

ESTABELECIMENTO *in vitro* DE MARMELEIRO: EFEITO DO TIPO DE EXPLANTE E TEMPO DE IMERSÃO EM HIPOCLORITO DE SÓDIO

In vitro ESTABLISHMENT OF QUINCE: EFFECT OF THE EXPLANT TYPE AND TIME OF IMMERSION IN SODIUM HYPOCHLORITE

BIANCHI, Valmor J.¹; CHAVES, Anderson da C.²; SCHUCH, Márcia W.³; FACHINELLO, José C.⁴

- NOTA TÉCNICA -

RESUMO

Ramos de marmeleiro "C" (*Cydonia oblonga* Mill.) foram submetidos a desinfestação com hipoclorito de sódio (1,5%), em quatro tempos de imersão (zero, 10, 20, 40 minutos) e posteriormente separados em dois tipos de explantes: meristemas e segmentos nodais. Para a inoculação utilizou-se meio de cultura MS, acrescido de 5,0 µM de benziladenina, 0,6 µM de ácido giberélico e 0,5 µM de ácido indol butírico. Os explantes foram mantidos no escuro, por sete dias, e posteriormente submetidos para as seguintes condições: 16 horas de fotoperíodo, radiação de 25 µmoles.m².s⁻¹ e temperatura de 25 ± 2°C. Aos 35 dias de cultivo, verificou-se que meristemas apresentaram o menor percentual de contaminação total (36,0%), proporcionando os maiores percentuais de sobrevivência de explantes (79,2% e 85,1%, com 10 e 20 minutos de imersão, respectivamente). enquanto que para segmentos nodais a contaminação total foi de 70,6%, ocorrendo sobrevivência apenas no tratamento com 10 minutos de imersão (34,5%).

Palavras-chave: *Cydonia oblonga*, micropropagação, meristema, segmento nodal.

No Brasil, *Pyrus calleryana* e *Pyrus betulaefolia* são os porta-enxertos de uso comum para pereira os quais induzem excessivo vigor na cultivar copa, tornando difícil o manejo das plantas e aumentando o período de entrada em produção. Uma alternativa é o marmeleiro "C", um porta-enxerto ananizante muito difundido na Europa e preferencialmente escolhido quando se pretende obter plantas de pequeno porte, de fácil manejo, com precocidade de produção e boa qualidade de fruta.

A micropropagação é uma técnica que permite produzir material em larga escala, em curto espaço de tempo e com valor sanitário superior, em relação ao material obtido por técnicas convencionais como estaquia e mergulhia de cepa. Porém, uma das maiores dificuldades no estabelecimento *in vitro* de espécies lenhosas está na obtenção de tecidos livres de contaminação por fungos e bactérias. O tipo e tamanho do explante e o uso de agentes germicidas (hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio), são fundamentais para a redução da contaminação dos explantes durante o estabelecimento *in vitro* (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

O objetivo deste trabalho foi testar diferentes tipos de explantes e tempos de imersão em hipoclorito de sódio para o estabelecimento *in vitro* do marmeleiro "C".

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Células e Tecidos de Plantas, Departamento de Botânica do Instituto de Biologia, da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS. Ramos de marmeleiro cv. C, com aproximadamente 15 cm, foram coletados de plantas cultivadas em viveiro e foram levados para o laboratório onde após três lavagens em água corrente realizou-se a desinfestação, em câmara de fluxo laminar, imergindo os ramos em uma solução de etanol a 70%, por 10 segundos, seguido pela imersão em hipoclorito de sódio na concentração de 1,5%, durante (zero, 10, 20, 40 minutos). Após a desinfestação, os ramos foram lavados com água estéril para posterior retirada dos explantes (meristemas e segmentos nodais) sendo colocados individualmente em tubos de ensaio, com 10 mL de meio de cultura.

O meio de cultura utilizado foi MURASHIGE & SKOOG (1962). Aos sais de macronutrientes, micronutrientes e vitaminas do meio foram adicionados 5,0 µM de benziladenina, 0,6 µM de ácido giberélico, 0,5 µM de ácido indol butírico, 100 mg.L⁻¹ mio-inositol, 30 g.L⁻¹ sacarose, sendo o pH ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar na concentração de 6,0 g.L⁻¹ e, posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 15 minutos. Após a inoculação os explantes permaneceram em câmara de crescimento na condição de escuro por sete dias (temperatura de 25±2°C), sendo então transferidos para condições de intensidade luminosa de 25 µmoles.m².s⁻¹, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25±2°C.

Para cada tempo de imersão em hipoclorito de sódio utilizou-se um total de 40 explantes (20 meristemas e 20 segmentos nodais). Durante o período de 35 dias, avaliou-se a percentagem de contaminação total e tipo de contaminação (fungo ou bactéria), a percentagem de oxidação e sobrevivência dos explantes. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com 4 repetições, sendo cada unidade experimental constituído de 5 tubos contendo um explante cada. O experimento foi um fatorial 4x2, sendo os fatores: a) tempo de imersão em hipoclorito (zero, 10, 20 ou 40 minutos) e b) tipo de explante (meristema e segmentos nodal). Realizou-se a análise de variância dos dados pela comparação de médias pelo teste de Duncan ($\alpha=0,05$), para o fator tipo de explante. Para o fator tempo de imersão após análise de variância realizou-

¹ Engº Agrº, M.Sc., Doutorando do PPGA, área de concentração em Fruticultura de Clima Temperado, FAEM-UFPel, Depart. Fitotecnia, CP. 354, 96010-900, Pelotas-RS-Brasil. E-mail: valmorjb@yahoo.com

² Engº Agrº, Mestrando do PPGA, área de concentração em Fruticultura de Clima Temperado, FAEM/UFPel.

³ Engª Agrª, Dra., Prof. Adjunto Depart. Fitotecnia, FAEM-UFPel. CP. 354, 96010-900, Pelotas-RS-Brasil.

⁴ Engº Agrº, Dr., Prof. Titular Depart. Fitotecnia, FAEM-UFPel. CP. 354, 96010-900, Pelotas-RS-Brasil.

(Recebido para publicação em 25/07/2002)

se regressão polinomial. Os dados de percentagem foram transformados para arc sen %, para a análise estatística, que foi executada pelo programa SANEST (ZONTA & MACHADO, 1984).

Aos 35 dias de cultivo *in vitro*, meristema foi o tipo de explante que apresentou os maiores percentuais de sobrevivência, 79,2% e 85,1%, quando utilizado 10 e 20 minutos de imersão em hipoclorito de sódio 1,5%, respectivamente. Enquanto que para segmentos nodais, somente com 10 minutos de imersão obteve-se explantes sobreviventes (34,5%) (Figura 1).

A percentagem de oxidação foi influenciada somente pelos tempos de imersão. Com 20 minutos o percentual estimado de oxidação foi de 16,3% (Figura 2). A contaminação observada por fungos variou somente em relação ao tipo de explante, onde meristemas apresentaram percentuais de contaminação menores (3,6%) em relação a segmentos nodais (15,9%). Este resultados já eram esperados, pois

segundo GRATTAPAGLIA & MACHADO (1998), quanto menor o tecido isolado maior é a chance de eliminação de microorganismos como fungos e bactérias. Não verificou-se interação entre fatores para a percentagem de contaminação total, porém a percentagem observada de contaminação total foi maior para segmentos nodais (70,6%) comparado a meristemas (36,0%).

O menor valor estimado de contaminação total (28,3%) ocorreu com 22 minutos de imersão e o maior valor com zero minutos de imersão (80,6%), independente do tipo de explante utilizado (Figura 3). Com 15 minutos de imersão, o valor estimado de contaminação total foi de 34,2%, este valor é significativamente inferior aos obtidos por RODRIGUES et al. (1999) nas mesmas condições de desinfestação para as cvs. de pessegueiro Capdebosca, Aldrighi e Okinawa (95,8%, 72,9% e 68,7%, respectivamente).

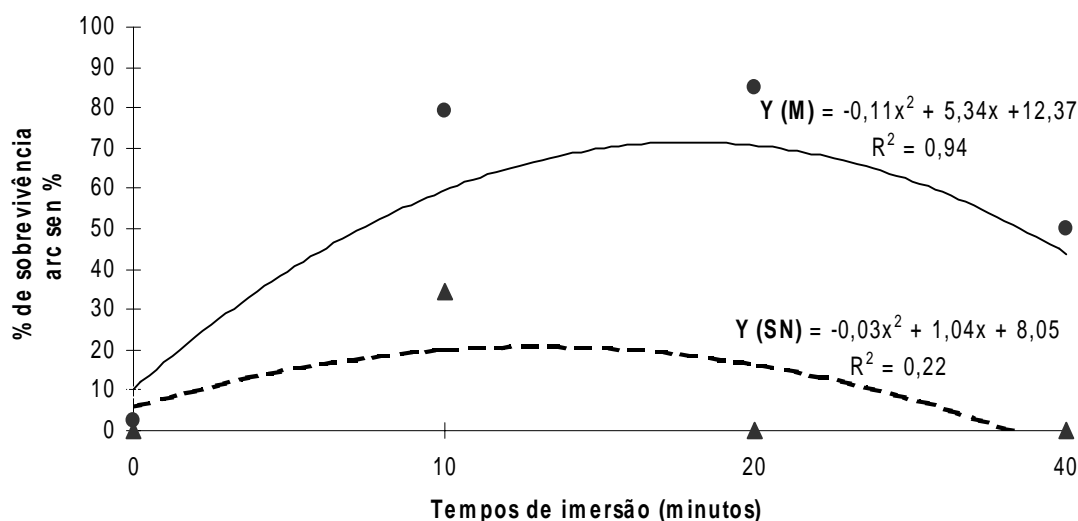


Figura 1 – Regressão polinomial para percentagem de sobrevivência de explantes de marmeleiro “C”, aos 35 dias de cultivo *in vitro*, em função do tipo de explante (M - Meristema e SN - Segmento nodal) e do tempo de imersão em hipoclorito de sódio (1,5%). Pelotas-RS. 2002.

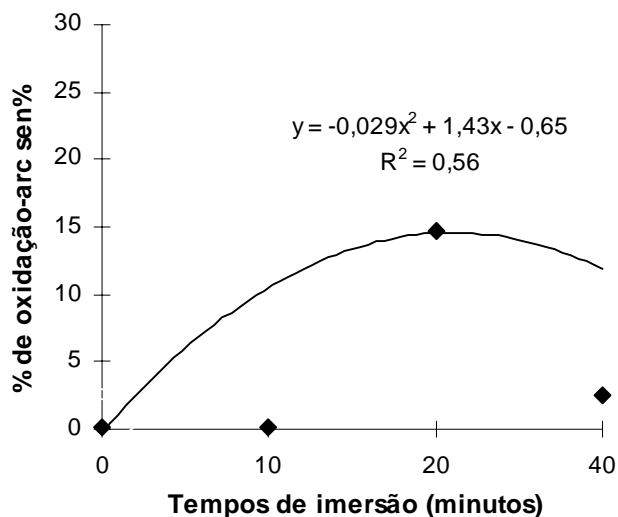


Figura 2 – Efeito do tempo de imersão em hipoclorito de sódio sobre a percentagem de explantes oxidados de marmeleiro “C”. Pelotas-RS. 2002.

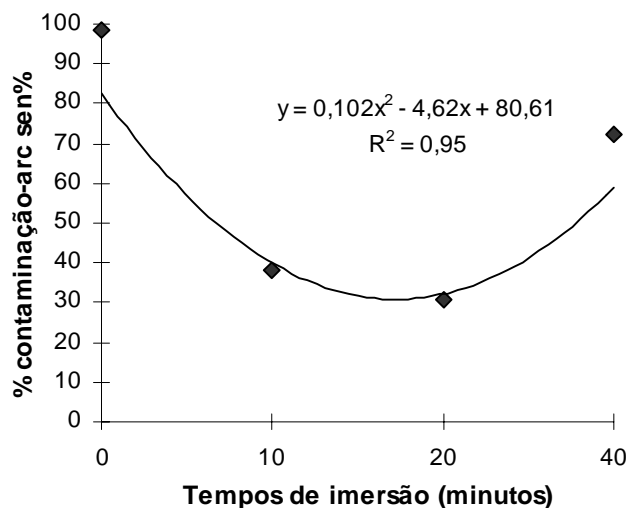


Figura 3 – Efeito do tempo de imersão em hipoclorito de sódio sobre a percentagem de contaminação total de marmeleiro “C”. Pelotas-RS. 2002.

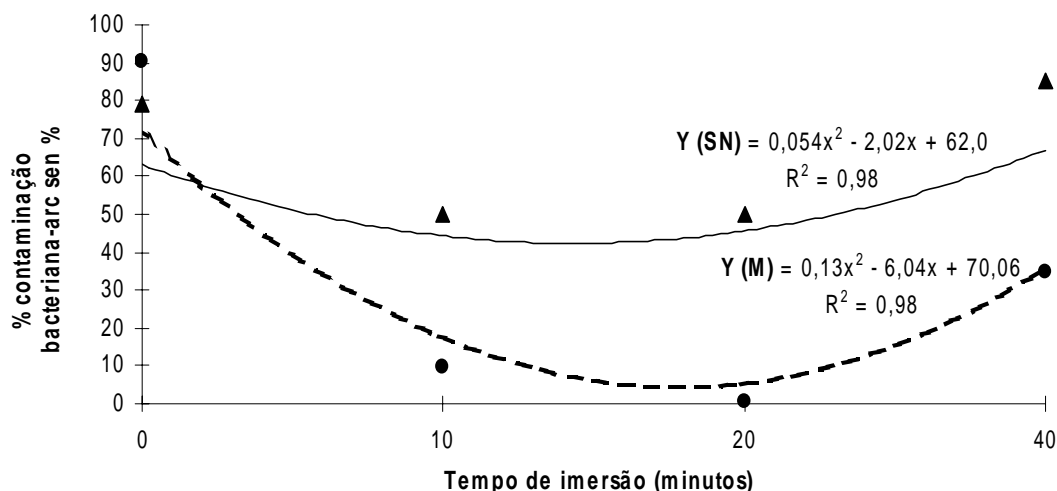


Figura 4 – Regressão polinomial para porcentagem de contaminação bacteriana em marmeleiro “C”, aos 35 dias de cultivo *in vitro*, para tipo de explante (M - Meristema e SN - Segmento nodal) e do tempo de imersão em hipoclorito de sódio (1,5%). Pelotas-RS. 2002.

A contaminação por bactérias variou significativamente em função do tipo de explante e tempos de imersão. Os valores percentuais estimados de contaminação de meristemas variaram de 1,2%, com 20 minutos de imersão, a 70,1% no tratamento testemunha (Figura 4), enquanto que para segmentos nodais, o menor percentual estimado de contaminação foi obtido com 10 e 20 minutos de imersão (47,2% e 43,2%, respectivamente). Em pereira, ERIG & FORTES (2002) registraram um total de 18,8% de contaminação bacteriana em meristemas e 45,7% em gemas, durante o estabelecimento *in vitro*, utilizando hipoclorito de sódio 2% durante 15 minutos.

Os resultados permitem concluir que para marmeleiro “C”, meristemas apresentam menor percentual de contaminação em relação a segmentos nodais e a imersão dos explantes por 10 minutos em hipoclorito de sódio (1,5%) permite obter as maiores taxas de sobrevivência.

ABSTRACT

Quince C (*Cydonia oblonga* Mill.) branches were submitted to sodium hypochlorite (1.5%) disinfection in four immersion periods (zero, 10, 20, 40 min), then separated in to two types of explants: meristems and nodal segments. An MS culture medium supplemented with 5.0 µM of benzyladenine, 0.6 µM of gibberellic acid and 0.5 µM of indol butyric acid was used for explant inoculation. The explants were maintained in the dark for seven days and later submitted to the following conditions: 16 hours of light, radiation of 25 µmoles m² s¹ and temperature of 25 ± 2°C. After 35 days of cultivation, meristems presented the smallest percentage of total contamination (36.0%) and the largest percentage of explant survival (79.2% and 85.1% with 10 and 20 minutes of immersion, respectively). The total contamination for nodal segments was 70.6%, survival in this case occurred only in the 10-minutes immersion treatment (34.5%).

Key words: *Cydonia oblonga*, micropropagation, nodal segments, meristem.

REFERÊNCIAS

- ERIG, A. C.; FORTES, G. R. L. Estabelecimento de pereira (*Pyrus* spp.) *in vitro* a partir de meristemas e gemas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.4, p.577-582, 2002.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S. **Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA CNPH, p.183-260, 1998.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v.15, p.473-497, 1962.
- RODRIGUES, A. C.; FACHINELLO, J. C.; ESTRELOW, E. et al. Estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* sp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.21, n.2, p.229-231, 1999.
- ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. SANEST – **Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Registrado na SEI – Secretaria Especial de Informática, sob n. 066,060, Categoria A. Pelotas, 1984.