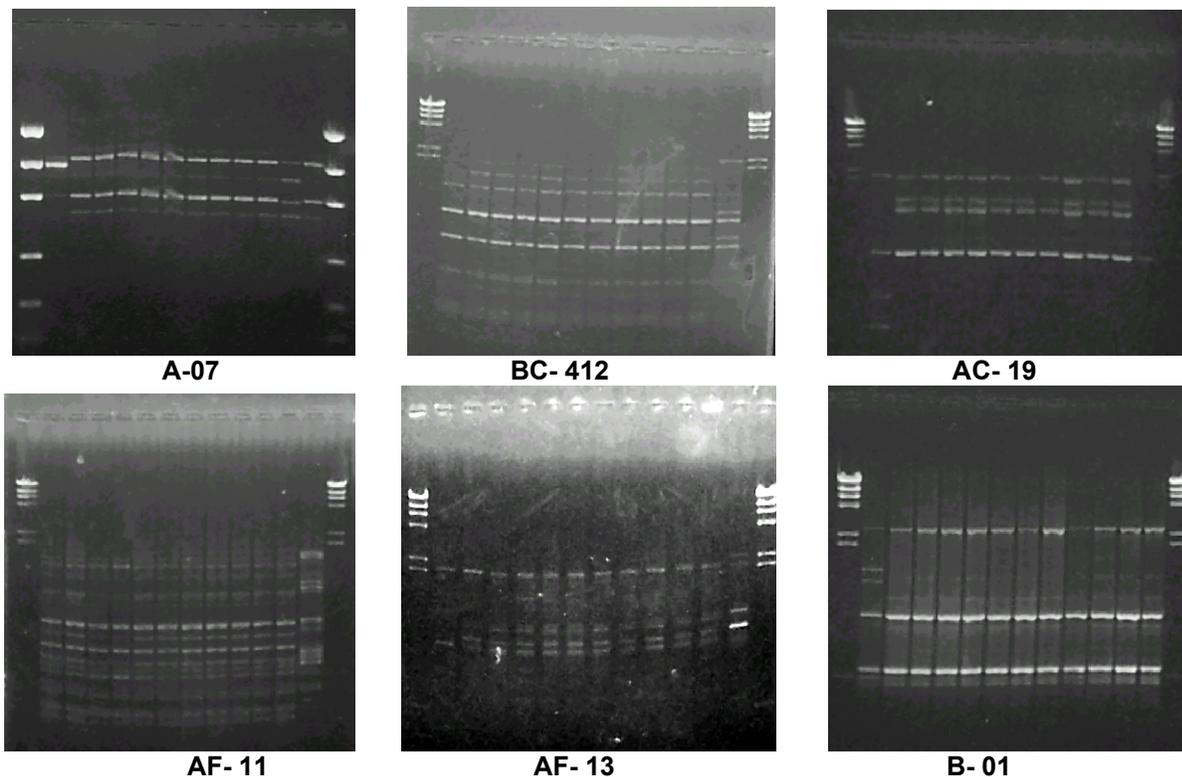


Figura 3 - Perfil RAPD das amostras de brotações regeneradas de pereira cv 'Seleta' obtido através dos *primers* utilizados. Cada *primer* obedece à seqüência direita /esquerda: Controle, ápices caulinares sem pré-condicionamento com 5, 10, 15, 20, 25  $\mu\text{M}$  de TDZ, ápices caulinares pré-condicionados e regenerados nas mesmas concentrações acima, e entrenó sem pré-condicionamento com 5  $\mu\text{M}$  de TDZ. UFPEL, 2002.

## CONCLUSÕES

Para as condições deste experimento, concluiu-se que:

- O ápice caulinar é o explante que apresenta maior capacidade regenerativa;
- O pré-condicionamento das brotações doadoras de explante não influencia a regeneração de brotos;
- As concentrações de TDZ até 25 µM não causam variação somaclonal com os *primers* testados.

## ABSTRACT

Shoots of pear tree established in MS culture medium, supplemented with 30 g L<sup>-1</sup> sucrose, 100 mg L<sup>-1</sup> myo-inositol, 4 µM BAP and 0,025 µM NAA were used as explant sources for regeneration after thirty days of cultivation. The shoots were or not pre-conditioned in liquid MS culture medium during 24h before the isolation of the leaves, caulinary tip and internode. For regeneration, it was used MS medium added with 5, 10, 15, 20 and 25 µM of TDZ and 1 µM of NAA. The objectives of this experiment was to verify the influence of the explant type, culture medium and pre-conditioning in the regeneration of shoots of pear tree cv. 'Seleta'. It was observed that the caulinary tip was the best explant. The shoot regeneration starting from internode was very low and even null in some media. The leaf did not regenerate shoots. The pre-conditioning did not influence the increase of shoot regeneration. For analysis of somaclonal variation, tissues from leaves of the regenerated shoots were used, starting from caulinary tips with and without pre-conditioning in the concentrations of 5, 10, 15, 20 and 25 µM TDZ and of the internode without regenerate pre-conditioning with 5 µM. For the RAPD technique, sixteen *primers* were tested and starting from these, selected six. The analysis of regenerated shoots showed that for the six *primers* tested somaclonal variation did not occur.

Key words: organogenesis, pear, thidiazuron, RAPD.

## REFERÊNCIAS

BARTISH, I.V.; KORKHOVOI, V.I. The composition of medium and the efficiency of shoot induction *in vitro* from apple leaf explants. **Russian Journal of Plant Physiology**, Ukraine, v.44, n.3, p.440-444, 1997.  
 CAMPO-DALL'ORTO, C.F.A.; OJIMA, M.; BARBOSA, W. et al. Variedades de pêra para o estado de São Paulo. **Boletim Técnico**, Campinas, n.164, 34p. 1996.  
 CABONI, E.; LAURI, P.; D'ANGELI, S. In vitro plant regeneration from callus of shoot apices in apple shoot culture. **Plant Cell Reports**, v.19, n. 8, p.755-760, 2000.  
 CARPUTO, D.; CARDI, T.; CHIARI, T et al. Tissue culture response in various wild and cultivated *Solanum* germplasm accessions for exploitation in potato breeding. **Plant Cell, Tissue And Organ Culture**, Hague, v. 1, p.151-158, 1995.  
 CHEVREAU, E.; MOURGUES, F.; NEVEU, M. et al. Effect of gelling agents and antibiotics on adventitious bud regeneration

from *in vitro* leaves of pear. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. França, v.33, p.173-179; 1997.

DANTAS, A.C.M. **Comparação de três porta-enxertos de macieira (*Malus* sp.) quanto à regeneração e obtenção *in vitro* de somaclones resistentes ao alumínio**. Pelotas, 1999. 101p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Fruticultura de Clima Temperado) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

ERIG, A.C. **Regeneração *in vitro* de brotações de pereira (*Pyrus communis* L.) cultivar Carrick e avaliação da fidelidade genotípica por marcadores RAPDs**. Pelotas, 2002. 59p. Dissertação (Mestrado em Fruticultura de Clima Temperado), Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAG LIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília, Embrapa – CENARGEM, 1996.220p.

HASSANEIN, A.M.; SOLTAN, D.M. *Solanum nigrum* is a model system in plant tissue and protoplast cultures. **Biologia Plantarum**, Prague, v.43, n.4, p.501-509, 2000.

LAIMER, M.; MACHADO, A.C.; HANZER, V. Regeneration of shoots from leaf discs and stem microcuttings of fruit trees as a tool for transformation. **Acta Horticulturae**, The Hague, n.235, p.85-92, 1988.

LU, C.Y.; NUGENT, G.; WARDLEY, T. Efficient direct plant regeneration from stem segments of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. Royal Purple). **Plant Cell Reports**, New York, v.8, p.733-736, 1990.

MOURGUES, F.; CHEVREAU, E.; LAMBERT, C. et al. Efficient Agrobacterium-mediated transformation and recovery of transgenic plants from pear (*Pyrus communis* L.). **Plant Cell Reports**, New York, v.16, p.245-249, 1996.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

SANJUAN, R.D.; MOK, D.W.S.; MOK, M. C. Plantlet regeneration from cultured leaves of *Cydonia oblonga* L. (quince). **Plant Cell Reports**, Corvallis, v.10, p.240-242, 1991.

SEMEIRA, L.; RUFFONI, B.; RABAG LIO, M. et al. Genetic transformation of *Eustoma grandiflorum* by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v.47, p.67-72, 1996.

SRISKANDARAJAH, S.; GOODWIN, P. Conditioning promotes regeneration and transformation in apple leaf explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 53, p.1-11, 1998.

TORNERO, P.O.; EGEA, J.; VANOOSTENDE, A. et al. Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot. **Plant Science**, Murcia, v.158, p.67-70, 2000.

YEPES, L.M.; ALDWINCKLE H.S. Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Hague, v. 37, p.257-269, 1994.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **SANEST – Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Pelotas: DMEC/IFM/UFPel, 1984. 138p.