

ACLIMATAÇÃO *EX VITRO* DE PEREIRA (*PYRUS COMMUNIS* L.) MICROPROPAGADA.

ESTUDO DE SUBSTRATOS

Susana Lucas¹, José Grego¹, Maria Fernanda Rebelo¹, Maria de Fátima Lopes¹, António Marques¹, Ana Figueiredo² & Maria Helena Trindade²

¹Escola Superior Agrária de Santarém. Departamento de Ciências Agrárias e Ambiente – Unidade Laboratorial.

²Departamento de Biologia Vegetal da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa.

RESUMO

A pereira (*Pyrus communis* L.) é uma espécie frutícola de elevada importância na fruticultura Portuguesa. A produção nacional em 2005-6 foi de 129 mil toneladas para uma área cultivada de 12 mil hectares. Em 2010-11 a produção ascendeu às 220 mil toneladas. A cultivar “Rocha” é das mais importantes em termos de exportação com um volume de vendas em 2005 de 26 milhões de euros para 45 mil toneladas de pêra correspondente a 35 % da produção total. O presente estudo avaliou uma cultivar de pereira proveniente de uma “semente do acaso” originada numa quinta em Tábua, Distrito de Coimbra, Portugal entre 1990 e 2000. Foi testado o efeito do uso de diferentes substratos na aclimação *ex vitro* de plantas micropropagadas. Usaram-se três tipos de substratos: substrato orgânico (SO); SO + perlite (½ + ½, v/v) e perlite.

Fez-se a análise do desenvolvimento radicular e da parte aérea: número e comprimento das raízes; peso fresco e seco das raízes e parte aérea. Em todos os tratamentos obtiveram-se 100% de plantas aclimatadas. Os tratamentos com substrato orgânico e mistura SO + perlite deram origem a plantas mais vigorosas em termos de peso fresco das raízes e parte aérea.

Palavras-chave: Juvenil, pereira, parte aérea, peso fresco e seco.

ABSTRACT

The common pear (*Pyrus communis* L.) is one of the most widely cultivated fruit crop in Portugal. The national production in 2005 was 129 thousand tons, to a cultivated area of 12 thousand ha. “Rocha” is the economically most important Portuguese cultivar accounting for 75% of pear production in Portugal, in 2005. Total exports amounted to 26 million euro, corresponding to approximately 45 thousand tons. This study was conducted with a pear-chance seedling originated on a farm located at Tábua, central Portugal, between 1999 and 2000. The main aim of the study was to determine the effects of three substrates: organic compost (SO); perlite + SO ($\frac{1}{2} + \frac{1}{2}$, v/v) and perlite on the *ex vitro* survival and development (roots and leaflets) of pear plantlets. All the treatments had a 100 % survival rate, and the highest *ex vitro* development was observed on SO and perlite + SO.

Keywords: Young pear, top plant, fresh and dry weight.

INTRODUÇÃO

A pereira (*Pyrus communis* L.) é uma espécie frutícola de elevada importância na fruticultura Portuguesa. A produção nacional em 2005-6 foi de 129 mil toneladas para uma área cultivada de 12 mil hectares (MADRP, s.d.). Em 2010-11 a produção ascendeu às 220 mil toneladas (Associação Nacional de Produtores de Pêra Rocha, comunicação verbal). A cultivar “Rocha” é das mais importantes em termos de exportação com um volume de vendas em 2005 de 26 milhões de euros para 45 mil toneladas de pêra correspondente a 35 % da produção total nacional (MADRP, s.d.). Acresce a importância alimentar da pêra, fruto com elevadas concentrações de antioxidantes (compostos fenólicos e vitamina C), em particular na epiderme onde as concentrações são muito superiores às da parte carnuda do fruto (Sánchez, *et al.*, 2003). As dietas ricas em frutas e hortícolas de elevados teores em antioxidantes, em particular os flavonóides, tem efeitos benéficos na prevenção do cancro, doenças cardiovasculares (Mariappan *et al.*, 2006), doenças Alzheimer e Parkinson (Kaur and Geetha, 2006). As peras vermelhas e verdes apresentam maiores teores de antioxidantes (Sánchez, *et al.*, 2003).

O presente estudo avalia a aclimação *ex vitro* de uma cultivar de pereira de frutos vermelhos proveniente de uma “semente do acaso” originada numa quinta em Tábua (Sociedade Agrícola Quinta Picos do Couto, Lda.), Concelho de Tábua, Distrito de Coimbra, Portugal entre 1990 e 2000. Foi testado o efeito do uso de diferentes substratos na aclimação *ex vitro* de plantas micropropagadas. Thakura e Kanwar, (2008) usaram uma mistura de areia e terra (2:1 v/v) na aclimação *ex vitro* de *Pyrus pyrifolia* (Burm F.) Nakai, tendo obtido uma percentagem de sobrevivência de 52 %.

MATERIAIS E MÉTODOS

As plantas para o estudo foram produzidas em laboratório (*in vitro*) num processo que decorreu em três fases. Primeiro foi regenerada uma planta juvenil a partir de um tecido caulinar apical. A planta juvenil regenerada foi, em seguida, submetida a um processo de proliferação *in vitro*: meio ½ MS (Murashige and Skoog, 1962); 3 % de sacarose; 0,8 % agar; 2,2 µM BAP + 0,5 µM IBA; fotoperíodo 16 h luz e repicagens de 4 em 4 semanas. Por último, procedeu-se ao enraizamento *in vitro*: meio ½ MS; 2 % sacarose; 0,8 % agar; sem hormonas. As plantas juvenis foram colocadas a enraizar após imersão numa solução contendo 1 mM IBA durante 1 a 2 segundos, incubadas durante 5 dias na escuridão e em seguida transferidas para a luz.

A aclimação fez-se em estufa de vidro com refrigeração por ventilação dinâmica de painel húmido e bancada aquecida a 25º C (temperatura constante) e sistema de pulverização de água na bancada de modo a permitir um humedecimento constante das plantas. Para inibir a dormência de Inverno e a consequente abscisão foliar, as plantas juvenis foram sujeitas a um fotoperíodo de dias longos, 16 horas de luz, com recurso a ampliação de período de iluminação natural usando lâmpadas de sódio pressurizado (400 W – SON/T) com uma irradiância de 2000 mW.m⁻² (N.V.Philips’Gloeilampenfabrieken, 1977).

Usaram-se três tipos de substrato: substrato orgânico (SO) (mistura: turfa clara + turfa negra, fertilizadas); mistura SO + perlite (½ + ½ , v/v) e perlite (estreme).

A avaliação química do substrato “SO” foi feita por extracção aquosa [Grego e Rebelo (2011), método Sonneveld and Voogt (2009) modificado] e por cloreto de cálcio + DTPA (extracção CAT), [Grego e Rebelo, 2011, método CEN/TL 223 modificado (CEN, 2007)]. Usou-se a extracção aquosa para: NO₃; P; K; Ca; Mg e Na. Para os

micronutrientes Fe, Mn, Zn e Cu, usou-se a extracção CAT (Sonneveld and Voogt, 2009).

A – Extracção aquosa – modo operativo. Colocou-se substrato numa forma tronco-cilíndrica metálica com 11,3 e 5,3 cm (altura e diâmetro, respectivamente) e compactou-se a 10 kPa. Retirou-se uma porção de 100 ml e fez-se a extracção com água destilada em frasco de plástico na relação de 1:1½ (v/v). Agitou-se durante uma hora a seguir filtrou-se com papel de filtro, de filtração rápida e qualitativa. No filtrado procedeu-se às leituras de pH, C.E. (mS.cm^{-1}) e azoto nítrico ($\text{mg NO}_3\text{.L}^{-1}$).

A leitura de pH foi feita por electrometria e o doseamento por eléctrodo combinado de prata/cloreto de prata. A condutividade eléctrica (C.E.) foi feita por electrometria e o doseamento por sonda de condutividade. A determinação do NO_3 efectuou-se por método electrométrico, com utilização de eléctrodo selectivo do ião NO_3 . Procedeu-se ao traçado da curva padrão em “Microsoft Excel” com as concentrações de 6200, 62, 6,2 e 0,62 mg.L^{-1} em solução aquosa, registando-se em abcissas as concentrações de NO_3 (escala logarítmica) e em ordenadas (escala linear) os valores das leituras potenciométricas (mV). A força iónica é corrigida pela adição de solução ISA (Ionen-Starke-Adjustierlösung).

B – Extracção por cloreto de cálcio (CaCl_2) + DTPA (Extracção CAT) - modo operativo. Colocou-se o substrato em forma tronco-cilíndrica com 11,3 e 5,3 cm (altura e diâmetro, respectivamente) e compactou-se a 0,9 kPa. Retirou-se um volume de 50 ml e fez-se a extracção em frasco de plástico com o extractante: CaCl_2 ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ + DTPA a $0,002 \text{ mol.L}^{-1}$, na relação 1: 5 (v/v). Agitou-se durante uma hora e a seguir filtrou-se com papel de filtração rápida e qualitativa.

Filtraram-se novamente os extractos (A e B) com papel de filtro quantitativo e de filtração lenta, retirou-se uma aliquota de extracto para balão de 25 ml e fizeram-se as leituras de acordo com as rectas de calibração, para os elementos a determinar: Ca, Mg, K, Na, Cu, Fe, Zn, Mn e P. A partir das soluções padrão a 100 mg.L^{-1} de Ca, Mg, K, Na, Cu, Fe, Zn e Mn, procedeu-se às respectivas diluições, em *matriz aquosa ou cloreto de cálcio (CaCl_2) + DTPA* e adicionou-se um inibidor de interferências. As concentrações dos padrões para execução das respectivas curvas de calibração foram: Ca – 0; 5; 10 e 15 mg.L^{-1} ; Mg – 0; 0,5; 1,0; e 1,5 mg.L^{-1} ; K – 0; 2; 4 e 6 mg.L^{-1} ; Na – 0; 1; 2 e 3 mg.L^{-1} ; Cu

– 0; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 15,0 mg.L⁻¹; Fe – 0,0; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 15 mg.L⁻¹; Zn – 0,0; 0,2; 0,5; 0,75; 1,0; 2,0 e 3,0 mg.L⁻¹; Mn – 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 6,0 e 9 mg.L⁻¹.

Doseamento das concentrações por espectrofotometria de absorção atômica.

Na matriz aquosa procedeu-se à determinação de P, por espectrofotometria de absorção molecular, de visível, tendo por base uma curva de calibração com as concentrações de 0, 20, 40, 80, 120, 160, 200 mg.L⁻¹ de P. Procedeu-se à diluição do extracto aquoso, de modo a obter leituras dentro do intervalo da concentração dos padrões e utilizou-se uma solução de molibdato de amónio/ácido ascórbico para desenvolvimento da cor.

As concentrações dos sais nas soluções extractantes foram convertidas em concentrações de sais na solução do substrato (concentrações de sais na fase aquosa do substrato) à capacidade de retenção para a água. Aquela representação oferece a vantagem de se poder comparar a composição química da solução do substrato e a composição das soluções nutritivas que possam ser aplicadas em fertirrega nos substratos.

A conversão é feita utilizando a expressão de Dartigues (1980):

$$CSS = (1,27 + da^2) + [CSV]$$

Em que: CSS – Concentração de sais na solução do substrato. da – densidade aparente do substrato. CSV – Concentração de sais por unidade de volume de substrato. Para a determinação da salinidade total a partir da C.E considerou-se um valor ponderal médio de 1 mS.cm⁻¹ = 0,8 g de sais dissolvidos por litro.

Análise Estatística. Fez-se a análise estatística para o desenvolvimento radicular e a parte aérea: número e comprimento máximo das raízes; peso fresco e seco das raízes e parte aérea (folhas e caules). Os dados foram tratados usando a aplicação “PASW Statistics” (SPSS, 2009). Para testar a normalidade da distribuição das variáveis utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk e para testar a homogeneidade das variâncias o teste de Levene (Marôco, 2010). Os resultados obtidos permitiram utilizar técnicas de inferência estatística paramétrica. A comparação de médias para as

populações/substratos em estudo fez-se por análise de variâncias (ANOVA) (Fisher, 1936). Calculou-se a probabilidade de significância (valor-p) para a estatística de teste e considerou-se um nível de significância $\alpha = 0,05$. Regra de decisão: rejeitar H_0 se, ao nível de significância α , $F \geq f_{1-\alpha; (K-1, N-K)}$ i.e. rejeitar H_0 se valor - $p \leq \alpha$. Para as médias significativamente diferentes comparou-se K médias, duas a duas, i.e. fez-se uma comparação múltipla de médias usando o “teste *post-hoc*” Tukey. As diferenças significativas para um intervalo de confiança de 95% estão marcadas com letras diferentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise ao substrato SO determinou: pH – 5,6; CE – 1,58 mS.cm⁻¹; Salinidade total – 3,49 g.L⁻¹; NO₃ – 33,9; HPO₄ – 178,3; K – 9,2; Ca – 35,4; Mg – 24,8; Na – 5,5 meq.L⁻¹; Fe – 80,9; Mn – 18,5; Zn – 6,9 e Cu – 0,03 mg.L⁻¹. Os valores de pH, C.E. e concentração iônica não indiciaram fitotoxicidade do substrato. Todos aos tratamentos originaram 100% de plantas aclimatadas, muito acima do referido por Thakura e Kanwar, (2008), que todavia ensaiarem uma espécie diferente. Os substratos utilizados não produziram efeitos significativos sobre o número e comprimento máximo das raízes (Fig. 1). Os substratos geraram pesos frescos de raízes e parte aérea com diferenças significativas ($p = 0,014$ e $0,000$, respectivamente). Os substratos SO e SO + perlite deram origem a maior peso fresco de raízes e SO a maior peso de parte aérea. Não existiram diferenças significativas para os pesos secos (Fig. 2).

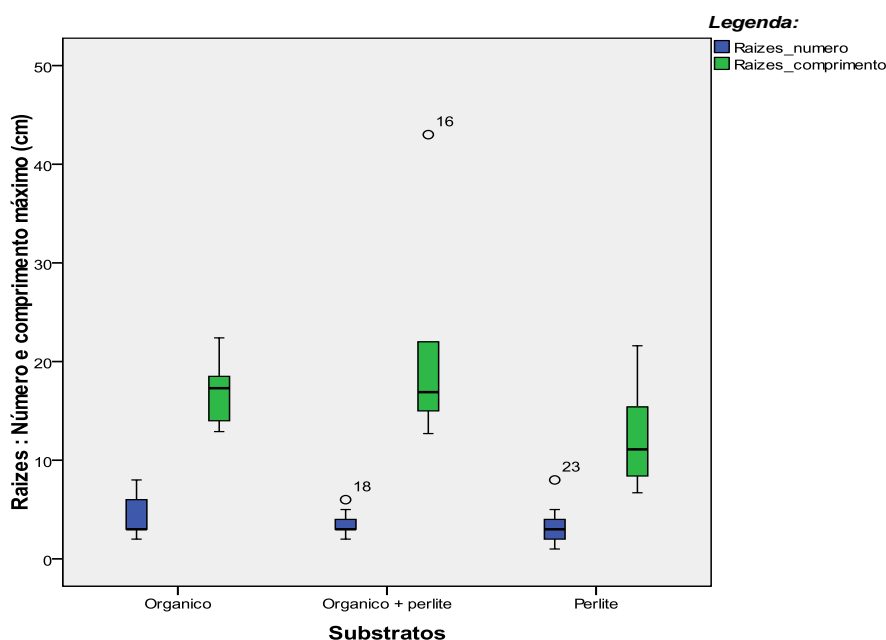


Fig.1. Distribuições do número e comprimento máximo (cm) das raízes com os 3 tratamentos. A linha a negrito representa a mediana enquadrada entre o 1º Quartil (extremo inferior da caixa) e o 3º Quartil (extremo superior da caixa). As barras inferiores e superiores representam, respectivamente o mínimo e o máximo das distribuições.

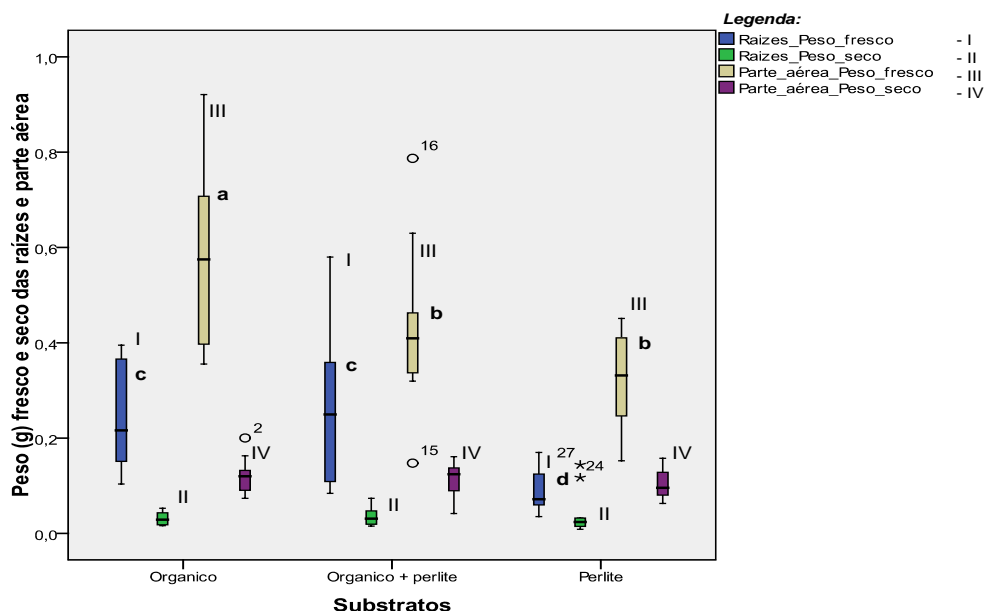


Fig.2. Distribuições do peso fresco e seco das raízes e parte aérea com os 3 tratamentos. Distribuições com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste HSD de Tukey seguido das comparações múltiplas de médias para $\alpha = 0,05$.

CONCLUSÕES

As condições de aclimação permitiram uma boa transferência para condições *ex vitro*. As melhores taxas de crescimento em meio orgânico poderão ser atribuídas ao equilíbrio químico favorável do substrato (SO). Contudo, é conveniente estabelecer estudos comparativos de novos equilíbrios, dada a insuficiente informação técnica disponível, no âmbito da aclimação *ex vitro* de fruteiras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CEN, 2007. European Committee for Standardisation CEN/TC 223. Soil improvers and growing media – Sample preparation for chemical and physical tests, determination of dry matter content, moisture content and laboratory compacted bulk density. EN 13040.
- Dartigues A., 1980. Salinité des substrates horticoles: essais d'harmonization des diferentes modes d'expression des resultats analytiques. *C.R. Acad. Agric. Fr.*, 66, 14, 1256-1269.
- Fisher, R.A., 1963. Statistical methods for research workers. 6 th – revised and enlarged. Oliver and Boyd, Edinburgh, London.
- Grego, J.A.B. e M. F. Rebelo, 2011. Protocolo – Avaliação das características químicas das soluções de substratos por extracção aquosa e cloreto de cálcio + DTPA.

Protocolo das aulas práticas da unidade curricular – Horticultura Especial. Instituto Politécnico de Santarém – Escola Superior Agrária de Santarém. Santarém (mimeografado).

Kaur, I.P. and T. Geetha, 2006. Screening methods for antioxidants. A review. *Mini-Reviews in medicinal Chemistry* 6, 305-312.

MADRP, s.d. Anuário vegetal 2006. Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Gabinete de Planeamento e Políticas. Ed. Castel – Publicações e Edições, S.A., Lisboa.

Mariappan D., J. Winkler, V. Parthiban, M.X. Doss, J. Hescheler and A. Sachinidis, 2006. Dietary small molecules and large-scale gene expression studies: an experimental approach for understanding their beneficial effects on the development of malignant and non-malignant proliferative diseases. *Current Medicinal Chemistry* 13, 1481-1489.

Marôco, J., 2010. Análise estatística com o “PASW Statistics” (Ex-SPSS). Ed. PSE, Produtos e Serviços de Estatística, Lda. ReportNumber. Pêro Pinheiro.

Monte-Corvo, L., L. Goulão and C. Oliveira, 2001. ISSR analysis of cultivars of pear and suitability of molecular markers for clone discrimination. *J. Amer. Soc. Sci.* 126 (5): 517-522.

Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

N.V. Philips’Gloeilampenfabrieken, 1977. Lighting Technology in Horticulture. Ed. B.C. Templing and M.A. Verbruggen, Lighting Design and Engineering Centre. Lighting Division, Philips’ Gloeilampenfabrieken, Eindhoven, The Netherlands.

Sánchez, A. C. G., A. Gil-Izquierdo and M. I. Gil, 2003. Comparative study of six pear cultivars in terms of their phenolic and vitamin C contents and antioxidant capacity. *J. Sci. Food Agric.* 83:995-1003.

Sonneveld, C. and W. Voogt, 2009. Plant nutrition of greenhouse crops. Ed. Springer Science. New York.

SPSS, 2009. PASW Statistics 18.0. SPSS, Inc: Chicago, IL.

Thakura, A. and J.S. Kanwar, 2008. Micropropagation of “Wild pear” *Pyrus pyrifolia* (Burm F.) Nakai. II. Induction of Rooting. *Not. Bot. Hort. bAgrobot. Cluj.* 36 (2): 104-111.