

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE COUVE-FLORES (*Brassica oleracea* var. *botrytis* subvar. *cauliflora* DC.) «IN VITRO» VISANDO AO MELHORAMENTO DE CULTIVARES DE VERÃO*

Antônio Carlos Torres
Paulo T. D. Vecchia
Linda S. Caldas**

1. INTRODUÇÃO

O melhoramento de cultivares de couve-flor depende da produção de sementes de plantas individuais selecionadas sob as mesmas condições edafoclimáticas para as quais são recomendadas.

No Brasil, São Paulo é o Estado que mais produz couve-flor. A semeadura de couve-flor de verão nas principais regiões produtoras desse Estado é feita de novembro a janeiro (3, 5, 10). Culturas conduzidas nesse período não podem ser utilizadas para cruzamentos e produção de sementes, porque o florescimento é prejudicado por altas temperaturas e pelo excesso de chuvas que ocorrem nessas épocas naquelas regiões (10).

Desta forma, a semeadura de cultivares de verão, tanto para a produção de sementes como para condução de programa de melhoramento, tem sido feita a partir de março. Nesta época, após a formação da cabeça, o desenvolvimento de flores se processa normalmente, permitindo cruzamentos e produção de sementes sob condições ideais de clima. Entretanto, em semeaduras feitas a partir de março, não há possibilidade de executar seleção das plantas para verão, porque elas se desenvolvem completamente fora das condições normais da cultura (10).

A manutenção e propagação vegetativa de plantas de couve-flor selecionadas sob condições de cultura de verão, para posterior produção de sementes em época mais adequada, é de grande utilidade para seu melhoramento.

Vários métodos de propagação vegetativa de couve-flor foram estabelecidos mediante o enraizamento de estacas retiradas de diversas partes da planta (2, 6, 8, 9, 12, 13, 17). No entanto, tais métodos apresentam limitações e raramente produzem mais de 10 novas plantas por ano, a partir da planta selecionada (4).

POW (14) desenvolveu um método *in vitro* de rápida propagação clonal de couve-flor. O número de plantas que podem ser obtidas por este método, embora superior ao conseguido pelos métodos até então desenvolvidos, é limitado pela

* Recebido para publicação em 29-05-1978.

** Respectivamente, Pesquisadores da Unidade de Execução de Pesquisa de Âmbito Estadual — UEPAE de Brasília — EMBRAPA e Professor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade de Brasília.

quantidade de explantos parentais disponíveis (16). POW (14) ressalta, também, dificuldades nas fases de diferenciação e transplante de plântulas.

Visando a conseguir, a partir de um único explanto, unidades de proliferação das quais pudesse ser obtido grande número de explantos clonais, WALKEY (16) utilizou, com sucesso, a mesma metodologia empregada, para tal finalidade, em orquídeas (18) e *Nicotiana rustica* L (15). No entanto, para obtenção de plântulas, a repicagem dos explantos clonais foi feita para o mesmo meio de cultura anteriormente estabelecido por POW (14), o que sugere dificuldades semelhantes nas fases de diferenciação e transplante de plântulas.

ANDERSON e CARSTENS (1), utilizando meio e técnicas diferentes daqueles até então utilizados para a cultura de tecidos de crucíferas, obtiveram excelentes resultados na obtenção de plântulas de brócolos e taxas de até 90% de sobrevivência após transferência para vasos que continham solo.

Este trabalho teve como objetivo desenvolver a técnica de cultura de tecidos de couve-flor, visando à sua utilização imediata em programas de melhoramento de couve-flor de verão.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Diferenciação dos Explantos em Brotações

Explantos de 2 a 3 mm de diâmetro (Figura 1a), tomados da superfície da cabeça de couve-flor em estágio de colheita, foram tratados, durante 10 minutos, em solução de hipoclorito de cálcio a 2% e lavados em água deionizada estéril imediatamente após o tratamento.

Introduziram-se os explantos em frascos de 120 ml, que continham 30 ml de Meio 1 (meio básico de MURASHIGE e SKOOG (11), acrescido de 27 mg/l de adenina, 170 mg/l de fosfato monobásico de sódio, 5 mg/l de ácido indolacético, 4 mg/l de cinetina), com pH ajustado a $5,7 \pm 0,1$.

Os frascos que continham o meio de cultura foram previamente autoclavados.

Grupos de 60 frascos que continham explantos foram mantidos em câmara de crescimento com intensidade luminosa de 4000 lux, ciclos fotoperiódicos de 14, 16, 16 e 24 horas e regimes de temperatura diurna/noturna de 22/18, 24/16, 28/28 e 32/28°C, respectivamente.

2.2. Obtenção de Plântulas

Após a diferenciação e o desenvolvimento das brotações, repicaram-se porções destas, de 2 a 3 cm de comprimento, para recipientes iguais, que continham 30 ml de Meio 2 (meio básico de MURASHIGE e SKOOG (11), acrescido de 10 mg/l de ácido indolbutírico), com pH ajustado a $5,7 \pm 0,1$.

Os frascos que continham o meio de cultura foram previamente autoclavados.

Os frascos foram mantidos em câmara de crescimento com intensidade luminosa de 4000 lux, ciclo fotoperiódico de 16 horas e temperatura diurna/noturna de 24/16°C.

Após a obtenção de plântulas, procedeu-se ao transplante para vasos plásticos, de 100 ml, que continham, em proporções iguais, areia e vermiculita esterilizadas. Cobriram-se os vasos com campânula de plástico, permanecendo eles em câmara de crescimento, sob as mesmas condições descritas anteriormente. O substrato recebeu aplicações periódicas da solução de Hoagland.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que a obtenção de uma plântula de couve-flor, nas condições estabelecidas neste trabalho, é processada em duas etapas: a) diferenciação dos explantos em brotações; b) diferenciação e desenvolvimento de sistema radicular a partir de brotações.

3.1. Diferenciação dos Explantos em Brotações.

A superfície de uma cabeça de couve-flor consiste numa massa de meristemas apicais que, sob curso normal de desenvolvimento, darão origem a primórdios florais. No entanto, se submetidos a temperaturas suficientemente altas, os meristemas apicais da cabeça se desvernizam, dando origem a novos órgãos vegetativos (4). CRISP e WALKEY (4) salientam que esta propriedade é a base da regeneração

de plantas de couve-flor *in vitro*, mediante a cultura de explantos tomados da superfície da cabeça, em estágio de colheita.

Observou-se que, nos regimes de temperaturas diurna/noturna 22/18, 24/16, 28/28, 32/28°C, ocorre a desvernalização do meristema apical, com subsequente diferenciação e desenvolvimento de brotações. POW (14) e CRISP e WALKEY (4) obtiveram, também, desvernalização de meristema apical nos intervalos de temperaturas de 20-26 e 20-24°C, respectivamente. No entanto, nenhuma dessas condições de crescimento parece ser crítica.

Os melhores resultados referentes à diferenciação e desenvolvimento de brotações foram obtidos quando os explantos foram cultivados no Meio 1, sob regimes de temperatura diurna/noturna de 28/28 e 32/28°C e fotoperíodo de 16 e 24 horas, respectivamente. Nessas condições, obteve-se formação de pólos caulinares (Figura 1b) entre 5 e 10 dias após a introdução dos explantos no meio de cultivo. Dos 10 aos 15 dias, ocorreu a diferenciação e desenvolvimento de primórdios foliares.

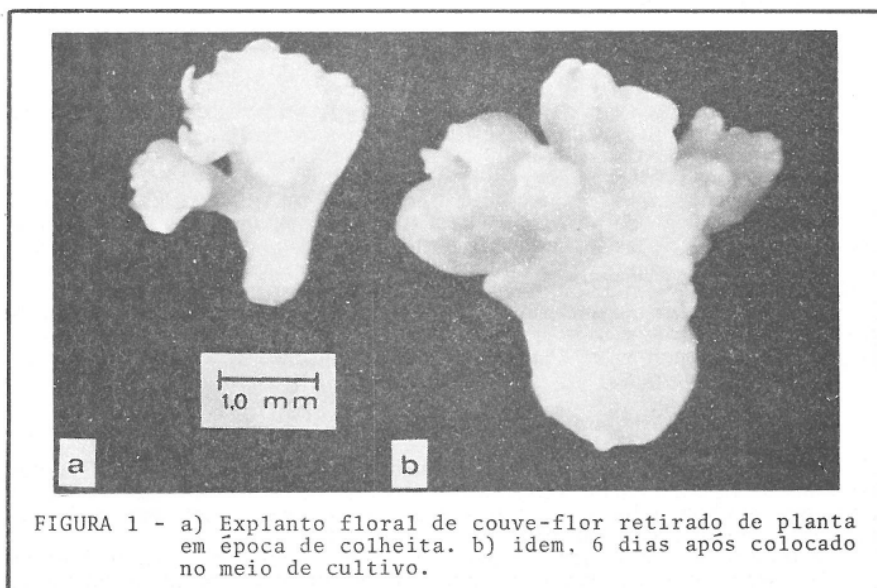


FIGURA 1 - a) Explanto floral de couve-flor retirado de planta em época de colheita. b) idem, 6 dias após colocado no meio de cultivo.

Entre 20 e 40 dias, ocorreu intenso desenvolvimento vegetativo (Figura 2). Nessas condições, foram obtidos de 8 a 12 brotos com folhas a partir de um explanto introduzido no meio de cultura. Esta sequência cronológica varia de comportamento sob diferentes regimes de temperatura e fotoperíodo. Temperatura de 22/18, 24/16°C e fotoperíodo de 16 horas retardaram o desenvolvimento de todas as etapas anteriormente descritas por aproximadamente 10 dias.

Em cerca de 10% das culturas observou-se diferenciação e desenvolvimento de rudimentos de sistema radicular.

A repicagem de porções das brotações para o mesmo meio de cultura (Meio 1) promove intensa proliferação e desenvolvimento de novas brotações, possibilitando manutenção e propagação teoricamente ilimitadas do material. ANDERSON e CARSTENS (1), em procedimento semelhante, obtiveram os mesmos resultados, com brócolos.

3.2. Diferenciação e Desenvolvimento de Sistema Radicular a Partir de Brotações

Após a repicagem de porções de brotações (Figura 3) para o Meio 2, em 90% das culturas obteve-se a diferenciação do sistema radicular e posterior desenvolvimento polar dos dois sistemas.

Entre 5 e 10 dias, evidenciaram-se primórdios de raízes adventícias na parte basilar dos brotos, em forma de roseta, e em toda a periferia da região seccionada

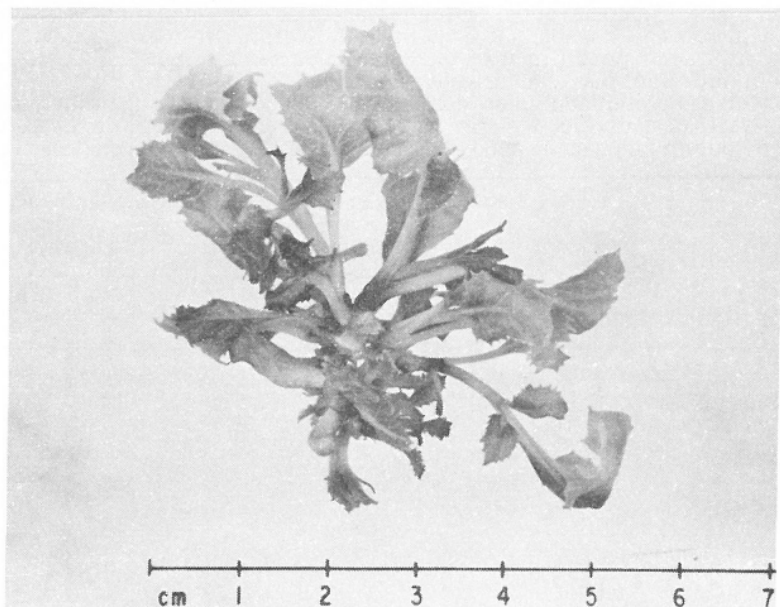


FIGURA 2 - Desenvolvimento vegetativo do explanto floral de couve-flor.

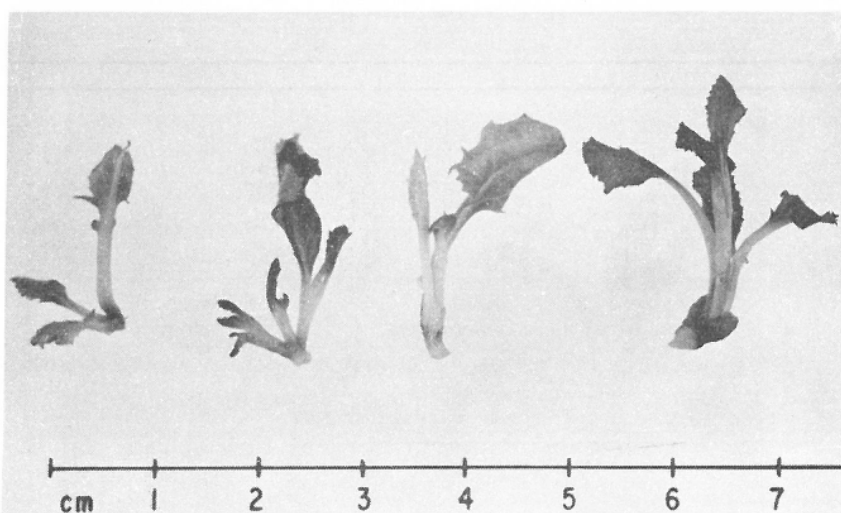


FIGURA 3 - Porções de brotações utilizadas para transplante.

na repicagem (Figura 4). Dos 10 aos 20 dias, primórdios de raízes e parte aérea apresentaram desenvolvimento pronunciado. Entre 30 e 40 dias, foram obtidas plântulas em condições de transplante (Figura 5). Estas foram transplantadas para vasos com vermiculita e areia (Figura 6), apresentando bom pegamento e um normal desenvolvimento posterior.

Com esta seqüência, obtiveram-se plântulas de couve-flor entre 60 e 80 dias após a introdução dos explantos no meio de cultura. No mesmo intervalo de tempo, utilizando, porém, meios e metodologia diferentes, CRISP e WALKEY (4) também obtiveram plântulas de couve-flor.

A técnica apresentada sugere possibilidade de uso imediato no melhoramento de cultivares de couve-flor de verão, permitindo seleção de plantas de sementeiras feitas de outubro a janeiro e posterior produção de sementes sob condições ideais

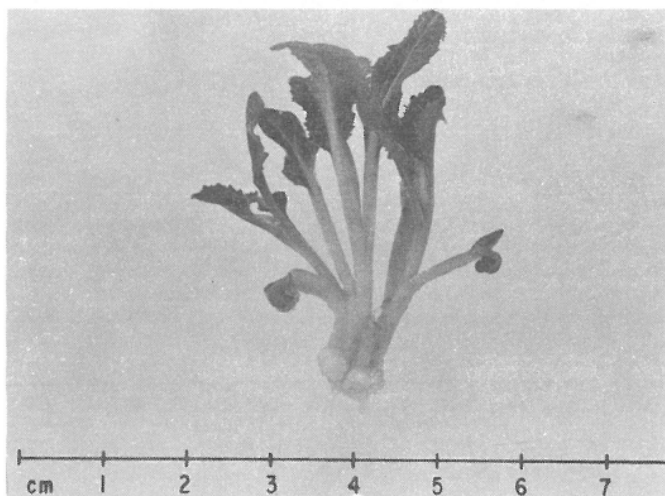


FIGURA 4 - Desenvolvimento inicial de raízes na região basal das brotações.



FIGURA 5 - Plântulas em fase de transferência para vasos.

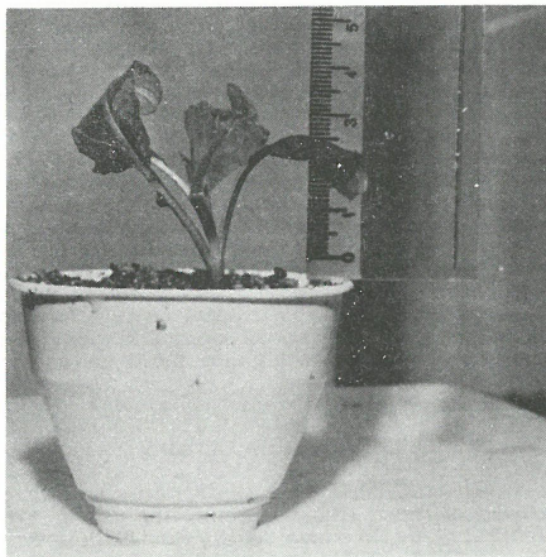


FIGURA 6 - Plântula em desenvolvimento após transferência para vaso.

de clima.

4. RESUMO

Explantos tomados da superfície da cabeça de couve-flor em estágio de colheita foram cultivados em meio básico de MURASHIGE e SKOOG, acrescido de 27 mg/l de adenina, 170 mg/l de fosfato monobásico de sódio, 5 mg/l de ácido indolacético, 4 mg/l de cinetina, com pH ajustado a $5,7 \pm 0,1$. Frascos que continham explantos foram submetidos a diferentes ciclos fotoperiódicos e regimes de temperatura diurna/noturna, sob intensidade luminosa de 4000 lux. Observou-se que os ciclos fotoperiódicos de 16 e 24 horas, com os respectivos regimes de temperaturas, de 28/28 e 32/28°C, foram os melhores tratamentos para a diferenciação dos explantos em brotações. Nestas condições, entre 20 e 40 dias após a introdução dos explantos no meio de cultura, obtiveram-se brotações com 8 a 12 brotos por explanto cultivado. Em apenas 10% das culturas mantidas neste meio observou-se diferenciação e desenvolvimento de rudimentos de sistema radicular. Quando porções das brotações foram repicadas para o meio básico de MURASHIGE e SKOOG, acrescido de 10 mg/l de ácido indolbutírico, com pH ajustado a $5,7 \pm 0,1$, obteve-se, em 90% das culturas, diferenciação do sistema radicular e posterior desenvolvimento tanto do sistema radicular como do sistema caulinar. Entre 30 e 40 dias após a repicagem, obtiveram-se plântulas em condições de transplante para vasos com mistura de areia e vermiculita, na proporção 1:1. Obteve-se bom pegamento do transplante das plântulas e normal desenvolvimento posterior das plantas.

Sugere-se o uso da técnica para propagação vegetativa de plantas de couve-flor selecionadas sob as condições de final de primavera e verão para posterior produção de sementes sob condições ideais de clima, visando ao melhoramento de cultivares para tal período.

5. SUMMARY

Explants of about 3 mm in diameter taken from the surface of the marketable curd of cauliflower were cultured in the basic medium of Murashige and Skoog with the addition of 27 mg/l adenine, 170 mg/l NaH_2PO_4 , 5 mg/l indoleacetic acid,

4 mg/l kinetin with pH adjusted to 5.7 ± 0.1 . The recipients containing the explants were submitted to different photoperiods and temperature regimes, at a light intensity of 4000 lux. Photoperiods of 16 and 24 hours with the respective day/night temperature regimes of $28^{\circ}\text{C}/28^{\circ}\text{C}$ and $32^{\circ}\text{C}/28^{\circ}\text{C}$ were the best treatments for the differentiation of shoots on the explants. Under these conditions, 8 to 12 shoots were obtained per explant within 20 to 40 days. Only 10% of the cultures maintained on this nutrient medium developed roots and these were rudimentary. When parts of these shoots were transferred to the basic medium of Murashige and Skoog supplemented with 10 mg/l indolebutyric acid with pH adjusted to 5.7 ± 0.1 the differentiation of a root system was obtained in 90% of the cultures and normal polar development of the root and shoot followed. Between 30 and 40 days after transfer to the second medium, the plantlets were large enough to transplant to a 1:1 mixture of sterile sand and vermiculite. The transplanting was generally successful and good development of the plants was noted.

The use of this technique is suggested for the vegetative propagation of cauliflower plants selected during the end of spring and whole summer to permit seed production for this off-season planting time and to permit breeding towards summer cultivars.

6. LITERATURA CITADA

1. ANDERSON, W. C. & CARSTENS, J. B. Tissue culture propagation of Broccoli, *Brassica oleracea* (Italica Group), for use in F-1 Hybrid Seed Production. *Journal of the American Society Horticultural Science* 102 (1):69-73. 1977.
2. BENVENUTI, A. Ulteriori ricerche sul miglioramento di razza del cavolfiore. Innesto tra sottospecie di *Brassica oleracea*. *Sementi Ellette* 15: 66-69. 1969.
3. CAMARGO, L. de S. & FORNASIER, J. B. *Instruções para a cultura da couve flor e dos brócolos*. Campinas, Instituto Agrônomo de Campinas, 1971. 37 p. (Boletim 197).
4. CRISP, P. & WALKEY, D. G. A. The use of aseptic meristem culture in cauliflower breeding. *Euphytica* 23: 305-313. 1974.
5. FORNASIER, J. B., CAMARGO, L. de S. & IGUE, T. Comportamento de cultivares de couve-flor (*B. oleracea* L. var *botrytis cauliflora*, Gers. DC.) de verão, na região de Monte Alegre do Sul. I. Cultura de janeiro a abril de 1974. *Revista de Olericultura*, Santa Maria, 14: 70-72. 1974.
6. HAINE, K. E. Vegetative propagation from the Broccoli curd after suppression of flowering. *Nature*, 168: 919-920. 1951.
7. HONMA, S.; BUKOVAC, M. J., & HEECKT, O. Studies on the asexual reproduction of cauliflower. *Proceedings of the American Society Horticultural Science* 78: 343-348. 1961.
8. HONMA, S. & MANSOUR, N. S. Use of antibiotic in asexual propagation of cauliflower. *Plant Disease Report* 48: 623-624. 1964.
9. HONMA, S. & MANSOUR, N. S. Further studies on the propagation of cauliflower. *Euphytica* 14: 283-284. 1965.
10. IKUTA, H. Utilização de autoincompatibilidade na variedade de couve-flor de verão «Piracicaba Precoce n.º 1», para produção de sementes híbridas F-1. *Relatório Científico do Instituto de Genética da ESALQ, Piracicaba*, 1969. p. 153-174.
11. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497. 1962.
12. NIEUWHOF, M. Vegetative maintenance and propagation of cauliflower. *Euphytica* 7: 170-178. 1958.

13. NORTH, C. Three methods for vegetative propagation of *Brassica oleracea*. *Journal Royal Horticultural Society* 78: 106-111. 1953.
14. POW, J. J. Clonal propagation in vitro from cauliflower curd. *Horticultural Research* 9: 151-152. 1969.
15. WALKEY, D. G. A. & WOOLFITT, J. M. G. Clonal multiplication of *Nicotiana rustica* L. from shoot meristems in culture. *Nature* 220: 1346-1347. 1968.
16. WALKEY, D. G. A. & WOOLFITT, J. M. G. Rapid clonal multiplication of cauliflower by shake culture. *Journal of Horticultural Science*. 45:205-206. 1970.
17. WATTS, L. E., & GEORGE, R. A. T. Vegetative propagation of autumn cauliflower. *Euphytica* 12: 341-345. 1963.
18. WIMBER, D. E. Additional observations on clonal multiplication of cymbidiums through culture of shoot meristems. *Cymbidium Society News* 20:7-10. 1965.