

## MEIOS NUTRITIVOS NO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE FIGUEIRA

Ednamar Gabriela Palú<sup>1</sup>; Sara Krause<sup>2</sup>; Lidiane Miranda da Silva<sup>3</sup>; Viviane Luiza Hunhoff<sup>4</sup>; Edinéia Zulian Dalbosco<sup>5</sup>

1. Técnica Universitária Eng<sup>a</sup> Agrônoma da Universidade do Estado de Mato Grosso (gabrielpalu@unemat.br)
  2. Graduanda em Ciências Biológicas da Universidade do Estado de Mato Grosso
  3. Graduanda em Ciências Biológicas da Universidade do Estado de Mato Grosso
  4. Pós-Graduanda do Programa de Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas da Universidade do Estado de Mato Grosso
  5. Pós-Graduanda do Programa de Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas da Universidade do Estado de Mato Grosso
- Rodovia MT 358, Km 7, Caixa Postal 287, CEP 78.300-000  
Tangará da Serra – Mato Grosso, Brasil.

Recebido em: 30/09/2014 – Aprovado em: 15/11/2014 – Publicado em: 01/12/2014

### RESUMO

A cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas nas quais um explante (célula, tecido ou órgão) é isolado e cultivado sob condições de plena assepsia, em meio nutritivo artificial, e vêm sendo utilizadas com sucesso em diversos objetivos como a obtenção de mudas sadias em diversas espécies e como apoio a programas de melhoramento genético. O objetivo do trabalho foi verificar o meio de cultivo mais adequado para o estabelecimento *in vitro* de gemas apicais de figueira provenientes do campo. Foram utilizadas gemas apicais de figueira cv. 'Roxo de Valinhos' seleção Gigante. O experimento foi constituído pelos seguintes tratamentos: T1 ( $\frac{1}{2}$  MS), T2 (MS), T3 ( $\frac{1}{2}$  WPM) e T4 (WPM). Os explantes foram avaliados 60 dias após a incubação. Verificou-se a percentagem de gemas desenvolvidas, determinadas a partir da avaliação visual do aparecimento de folhas e gemas laterais. Os meios de cultura WPM e MS/2 proporcionam a maior percentagem de gemas apicais de figueira crescidas.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Ficus carica* L.; Gema apical; Meio de cultura; Micropropagação.

### DIFFERENT NUTRITIONAL MEANS *IN VITRO* ESTABLISHMENT OF FIG TREE

#### ABSTRACT

The plant tissue culture comprises a set of techniques in which an explant (cell, tissue or organ) is isolated and grown under full asepsis in artificial nutrient medium, and have been successfully used in several goals such as obtaining seedlings sound in several species and how to support the breeding programs. The objective was to

determine the most suitable culture medium for in vitro establishment of apical buds from the field of fig. Apical buds were fig cv. 'Purple Valinhos' Giant selection. The experiment comprised the following treatments: T1 ( $\frac{1}{2}$  MS), T2 (MS), T3 ( $\frac{1}{2}$  WPM) and T4 (WPM). The explants were evaluated 60 days after incubation. There was the percentage of buds developed, determined from visual examination of the emergence of leaves and lateral buds. The means of WPM and MS/2 provided the greatest proportion of apical buds grown fig.

**KEYWORDS:** Apical bud; Culture medium; *Ficus carica* L.; Micropropagation.

## INTRODUÇÃO

A figueira é cultivada comercialmente no Brasil desde o início do século passado, mais precisamente a partir de 1910, na cidade paulista de Valinhos. A cultura possui boas perspectivas de expansão, principalmente nos Estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Minas Gerais, devido ao crescente interesse na produção de figos para a industrialização (NORBERTO et al., 2001). No Brasil, o cultivo da figueira baseia-se praticamente na plantação de um único cultivar, o Roxo de Valinhos, caracterizado pelo seu elevado vigor e produtividade (FRÁGUAS, 2004).

Segundo FRÁGUAS (2004), em consequência as amplas possibilidades de produção e comercialização do figo tanto no mercado interno como externo, há necessidade de aperfeiçoamento das técnicas de plantio aliada a obtenção de mudas sadias isentas de patógenos, favorecendo a formação de frutos de qualidade.

Entre os métodos de propagação da figueira, a estaquia é a técnica mais difundida, no entanto, os índices de enraizamento dependem de uma série de fatores, dentre eles, da época de coleta das estacas, da posição do ramo coletado, do tratamento com fitoreguladores e a cultivar ou espécie (OHLAND et al., 2009). Assim, a cultura de tecidos vegetais, que compreende um conjunto de técnicas nas quais um explante (célula, tecido ou órgão) é isolado e cultivado sob condições de plena assepsia, em meio nutritivo artificial, vêm sendo utilizadas com sucesso em diversos objetivos como a obtenção de mudas sadias em diversas espécies e como apoio a programas de melhoramento genético como na figueira (CALDAS et al., 1998).

Os vários tipos de respostas morfogênicas in vitro apresentadas por diferentes espécies fazem com que seja necessário o estabelecimento de condições padronizadas de cultivo para cada uma delas e para seus genótipos e tipos de explantes. Portanto, a escolha adequada do meio nutritivo e a padronização das condições de cultivo constituem etapas relevantes no processo de estabelecimento in vitro da cultura (RADMAN et al., 2009). De acordo com GEORGE et al. (2008), a composição do meio de cultura e os fatores ambientais podem resultar na intensificação das respostas morfogênicas, bem como em maior número de explantes responsivos.

Diante do exposto acima, objetivou-se verificar o meio de cultura mais adequado para o estabelecimento in vitro de gemas apicais de figueira provenientes do campo.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia da à Faculdade de Engenharia da UNESP Campus de Ilha Solteira – SP. Foram utilizadas gemas apicais de figueira cv. ‘Roxo de Valinhos’ seleção Gigante, procedentes da coleção do campo experimental da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão da Faculdade de Engenharia da UNESP, localizada em Selvíria – MS (20°20’28.96” de latitude Sul e 51°24’08.66” de longitude Oeste com altitude média de 367 m).

No campo, os ápices caulinares foram coletados, com aproximadamente dez cm de comprimento, com o auxílio de tesoura, e armazenados em recipientes com água até cobrir todo o material coletado. No laboratório, os ápices caulinares foram mantidos em recipiente com água corrente e dez gotas de detergente neutro durante 30 minutos. Após a lavagem em água corrente as gemas apicais foram seccionadas com bisturi esterilizado permitindo assim a redução de seu tamanho a aproximadamente um cm de comprimento para posteriores tratamentos de assepsia.

Antes da montagem do experimento foram feitos testes piloto (dados não apresentados) para a assepsia das gemas apicais já seccionadas, e com base nestes foi estabelecido um pré-tratamento, onde fora da câmara de fluxo laminar, os explantes foram: 1º) imersos em etanol 70% durante um minuto, lavados três vezes com água destilada autoclavada; 2º) imersos em uma solução de 2 g L<sup>-1</sup> de methiltiofan (fungicida) + 250 mg L<sup>-1</sup> de cloranfenicol (antibiótico) durante cinco minutos e lavados três vezes com água destilada autoclavada; 3º) na sequência os explantes foram imersos durante cinco minutos em 250 mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico + 250 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, em seguida já em ambiente asséptico, dentro da câmara de fluxo laminar, as gemas foram imersas em hipoclorito de sódio 2,5 % (v/v) durante 15 minutos e por último enxaguadas pelo menos três vezes com água destilada autoclavada e em seguida inoculadas no meio de cultura.

O experimento foi constituído pelos seguintes tratamentos: T1 (½ MS), T2 (MS), T3 (½ WPM) e T4 (WPM) (MURASHIGE & SKOOG, 1962; LLOYD & MCCOWN, 1980 – Tabela 01). Todos os tratamentos foram suplementados com 200 mg L<sup>-1</sup> de ampicilina sódica, com pH ajustado para 5,7 ± 0,1 esterilizados por autoclavagem (121 °C com 1, 05 kgf cm<sup>-2</sup>, por 20 minutos). A ampicilina sódica foi adicionada ao meio de cultura após a autoclavagem, dentro da câmara de fluxo laminar.

A fase de estabelecimento foi realizada em sala de crescimento com temperatura de 22 ± 3 °C. Os explantes foram mantidos durante os quatro primeiros dias no escuro e em seguida em fotoperíodo de 16 horas de luz a uma intensidade luminosa de 30 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Os explantes foram avaliados 60 dias após a incubação por meio das características de gemas crescidas, determinadas a partir da avaliação visual do aparecimento de folhas e gemas laterais.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos, cinco repetições e dez tubos por repetição. A significância do efeito dos tratamentos foi determinada por meio do Teste F, sendo as médias comparadas pelo Teste de Scott Knot (p<0,05).

**TABELA 01** - Composição dos meios nutritivos MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), ½ MS, ½ WPM e WPM (LLOYD e MCCOWN, 1980)\*.

	½MS(mg L <sup>-1</sup> )	½WPM(mgL <sup>-1</sup> )	½WPM(mg L <sup>-1</sup> )	WPM(mg L <sup>-1</sup> )
<b>Macronutrientes</b>				
Ca(NaO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	-	-	278,000	556,000
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825,000	1.650,000	200,000	400,000
KO <sub>3</sub>	950,000	1.900,000	-	-
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	220,000	440,000	48,000	96,000
MgSo <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	185,000	370,000	185,000	370,000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85,00	170,000	85,000	170,000
<b>Micronutrientes</b>				
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	11,150	22,300	11,1500	22,300
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4,300	8,600	4,300	8,600
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,100	6,200	3,100	6,200
KI	0,415	0,830	-	-
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,125	0,250	0,125	0,250
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,012	0,025	0,012	0,025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,012	0,025	-	-
<b>Ferro-EDTA</b>				
Na <sub>2</sub> EDTA	18,620	37,250	18,620	37,250
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	13,925	27,850	13,925	27,850
<b>Vitaminas</b>				
Tiamina-HCl	0,050	0,100	0,050	0,100
Piridoxina-HCl	0,250	0,500	0,250	0,500
Ácido Nicotínico	0,250	0,500	0,250	0,500
Glicina	1,000	2,000	1,000	2,000

\* Dados adaptados de Xavier et al. (2007).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pode-se observar que houve diferença entre os diferentes meios de cultura utilizados para o estabelecimento *in vitro* das gemas apicais de figueira ( $p < 0,05$ ) (Tabela 02).

As maiores percentagens de gemas crescidas foram propiciadas pelos meios WPM (100% dos sais e vitaminas) e MS/2 (50% dos sais e vitaminas), com médias de gemas crescidas de 72 e 68% respectivamente. Os tratamentos WPM/2 (50% dos sais e vitaminas) e MS (100% dos sais e vitaminas) propiciaram as menores percentagens de gemas desenvolvidas, com médias de 36 e 52% respectivamente, não diferindo entre si (Tabela 02).

Vários autores têm relatado a possibilidade de reduzir a concentração de sais do meio MS, para diversas espécies, visando ao melhor desenvolvimento das plantas e redução nos custos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; BRUM, 2002).

**TABELA 02** - Gemas apicais de figueira (*Ficus carica* L.) cv. 'Roxo de Valinhos' seleção Gigante crescidas após a incubação em diferentes meios de cultura. Ilha Solteira – SP, 2010.

Tratamentos (Diferentes meios de cultura)	Gemas apicais Desenvolvidas (%)
MS/2	68 a
MS	52 b
WPM/2	36 c
WPM	72 a

Valores seguidos por letras iguais na vertical, não diferem entre si pelo teste de Scot Knott ( $p < 0,05$ )

Segundo SAADAT & HENNERTY (2002), os meios de cultura utilizados nos estágios de estabelecimento da cultura e multiplicação são similares, pois ambos possuem em suas formulações macronutrientes, micronutrientes, carboidratos, geralmente a sacarose, e alguns compostos orgânicos como vitaminas e aminoácidos. Entretanto, o meio de cultura WPM possui menores concentrações de sais (especialmente nitrogênio e potássio) quando comparado ao meio MS, o qual contém altas concentrações de sais, sobretudo os íons nitrato e amônio. De acordo com HARRY & THORPE (1994) geralmente o meio WPM é mais eficiente em espécies lenhosas.

Em estudos realizados por GOLLE et al. (2012) os meios  $\frac{1}{2}$  MS e WPM são apropriados para o cultivo *in vitro* de segmentos nodais e gemas apicais de *Eugenia involucrata* D.C. FERMINO JÚNIOR et al. (2014) verificaram que o meio de cultura WPM é mais eficiente na multiplicação *in vitro* de brotos de *Tectona grandis* L. assim como REZENDE et al. (2008) e JESUS et al. 2010 constataram que o meio WPM foi mais eficiente para o desenvolvimento de plântulas de cafeeiro *in vitro*.

FRÁGUAS (2003) testou diferentes concentrações do meio WPM (50, 100 e 200%) na multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* "Roxo de Valinhos", observando que concentração padrão do WPM (100%) foi a mais eficiente para o desenvolvimento dos explantes. De acordo com a autora, plantas lenhosas usadas na micropropagação podem ser afetadas pela presença excessiva de componentes do meio nutritivo que conduzem a desordem metabólica e morfológica. Algumas espécies, quando cultivadas *in vitro* são suscetíveis a uma reação de hipersensibilidade às condições de estresse do meio, desenvolvendo variações anormais como a vitrificação, assinalada por desordens fisiológicas generalizadas, comum em algumas espécies de plantas lenhosas onde ocorre a adição de altas concentrações de íons ao meio de cultura, podendo em casos extremos levar à morte da cultura (ZIMMERMAN, 1984).

## CONCLUSÕES

Os meios de cultura WPM e MS/2 proporcionam a maior percentagem de gemas apicais de figueira crescidas.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (Unesp) – Campus de Ilha Solteira –SP, por proporcionar o Doutorado e suporte ao trabalho.

## REFERÊNCIAS

- BRUM, G. R.; SILVA, A. B.; PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na propagação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.26, n.2, p.1403-1409, 2002.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E.; Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI, 1998. v.1, p.87-132.
- FERMINO JUNIOR, P. C. P.; RAPOSO, A.; NAGAO, E. O.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Efeito de diferentes citocininas e sistema de cultura dupla-fase na micropropagação de Teca (*Tectona grandis* L.) estabelecida na Amazônia Sul-Occidental. **Evidência**, Joaçaba v. 14 n. 1, p. 7-20, 2014.
- FRÁGUAS, C.B. **Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira “Roxo de Valinhos” em diferentes ambientes**. 2003. 110f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, 2003.
- FRÁGUAS, C. B.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R. Multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L.: efeito da cinetina e do ácido giberélico. **Ciência Agrotécnica**, v. 28, n. 1, p.49-55, 2004.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. Dordrecht, 2008.
- GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; LÉON, E. A. B. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC: influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 207-214, 2012.
- JESUS M. A. S.; CARVALHO S. P.; VILLA, F.; PASQUAL, M.; CARVALHO, M. Desenvolvimento *in vitro* de brotações de cafeeiro em diferentes meios de cultura e reguladores de crescimento de planta. **Scientia Agraria**, v.11, n.1, p.431-436, 2010.
- HARRY, I. S.; THORPE, T. A. Regeneration of plantlets through organogenesis from matures embryos of jack pine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, New York, v.37, n.2, p.159-164, 1994.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings of International Plant Propagators’ Society**, Seattle, v.30, n.1, p.421-427, 1980.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.1, p.473-497, 1962.
- NORBERTO, P. M.; CHALFUN, N. N. J.; PASQUAL, M.; VEIGA, R. D.; PEREIRA, G. E.; MOTA, J. H. Efeito da época de estaquia e do AIB no enraizamento de estacas

de figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.3, p.533-541, 2001.

OHLAND, T.; PIO, R.; CHAGAS, E.A.; BARBOSA, W.; KOTZ, T.E.; DANELUZ, S. Enraizamento de estacas apicais de figueira 'Roxo de Valinhos' em função de época de coleta e AIB. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, p.74-78, 2009.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 74 p.

RADMANN, E. B.; BIANCHI, V. J.; OLIVEIRA, R. P de; FACHINELLO, J. C. Multiplicação *in vitro* e alongamento das brotações micropropagadas do porta-enxerto 'Tsukuba 1' (*Prunus persica* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.31, n.3, p. 656-663, 2009.

REZENDE, J.; PASQUAL, M.; CARVALHO, S. P.; PEREIRA, A. R.; VILLA, F. Influência do meio de cultura e concentração de ágar no crescimento e desenvolvimento de plântulas de café oriundas da embriogênese somática direta. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.9, n.1, p.21-26, 2008.

SAADAT Y. A.; HENNERTY, M. J. Factors affecting shoot multiplication of Persian walnut (*Juglans regia* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.95, n.1, p.257-260-2002.

XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. **Biotecnologia florestal**. Viçosa, MG: UFV, cap.3, 2007, p.57– 74.

ZIMMERMAN, R .H. Apple. In: SHARP, W. R.; EVANS, D. A.; AMMIRATO, P. V; YAMADA, U. **Handbook of plant cell culture**, New York, v.2, n.1, p.369-395, 1984.