

PROPAGAÇÃO VEGETATIVA DE BRÓCOLOS (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) POR MEIO DA CULTURA DE TECIDOS, VISANDO À MANUTENÇÃO DE LINHAGENS AUTO-INCOMPATÍVEIS*

Antônio Carlos Torres**

Paulo T. D. Vecchia**

Ecilda L. S. Souza**

Linda C. Caldas***

1. INTRODUÇÃO

Trabalhos pioneiros, visando à utilização da auto-incompatibilidade na produção de híbridos comerciais de Brássicas no Brasil, foram realizados por IKUTA (6). A identificação e estabilização de linhagens parentais auto-incompatíveis de brócolos requerem, sucessivamente, várias autofecundações. Sua manutenção exige polinização manual das flores no estágio de botão floral (10). Esse procedimento conduz as plantas à rápida endogamia, que provoca acentuada perda de vigor em brócolos, a qual se manifesta, dentre outras características, pela redução do porte e da capacidade reprodutiva das plantas (1, 10). Dessa forma, a manutenção e a propagação vegetativa de linhagens parentais auto-incompatíveis de brócolos, logo depois da identificação daquelas que têm capacidade superior de combinação, são de grande utilidade. Evita-se, com essa técnica, a depressão causada pela endogamia e garantem-se a produção normal de sementes parentais básicas e a manutenção da qualidade dos híbridos comerciais.

Com as técnicas de cultura de tecidos, vários pesquisadores obtiveram excelentes resultados na propagação vegetativa de Brássicas, conseguindo aumentar significativamente o número de plantas obtidas a partir de uma planta selecionada (1, 2, 3, 4, 7, 8, 11, 12, 13). ANDERSON e CARSTENS (1), utilizando meios e técnicas diferentes daquelas até então utilizadas na cultura de tecidos de Brássicas, tiveram êxito na obtenção de plântulas de brócolos com taxas de 90% de sobrevivência, depois de serem plantadas em vasos com solo.

* Recebido para publicação em 05-10.1979.

** EMBRAPA — UEPAE de Brasília — Caixa Postal 1316 — 70 000 — Brasília-DF.

*** Universidade de Brasília — Dep. de Biologia Vegetal — 70 910 — Brasília-DF.

Este trabalho visou a desenvolver a técnica de cultura de tecidos das variedades de brócolos plantadas no Brasil, visando à sua utilização na manutenção de linhagens auto-incompatíveis ou macho estéreis destinadas à produção de híbridos comerciais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Botões florais de brócolos, com 3 a 6mm de tamanho (Figura 1), tomados de plantas em estágio de colheita, desenvolvidas na época fria, foram tratados durante 10 minutos em solução de hipoclorito de cálcio a 2% e lavados em água deionizada estéril imediatamente depois do tratamento.

2.1. Diferenciação de Explantes em Brotações

Introduziram-se os explantes em frascos de 120 ml, que continham 30 ml do meio básico e vitaminas de MURASHIGE e SKOOG (9), acrescidos de combinação de 6-furfurilaminopurina (0; 4; 6 e 10 mg/l), benziladenina (0; 1; 2 e 4 mg/l), adenina (0 e 27 mg/l), ácido giberélico (0 e 0,35 mg/l), ácido naftaleno-acético (0; 0,1; 0,2 e 0,3 mg/l), fosfato monobásico de sódio (170 mg/l), mio-inositol (100 mg/l), ágar (6,5 g/l), sacarose (30 g/l), com pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$. Os frascos que continham os meios de cultura foram previamente autoclavados.

Grupos de 30 frascos que continham os explantes foram mantidos em câmara de crescimento com intensidade luminosa de 3.000 lux, ciclo fotoperiódico de 16 horas e regime de temperatura diurna/noturna de 25/18°C.

2.2. Obtenção de Plântulas

Depois da diferenciação e desenvolvimento da parte aérea, repicaram-se porções apicais desta, com 2 a 3 cm de comprimento, para recipientes iguais, que continham 30 ml do meio básico e vitaminas de MURASHIGE e SKOOG (9), acrescidos de 10 ml/l de ácido indolbutírico, 6,5 g/l de ágar, 30 g/l de sacarose, com pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$. Os frascos que continham o meio de cultura foram previamente autoclavados. Os frascos foram mantidos em câmara de crescimento, nas mesmas condições descritas em 2.1.

Depois de obtidas, as plântulas foram transplantadas para vasos plásticos, de 100 ml, que continham areia e vermiculite esterilizadas, em proporções iguais. Cobriram-se os vasos com campânulas de plástico, que permaneceram em câmara de crescimento, nas mesmas condições descritas em 2.1. O substrato recebeu aplicações periódicas de solução de Hoagland.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que as condições ambientais de desenvolvimento de plantas de brócolos, sua idade fisiológica, a combinação e a concentração de substâncias de crescimento têm influência morfo genética determinativa na diferenciação e desenvolvimento dos sistemas caulinar e radicular em explantes florais cultivados *in vitro*. Explantes florais retirados de plantas de brócolos desenvolvidas em época quente apresentaram acentuado desenvolvimento do sistema radicular e do ovário, ocorrendo diferenciação da parte aérea em 10% do material. Em explantes florais retirados de plantas desenvolvidas em época fria ocorreram diferenciação e desenvolvimento da parte aérea em 65% do material. ANDERSON e CARSTENS

(1) verificaram que explantes florais retirados de plantas de brócolos mantidas à temperatura de 16°C normalmente diferenciavam parte aérea ao serem cultivados *in vitro*. No entanto, quando as plantas se desenvolviam à temperatura de 21°C, os explantes florais morriam rapidamente em cultura. Alguns trabalhos (1, 5) mostram a importância da temperatura em que as plantas se desenvolvem na sua posterior propagação *in vitro*.

Nas condições estabelecidas, explantes retirados de botões florais com 3 a 6mm de comprimento são os indicados para cultura *in vitro*. Flores e botões maiores que 6mm apresentam diferenciação e desenvolvimento do sistema radicular e do ovário em 80% dos casos. Botões florais com menos de 3mm morrem em cultura. No entanto, ANDERSON e CARTENS (1) obtiveram melhores resultados em cultura *in vitro* de brócolos utilizando explantes de botões florais com 1 a 2mm de comprimento. A organogênese, em explantes florais de brócolos, processa-se em duas etapas: a) diferenciação dos explantes em brotações; b) diferenciação e desenvolvimento de sistema radicular a partir de brotações. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por ANDERSON e CARTENS (1), em brócolos, e por TORRES *et alii* (12) e TRIMBOLI *et alii* (13), em couve-flor.

3.1. Diferenciação dos Explantes em Brotações

Melhores resultados referentes à diferenciação e ao desenvolvimento de brotações foram obtidos com o explante cultivado no meio que continha macro, micronutrientes e vitaminas de MURASHIGE e SKOOG (9), acrescidos de 4mg/l de 6-furfurilaminopurina, 27 mg/l de adenina, 100 mg/l de mio-inositol, 170 mg/l de fosfato monobásico de sódio, 6,5 g/l de ágar, 30 g/l de sacarose, com pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$. Observaram-se diferentes respostas morfogênicas: diferenciação de gemas por meio dos tecidos do receptáculo floral (Figura 2a), da região mediana do pedúnculo floral (Figura 2b), bem como da sua extremidade basal (Figura 2c). Em alguns casos, da extremidade basal do pedúnculo do explante ocorriam a diferenciação e o desenvolvimento de raízes e folhas. Estas últimas, em contato com o meio de cultura, podiam diferenciar-se em gemas caulinares (Figura 3).

Entre 5 e 10 dias depois da introdução dos explantes no meio de cultivo, observou-se que sua espessura foi aumentada. Dos 10 aos 30 dias, ocorreram diferenciação e desenvolvimento de primórdios foliares. Entre 30 e 40 dias, 60% do material apresentaram intenso desenvolvimento vegetativo (Figura 4). Foram obtidos 3 a 4 brotos com folha a partir de um único explante introduzido no meio de cultura. Nos 40% restantes, fez-se necessária sua transferência para novo meio de cultura de composição idêntica à do anterior, obtendo-se, desse modo, melhor desenvolvimento vegetativo e proliferação de novas brotações.

Concentrações de 6-furfurilaminopurina e benziladenina acima de 4 mg/l e 1 mg/l, respectivamente, induzem a formação e o desenvolvimento de pronunciado calo, que se diferencia em parte aérea. Com a adição de ácido naftaleno acético aos tratamentos com 6-furfurilaminopurina, verificou-se a formação de volumoso calo, em todas as dosagens testadas, com posterior diferenciação e desenvolvimento anormal dos sistemas caulinar e radicular. Benziladenina, na concentração de 1 mg/l, pode substituir a adenina na indução de diferenciação da parte aérea, porém seu efeito no desenvolvimento é retardado.

3.2. Diferenciação e Desenvolvimento do Sistema Radicular

Repicaram-se porções de brotações (Figura 5) para o meio básico e vitaminas de MURASHIGE e SKOOG (9), acrescidas de 100 mg/l de mio-inositol, 10 mg/l de ácido indolbutírico, 6,5 mg/l de ágar, 30 g/l de sacarose, com pH ajustado para

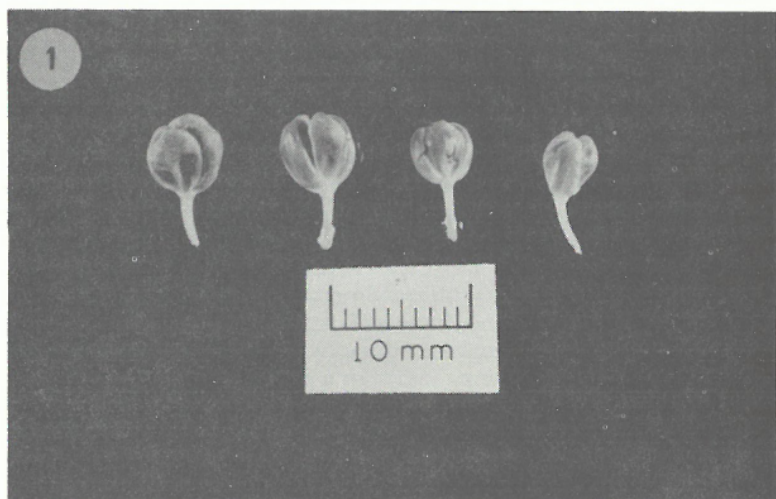


FIGURA 1 - Explantes florais de brócolos utilizados para cultura *in vitro*.

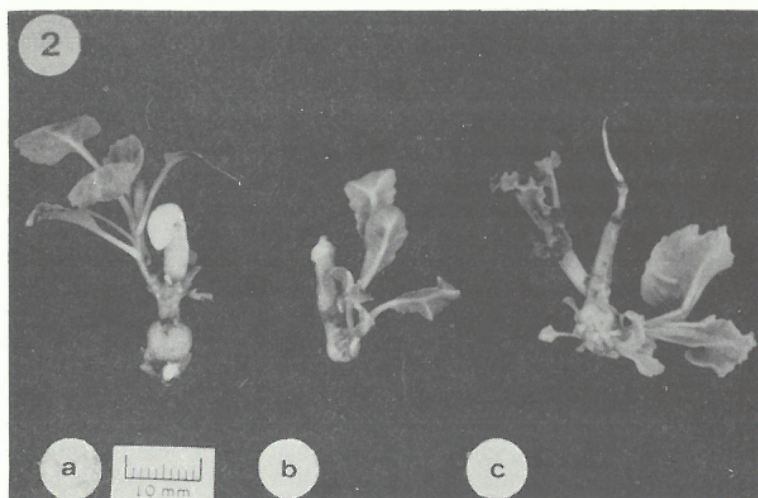


FIGURA 2 - a) Diferenciação de gemas dos tecidos do receptáculo floral.
b) idem, da região mediana do pedúnculo floral.
c) idem, da extremidade basal do pedúnculo floral.

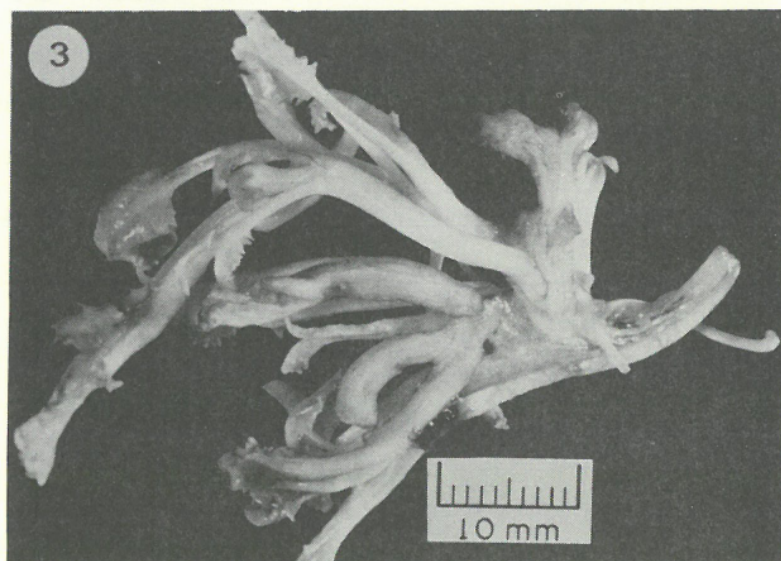


FIGURA 3 - Aspecto da diferenciação e desenvolvimento de gemas caulinares a partir do limbo e do pecíolo foliares.

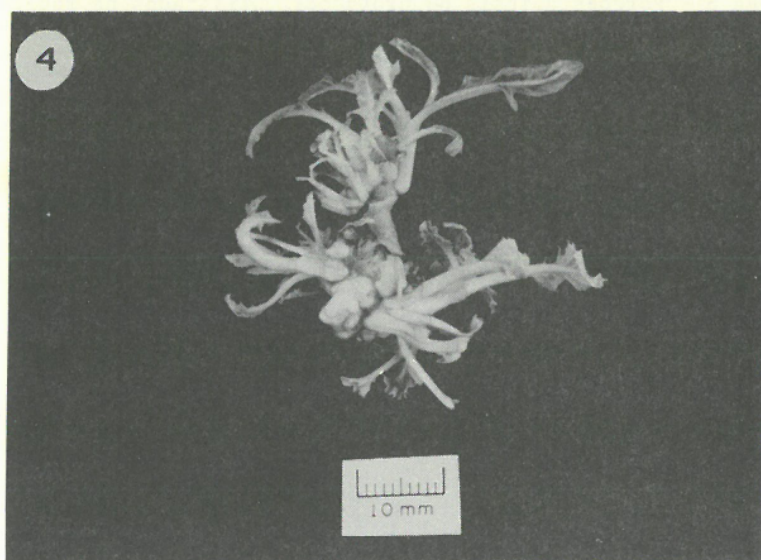


FIGURA 4 - Desenvolvimento vegetativo de explantes de brócolos.

$5,7 \pm 0,1$. Com esse procedimento, foi obtida a diferenciação do sistema radicular e posterior desenvolvimento polar dos dois sistemas em 80% do material. Os 20% restantes foram repicados para novo meio de cultura, de composição idêntica à do anterior. A exigência de meios de cultura distintos na diferenciação e desenvolvimento dos sistemas caulinar e radicular tem sido observada em vários trabalhos de propagação *in vitro* (1, 6, 12, 13).

Entre 10 e 15 dias, primórdios de raízes adventícias surgiram na porção basilar dos brotos. Dos 25 aos 35 dias obtiveram-se plântulas (Figura 6) que foram transplantadas para vasos que continham, em proporções iguais, vermiculite e areia, apresentando bom pegamento e, posteriormente, desenvolvimento normal.



FIGURA 5 - Porções apicais de brotações utilizados na repicagem.

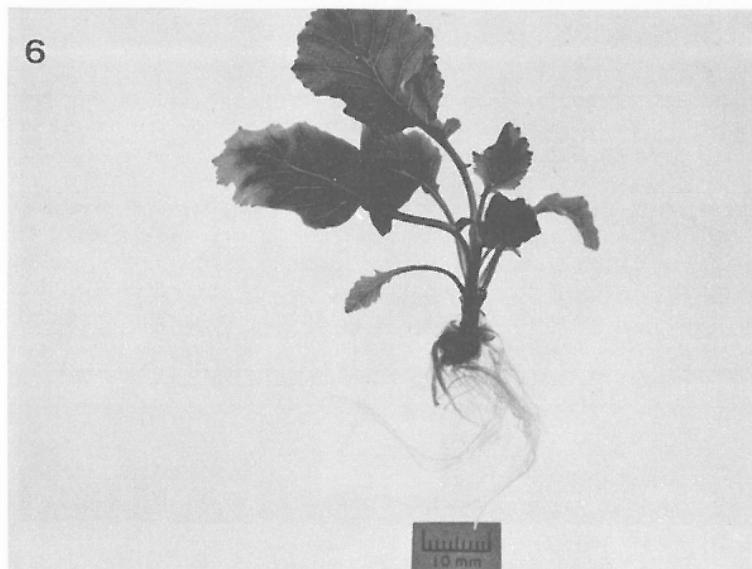


FIGURA 6 - Plântulas de brócolos em fase de transferência para substrato definitivo.

4. RESUMO

Botões florais de brócolos, com 3 a 6mm de tamanho, foram cultivados em meio que continha macro, micronutriente e vitaminas de MURASHIGE e SKOOG, acrescidos de 4 mg/l de 6-furfurilaminopurina, 27 mg/l de adenina, 100 mg/l de mio-inositol, 170 mg/l de fosfato monobásico de sódio, 6,5 g/l de ágar, 30 g/l de sacarose, com pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$. Frascos com os explantes foram mantidos em câmara de crescimento com intensidade luminosa de 3.000 lux, ciclo fotoperiódico de 16 horas e regime de temperatura diurna/noturna de 25/18°C. Nessas condições, obtiveram-se diferenciação e desenvolvimento da parte aérea em 60% do material colocado para cultivo. Repicaram-se porções apicais dessas brotações para novo meio, que continha macro e micronutrientes e vitaminas de MURASHIGE e SKOOG, acrescidos de 10 mg/l de ácido indolbutírico, 100 mg/l de mio-inositol, 6,5 g/l de ágar, 30 g/l de sacarose, com pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$. Com esse procedimento observou-se, em 80% do material, diferenciação do sistema radicular e posterior desenvolvimento polar dos dois sistemas. Entre 25 e 35 dias depois da repicagem, obtiveram-se plântulas que foram transplantadas para vasos que continham proporções iguais de vermiculite e areia, apresentando pegamento e desenvolvimento normais.

Essa técnica pode ser usada para a propagação e manutenção clonal de linhagens parentais auto-incompatíveis de brócolos ou de plantas macho estéreis, destinadas à produção de híbridos comerciais.

5. SUMMARY

Broccoli flower buds about 3 to 6 mm in length were cultured in medium consisting of Murashige and Skoog inorganic salts and vitamins, with the addition of 4 mg/l of kinetin, 27 mg/l of adenine, 100 mg/l of myo-inositol, 170 mg/l of NaH_2P_0_4 , 6,5 g/l of agar, 30 g/l of sucrose, with the pH adjusted to $5,7 \pm 0,1$. The recipients containing the explants were submitted to a light intensity of 3,000 lux, photoperiod of 16 hours and day/night temperature regime of 25/18°C. Under these conditions, 60% of the flower buds produced shoots. An average of 3 to 4 shoots was obtained per explant within 20 to 40 days. When apical parts of these shoots were transferred to the basic medium and vitamins of Murashige and Skoog supplemented with 30 g/l sucrose, 6,5 g/l of agar, 10 mg/l indolebutyric acid with pH adjusted to $5,7 \pm 0,1$, the differentiation of a root system was obtained in 80% of the cultures, and normal polar development of the root and shoot followed. Between 25 to 30 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 use of this technique is suggested for clonal propagation and maintenance of self-incompatible breeding lines of broccoli or for the maintenance of male sterile plants, for the production of commercial hybrids.

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. BAJAJ, Y.P.S. & NIETSCH, P. *In vitro* propagation of red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*). *Journal Experimental Botany*, 26:883-890, 1975.

3. CLARE, M.V. & COLLIN, H.A. Meristem culture of brussels sprouts. *Horticultural Research*, 13:111-118, 1973.
4. CRISP, P. & WALKEY, D.G.A. The use of aseptic meristem culture in cauliflower breeding. *Euphytica*, 23:305-313, 1974.
5. FONNESBECK, M. Temperature effects on shoot and root development from begonia x cheimantha petiole segments grown *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, 32:282-286, 1974.
6. IKUTA, H. Utilização de autoincompatibilidade na variedade de couve-flor de verão 'Piracicaba Precoce n.º 1' para a produção de sementes híbridas F-1. *Relatório Científico do Instituto de Genética da ESALQ*, Piracicaba, 1969. p. 153-174.
7. JELASKA, S. & SUTINA, R. Maintained culture of multiple plantlets from carnation shoot tips. *Acta Horticulturae*, 78:333-340, 1977.
8. MARGARA, J. Étude des facteurs de la néoformation de bourgeons en culture *in vitro* chez le chou-fleur (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*). *Annales de Physiologie Végétale*, 11(2):95-112, 1969.
9. MURASHIGE, T. & SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15:473-479, 1962.
10. NIEUWHOF, M. *Cole crops*. London, Leonardi Hill, 1969. 353p.
11. POW, J.J. Clonal propagation *in vitro* from cauliflower curd. *Horticultural Research*, 9:151-152, 1969.
12. TORRES, A. C., VECCHIA, P.T.D. & CALDAS, L.S. Propagação vegetativa de couve-flor (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* subvar. *cauliflora* DC.) *in vitro* visando ao melhoramento de cultivares de verão. *Revista Ceres*, 25(142):602-609, 1978.
13. TRIMBOLI, D.S., PRAKASH, N. & FOSSARD, R.A. de. The initiation, rooting and establishment of cortical buds in cauliflower. *Acta Horticulturae*, 78:243-248, 1977.
14. VAZQUEZ, A.M., DAVEY, M.R. & SHORT, K.C. Organogenesis in cultures of *Saintpaulia ionatha*. *Acta Horticulturae*, 78:249-258, 1977.
15. WALKEY, D.G.A. & WOOLFITT, J.M.G. Rapid clonal multiplication of cauliflower by shake culture. *Journal of Horticultural Science*, 45:205-206, 1970.