

## Limpeza de Patógenos e Propagação *in vitro* de Cultivares de Pereira<sup>1</sup>

Roberto Pedroso de Oliveira<sup>2</sup>  
Antônio Fernando Pacheco Nino<sup>3</sup>  
Osmar Nickel<sup>4</sup>

A pêra é uma das frutas de clima temperado preferidas no Brasil, sendo que a maior parte da fruta consumida no País é importada. Em 2002, a produção brasileira foi de aproximadamente 20 mil toneladas, colhida em uma área de 1.879 ha, enquanto as importações chegaram a 100 mil toneladas (Beling, 2004). Conseqüentemente, a produção de pêra consiste em uma alternativa agrícola viável aos produtores de áreas da Região Sul com aptidão edafoclimática para a cultura.

A implantação de pomares com mudas de qualidade é uma etapa decisiva para o sucesso do sistema produtivo. A muda de qualidade potencializa o nível de resposta a toda tecnologia empregada no pomar, sendo um componente decisivo na redução de custos, principalmente com defensivos químicos, e para a produção de frutas com qualidade e alta produtividade. Nesse aspecto, as mudas certificadas são as únicas que oferecem garantia quanto às melhores características genéticas, fitotécnicas e fitossanitárias.

Em 1998, a Comissão Estadual de Sementes e Mudanças do Rio Grande do Sul (CESM) estabeleceu normas e padrões para a produção de mudas certificadas de pereira. Atualmente, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) está trabalhando na uniformização das normas estaduais, devendo, em breve, ser padronizada a regulamentação.

O sistema de certificação pressupõe a existência de plantas básicas, plantas matrizes e mudas certificadas (CESM, 1998). Há três anos, a Embrapa Clima Temperado vem trabalhando em parceria com a Embrapa Uva e Vinho na limpeza e propagação *in vitro* das principais cultivares de pereira, visando estabelecer plantas básicas e matrizes para dar suporte ao programa nacional de certificação.

Obrigatoriamente, as mudas certificadas de pereira devem apresentar tolerância zero para mistura varietal e plantas atípicas; para presença das bactérias *Agrobacterium tumefaciens* e *Erwinia amylovora*; dos fungos *Venturia inaequalis*,

<sup>1</sup>Trabalho financiado pelo CNPq/MAPA.

<sup>2</sup>Eng. Agrôn., Dr., Pesquisador, Embrapa Clima Temperado, Cx. Postal 403. CEP 96001-970 Pelotas-RS. Bolsista CNPq. E-mail: rpedroso@cpact.embrapa.br

<sup>3</sup>Téc. Laboratório, Embrapa Clima Temperado. Bolsista CNPq. E-mail: nino@cpact.embrapa.br

<sup>4</sup>Eng. Agrôn., PhD, Pesquisador, Embrapa Uva e Vinho, Cx. Postal 130. CEP 95700-000 Bento Gonçalves-RS. E-mail: nickel@cnpuv.embrapa.br

*Podosphaera leucotricha*, *Phytophthora* spp., *Armillaria* spp., *Pythium* sp., *Xylaria* sp., *Rosellinia necatrix* e *Sclerotium* spp.; dos nematóides *Meloidogyne* spp. e *Pratylenchus* spp.; e dos vírus da mancha clorótica foliar da macieira (ACLSV), vírus do acanelamento do tronco da macieira (ASGV) e vírus do amarelamento de nervuras da folha da pereira (PVYV) (CESM, 1998; EPPO, 2004). Os patógenos citados comprometem o pegamento das enxertias, o vigor e a longevidade das plantas, aumentam a suscetibilidade a outros patógenos e o custo de produção, reduzem a qualidade da fruta, a produtividade e, conseqüentemente, o lucro do produtor.

No estabelecimento das plantas básicas e plantas matrizes é fundamental a propagação *in vitro* a partir da cultura de meristemas, seguida da indexação, justamente para garantir a ausência de patógenos nos tecidos das plantas. Esse aspecto evidencia a importância do desenvolvimento de protocolos eficientes para a limpeza e multiplicação *in vitro* de plântulas de diferentes cultivares.

A cultura de tecidos *in vitro* apresenta as vantagens de possibilitar a rápida produção massal de plantas livres de patógenos e com uniformidade genética, em pequeno espaço físico e em curto período de tempo, atendendo às exigências das entidades certificadoras e às necessidades dos produtores por mudas de qualidade (Oliveira et al., 2000). No caso de cultivares de pereira, as principais limitações referem-se às baixas taxas de multiplicação dos explantes e à dificuldade no enraizamento das plântulas (Shen & Mullins, 1984).

O presente trabalho teve por objetivo estabelecer um protocolo eficiente para a limpeza de patógenos e para a propagação *in vitro* de cultivares de pereira.

## Metodologia

O material biológico inicial foi composto por oito plantas das cultivares William's Bon Chrétien (*Pyrus communis* L.) e Yali [*Pyrus pyrifolia* (Burm.) Nak.], com um ano de idade, cultivadas em vasos plásticos de 5 L. Essas plantas foram podadas para estimular a brotação e submetidas a tratamento térmico em câmara incubadora, à temperatura de 38°C e fotoperíodo de 16 horas, por um período de cinco semanas (Sobczykiewicz, 1979). Após esse tratamento, todas as porções terminais das brotações emitidas foram coletadas e lavadas em água corrente. Em seguida, foram desinfestadas em soluções à base

de álcool a 70%, por 15 segundos, e de hipoclorito de sódio a 1%, por 10 minutos. Finalmente, sob condições assépticas, no interior de câmara de fluxo laminar, procedeu-se a lavagem das brotações com água destilada autoclavada, por três vezes. A extração dos meristemas (0,2 a 0,4 mm) foi feita com pinça e bisturi, utilizando-se lupa estereoscópica.

O estabelecimento *in vitro* foi realizado em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP (benzilaminopurina), 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ANA (ácido naftalenoacético), 0,1 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> (ácido giberélico), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g L<sup>-1</sup> de agar, com pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem. A introdução *in vitro* dos explantes foi feita em tubos de ensaio de 15 mm de diâmetro por 150 mm de altura, contendo 6 mL de meio de cultura, sendo colocado um meristema por tubo. O cultivo foi realizado sob condições de escuro nas primeiras 48 horas e nos 38 dias restantes do subcultivo utilizando intensidade luminosa de 20 mE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, temperatura de 25 ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas.

A multiplicação *in vitro* foi realizada no meio MS suplementado com 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g L<sup>-1</sup> de agar, com pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem. Esta fase foi conduzida em frascos de 60 mm de diâmetro por 140 mm de altura, utilizando 40 mL de meio de cultura por frasco. O cultivo foi conduzido sob intensidade luminosa de 20 mE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, temperatura de 25 ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas. Utilizaram-se quatro explantes com tamanho de 4 a 6 mm, contendo de 1 a 2 gemas, por frasco. A multiplicação foi monitorada durante 12 subcultivos de 30 dias dos explantes originalmente introduzidos *in vitro*.

O enraizamento *in vitro* foi realizado em meio de cultura contendo um terço da concentração dos macro e micronutrientes do MS, as vitaminas do MS, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g L<sup>-1</sup> de agar, sendo o pH do meio de cultura ajustado para 5,8, antes da autoclavagem. O período para o enraizamento foi de 30 dias, nas mesmas condições de temperatura, fotoperíodo e intensidade luminosa da fase de multiplicação.

Em seguida, as plântulas foram removidas dos frascos, lavadas e, cuidadosamente, separadas umas das outras. Foram classificadas por tamanho e transplantadas em bandejas de isopor de 72 células contendo substrato esterilizado à base de terra vegetal, esterco e vermiculita, na proporção 4:2:1.

As matrizes em formação foram dispostas sob túnel plástico, com controle da luminosidade, irrigação e

temperatura (20-28°C), simulando a condição do laboratório. Em seguida, procedeu-se a remoção gradual do plástico.

A irrigação foi realizada diariamente, em função da necessidade das plantas. Estas foram adubadas semanalmente, com solução nutritiva composta por nitrogênio, fósforo e potássio (Fórmula 10:10:10), sendo monitorada a ocorrência de plantas atípicas.

## Resultados e discussão

As plantas submetidas ao tratamento térmico produziram brotações medianamente vigorosas e estioladas, adequadas para a extração dos meristemas sem viroses (Sobczykiewicz, 1979). No entanto, 25% das plantas de pereira das cultivares William's Bon Chrétien e Yali morreram em função do tratamento térmico realizado. Esse problema pode ser minimizado com o uso de plantas maiores e melhor estabelecidas.

A porcentagem de contaminação dos meristemas foi de apenas 3% durante a fase de estabelecimento *in vitro*, sendo causada, principalmente, por bactérias. Este resultado demonstra a eficiência do sistema de desinfestação utilizado.

Independentemente da cultivar, houve desenvolvimento de 80% dos meristemas. Após 40 dias, estes apresentaram tamanho médio de 3 mm, sendo transferidos inteiros para o meio de multiplicação.

A taxa média de multiplicação dos explantes ao longo dos 12 subcultivos foi de 3,1 para a cultivar William's Bon Chrétien e de 3,2 para a cultivar Yali. Estes valores são bastante satisfatórios, considerando o baixo potencial de multiplicação das cultivares de pereira, normalmente entre 1 e 5 (Shen & Mullins, 1984). Kadota & Niimi (2003) obtiveram taxa média de multiplicação semelhante por subcultivo (3,1) para as cultivares Housui e Kousui, após otimizar o sistema. Na literatura, existem relatos de taxas de multiplicação superiores às obtidas no presente trabalho, como, por exemplo, 4,5 brotos por explante por subcultivo (Mello-Farias et al., 1996). Porém, nesses trabalhos foram utilizadas concentrações superiores de BAP no meio de cultura, as quais, geralmente, comprometem o alongamento e o enraizamento posterior das plântulas (Predieri & Govoni, 1998).

De uma forma geral, as taxas de multiplicação das cultivares de pereira são baixas ao serem comparadas com as obtidas em cultivares de outras fruteiras, como morango e amora-preta, que chegam a produzir

de duas a três vezes mais plântulas por subcultivo (Brahm & Oliveira, 2004; Oliveira et al., 2004). Por isso, o menor interesse na micropropagação comercial de mudas de pereira.

As plântulas propagadas *in vitro* das cultivares Yali e William's Bon Chrétien apresentaram-se adequadamente alongadas, com altura maior do que 30 mm, e enraizadas, com raízes curtas e abundantes, o que são características morfológicas essenciais para o adequado enraizamento.

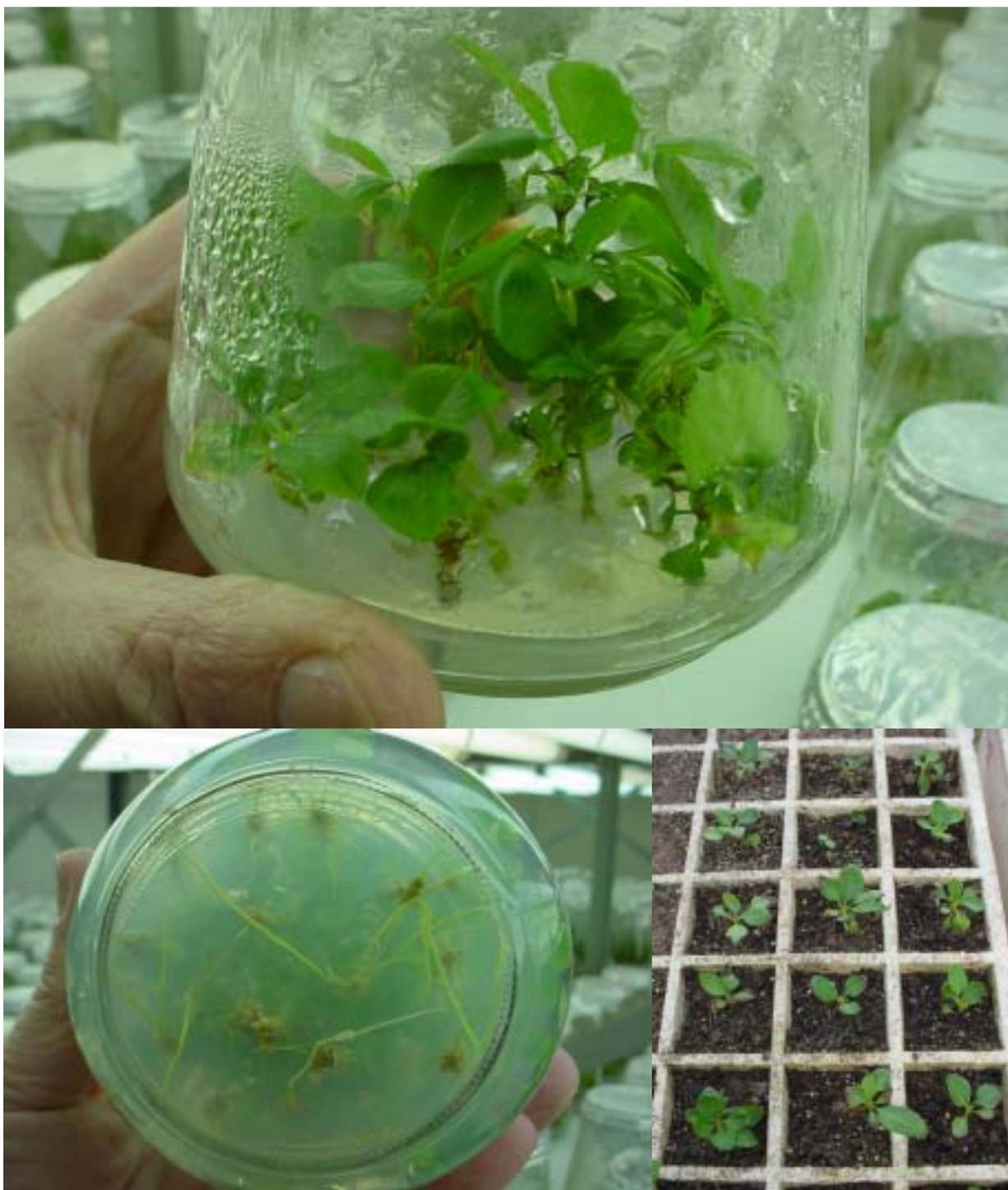
A eficiência do enraizamento *in vitro* no meio e condições de cultura propostos foi de 60% para a 'Yali' e de 50% para a 'William's Bon Chrétien'. Mello-Farias et al. (1996) também obtiveram 50% de eficiência de enraizamento ao trabalharem com outras cultivares, sendo considerada uma porcentagem satisfatória para pereira, embora existam relatos de até 69% (Shibli et al., 1997) e de 75% (Rossi et al., 1991) de plantas enraizadas. Estas diferenças ocorrem principalmente pelo fato das cultivares copa serem mais difíceis de enraizar do que as de porta-enxerto (Bhojwani et al., 1984).

Durante a cultura de tecidos não foram detectadas plântulas com sintomas de oxidação e de vitrificação, demonstrando adequação do sistema proposto.

O pegamento médio das plântulas transplantadas, em bandejas de isopor, em casa-de-vegetação, foi de 60%. Pequenos ajustes no sistema de manejo recomendado podem proporcionar valores próximos a 95%, conforme obtido por Shibli et al. (1997).

Em casa-de-vegetação, não foram observadas plantas com características morfológicas que não fossem próprias das cultivares. O fato do sistema de propagação proposto não passar pela fase de calo, utilizar baixas doses de reguladores de crescimento e número reduzido de subcultivos, contribui para a minimização do surgimento de variantes somaclonais (Swartz et al., 1981). Evidentemente, a ausência de plantas atípicas deve ser confirmada à campo.

Por meio deste trabalho, verificou-se que as plântulas das cultivares de pereira estudadas entram precocemente na fase de multiplicação, em 30 dias, e apresentam taxa média de multiplicação satisfatória, de 3,1 a 3,2. Como podem ser propagadas *in vitro* por até dois anos (EPPO, 2004), o método apresentado pode ser uma alternativa viável para a micropropagação comercial, além de ser utilizado para a produção de plantas básicas e matrizes, conforme recomendado nesta publicação (Fig. 1).



Fotos: Roberto Pedro so de Oliveira

**Figura 1.** Fases da micropropagação de cultivares de pereira: multiplicação, enraizamento e aclimatização.

## Considerações finais

Por meio do protocolo apresentado, pode-se obter plantas básicas e matrizes uniformes, em larga escala, em qualquer época do ano, em pequeno espaço físico e curto período de tempo, atendendo às exigências das entidades certificadoras e as necessidades dos produtores por mudas de qualidade. Além disso, o protocolo pode ser utilizado na produção de mudas após estudo de sua viabilidade econômica.

Atualmente, a eficiência do protocolo apresentado está sendo avaliada para a multiplicação das cultivares de pereira Abate Fetel, Housui, Kousui, Packham's Triumph, Max Red Bartlett e Nijisseiki.

Paralelamente, a indexação das plantas micropropagadas está sendo conduzida na Embrapa Uva e Vinho, utilizando-se métodos biológicos, serológicos e/ou moleculares, a depender do patógeno, para confirmar a eficiência do método de limpeza.

Na Embrapa Uva e Vinho também estão sendo estabelecidas as plantas básicas e matrizes das cultivares de pereira, sob condições de ambiente protegido, para dar suporte ao programa nacional de certificação.

## Agradecimentos

Ao Dr. Darcy Camelatto, pesquisador da Embrapa Clima Temperado, pelas informações sobre as características fitotécnicas das cultivares de pereira.

## Referências bibliográficas

- BELING, R.R. O desempenho dos pomares brasileiros. **Anuário brasileiro da fruticultura 2004**, Santa Cruz do Sul, p.8-10, 2004.
- BHOJWANI, S.S.; MULLINS, K.; COHEN, D. *In vitro* propagation of *Pyrus pyrifolia*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 23, p. 247-254, 1984.
- BRAHM, R.U.; OLIVEIRA, R.P. Potencial de multiplicação *in vitro* de cultivares de morangueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, 2004. No prelo.
- COMISSÃO ESTADUAL DE SEMENTES E MUDAS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL. **Normas e padrões de produção de mudas de fruteiras para o Estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, 1998. 100 p.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization. **Certification schemes**; pathogen-tested material of *Malus*, *Pyrus* e *Cydonia*. Paris, 2004. 12 p.
- KADOTA, M.; NIIMI, Y. Effects of cytokinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity in *in vitro* pear cultivar shoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 72, p. 261-265, 2003.
- MELLO-FARIAS, P.C.; PETERS, J.A.; NAKASU, B.H. Micropropagação de porta-enxerto de pereira, 'Old Home' x 'Farmingdale' 9. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 2, n. 2, p. 71-78, 1996.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- OLIVEIRA, R.P.; GOMES, T.S.; VILARINHOS, A.D. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedade de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 12, p. 2329-2334, 2000.
- OLIVEIRA, R.P.; NINO, A.F.P.; SILVA, F.O.X. **Produção de mudas de amora-preta por meio de cultura de tecidos**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. (Embrapa Clima Temperado. Sistema de produção). No prelo.
- PREDIERI, S.; GOVONI, M. *In vitro* propagation of compact pear clones. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 475, p. 127-134, 1998.
- ROSSI, V.; PAOLI, G.D.; POZZ, P.D. Propagation of *Pyrus calleryana* Sel. D6 by *in vitro* culture. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 300, p. 145-148, 1991.
- SHEN, X.S.; MULLINS, M.G. Propagation *in vitro* of pear, *Pyrus communis* L. cultivars 'William's Bon Chrétien', 'Packam's Triumph' and 'Beurre Bosc'. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 23, p. 51-57, 1984.
- SHIBLI, R.A.; AJLOUNI, M.M.; JARADAT, A.; ALJANABI, S.; SHATNAWI, M. Micropropagation in wild pear (*Pyrus syrica*). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 68, p. 237-242, 1997.
- SOBCYKIEWICZ, D. Heat treatment and meristem culture for the production of virus-free strawberry plants. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 95, p. 79-82, 1979.
- SWARTZ, H.J.; GALLETTA, G.J.; ZIMMERMANN, R.H. Phenotypic stability and field performance of tissue culture propagated thornless blackberry. **Hort. Science**, Alexandria, v. 16, n. 3, p. 418, 1981.

### Comunicado Técnico, 105



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Clima Temperado**  
 Endereço: Caixa Postal 403  
 Fone/fax: (53) 275 8199  
 E-mail: sac@cpact.embrapa.br

1ª edição  
 1ª impressão 2004: 80 exemplares

### Comitê de publicações

Presidente: Walkyria Bueno Scivittaro  
 Secretário-Executivo: Joseane M. Lopes Garcia  
 Membros: Cláudio Alberto Souza da Silva, Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro, Isabel Helena Vernetti Azambuja, Cláudio José da Silva Freire, Luis Antônio Suíta de Castro. **Suplentes:** Daniela Lopes Leite e Luis Eduardo Corrêa Antunes  
 Revisão de texto: Sadi Sapper / Ana Luíza Barragana Viegas

### Expediente

Normalização bibliográfica: Regina das Graças Vasconcelos dos Santos  
 Editoração eletrônica: Oscar Castro