

DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO DE REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE EXPLANTES FOLIARES DE AMEIXEIRA cv. 'AMÉRICA'

THUROW, Liane Bahr^{1*}; BANDEIRA, Juliana de Magalhães¹; BRAGA, Eugenia Jacira Bolacel¹; PETERS, José Antonio¹; BIANCHI, Valmor João¹

*1-Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Departamento de Botânica – IB/UFPeI, Campus Universitário, Caixa Postal 354, CEP 96010-900, *(lianepel@yahoo.com.br)*

1. INTRODUÇÃO

A ameixeira japonesa (*Prunus salicina*, Lindl.) é uma das frutíferas que mais se difundiu pelo mundo, sendo cultivada em locais de diferentes condições climáticas, em decorrência das várias cultivares existentes e devido as hibridizações ocorridas ao longo do desenvolvimento da cultura (Embrapa, 2005). A produção brasileira não atende a demanda interna dessa fruta e dentre os fatores limitantes do aumento da produção de ameixas encontram-se a susceptibilidade das cultivares à *Xylella fastidiosa* e a auto-incompatibilidade gametofítica (Takayama & Isogai, 2005), determinando a necessidade de desenvolvimento de novas cultivares para superar estas dificuldades. Como o melhoramento convencional é oneroso e consome muito tempo, técnicas biotecnológicas como a cultura de tecidos de plantas, que está alicerçada no fenômeno da totipotência das células vegetais, podem contribuir para o melhoramento desta espécie (Giacometti, 1990; Kerbauy, 1999). Os avanços dessa tecnologia têm ampliado as perspectivas de aplicação em diversos campos do melhoramento de plantas, principalmente nos trabalhos de transformação genética (Davies, 1995).

Um dos principais fatores que controlam os processos morfogênicos de regeneração *in vitro* são os fitorreguladores, principalmente o balanço auxina/citocinina. A adição de fitorreguladores tem como principal objetivo suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta matriz (Grattapaglia & Machado, 1998). Outro fator que influencia a regeneração é o tipo de explante utilizado, pois eles apresentam diferentes tipos de células e graus de diferenciação, logo, em alguns tecidos e/ou células ela é mais facilmente induzida (Kerbauy, 1999). Segundo Tian et al. (2007), a falta de conhecimento a respeito da regeneração *in vitro* de espécies de ameixeira seria um fator limitante para a eficiência da transformação genética, tornando-se extremamente necessário o desenvolvimento de um protocolo eficiente de regeneração a partir de tecidos somáticos de plantas desenvolvidas *in vitro*.

Diante do pressuposto, o presente trabalho tem por objetivo desenvolver um protocolo para regenerar brotações de explantes foliares de *Prunus salicina* (Lindl.) cv. 'América' para futuros trabalhos de transformação genética.

2. METODOLOGIA

Como fonte de explantes foram utilizadas folhas de brotações obtidas através da cultura de meristemas e multiplicadas em meio MS com 0,3 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina). Antes da excisão das folhas, as brotações foram transferidas para meio MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de AG₃ (ácido giberélico), 0,1 mg L⁻¹ de AIB (ácido indolbutírico) e 1,0 g L⁻¹ de carvão vegetal ativado visando o alongamento dos entrenós e maior crescimento das folhas. Para os testes de regeneração foram utilizados dois tipos de explantes foliares: um constituído por folhas inteiras escarificadas na nervura central, colocadas com as faces abaxial e adaxial em contato com o meio, perfazendo dois níveis do fator, e outro constituído apenas pelo terço basal das folhas, com a face abaxial em contato com o meio de cultivo. Os explantes foram inoculados em placas de petri contendo meio MS suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de BAP e diferentes concentrações de 2,4-D (ácido 2,4-dichlorophenoxyacético) (1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹), solidificados com 2,0 g L⁻¹ de gelrite após o pH ter sido ajustado para 5,8. As placas foram mantidas no escuro por 30 dias e posteriormente transferidas para luz (42 µmol m⁻² s⁻¹ de densidade de fluxo de fótons e fotoperíodo de 16 horas de luz). Os explantes foram transferidos para meios frescos a cada 20 dias. Aos 20 e 40 dias após o início do experimento, os explantes foram avaliados quanto ao número de calos formados, número médio de calos por explantes, percentagem de explantes com calo e tipos de calos mais freqüentes para cada tratamento. Os explantes foram então transferidos para meio MS contendo zero; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ de TDZ (Thidiazuron), visando a obtenção de brotações.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com fatorial de 3x3, totalizando nove tratamentos com duas repetições por tratamentos, cada um representado por uma placa de petri contendo 20 explantes. Realizou-se análise de variância dos dados e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade de erro, utilizando o software WinStat 2.0 (Machado & Conceição, 2003).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação ao número médio de calos por explante, ocorreu uma interação significativa entre as concentrações de 2,4-D e os tipos de explantes utilizados, observando-se que quanto menor a concentração de 2,4-D maior foi a indução de calos por explante. A maior média de calos, tanto na primeira (8) quanto na segunda avaliação (20), foi obtida na concentração de 1 mg L⁻¹ de 2,4-D, quando utilizado explantes de folhas inteiras com a face adaxial em contato com o meio. Também foi possível observar diferenças significativas deste para os demais tratamentos (Figuras 1A e 1B).

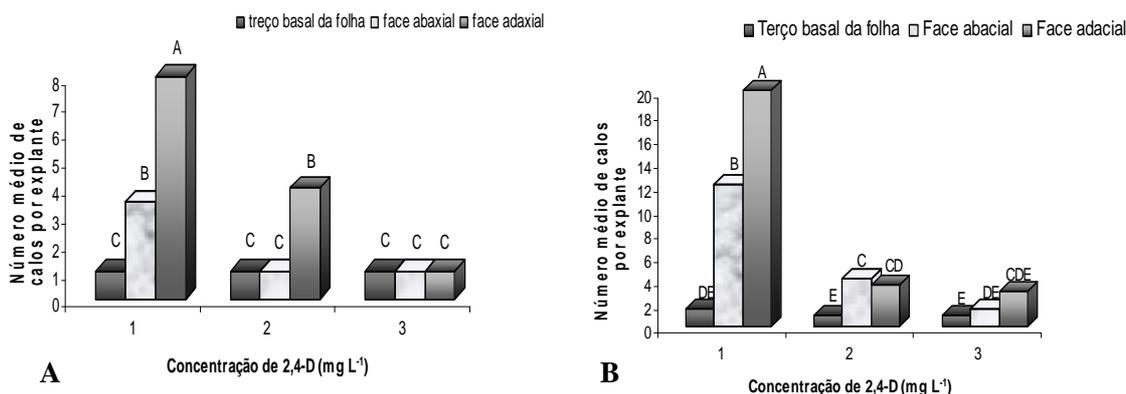


Figura 1- Número médio de calos por explantes foliares de ameixeira (*Prunus salicina* Lindl.) 'América' aos 20 (A) e 40 (B) dias de cultivo no meio MS suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de BAP e diferentes concentrações de 2,4-D (1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹). Letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

Foi observado maior formação de calos na porção basal das folhas semelhantemente ao encontrado por Gless et al. (1998) em folhas de aveia. De acordo com Palú et al. (2004), o aumento da produção de calos em cultivar de café ocorreu até a concentração de 2 mg L⁻¹ de 2,4-D, demonstrando que existe um limiar, assim como no presente trabalho que foi de 1 mg L⁻¹. Ferreira et al. (2001) demonstraram que a adição de baixas concentrações de 2,4-D, induzem calos em cupuaçu, sendo sua eficiência aumentada pela adição de ANA (ácido α -naftalenoacético).

Para a porcentagem de explantes com calos não houve interação significativa entre os tratamentos, ocorrendo entretanto, efeitos significativos quando avaliados separadamente. Observou-se um comportamento decrescente para todos os tipos de explantes foliares (Figura 2A e 2C). As maiores porcentagens de explantes com formação de calos foram encontradas no meio com adição de 1mg L⁻¹ de 2,4-D (86,39% na primeira avaliação e 96,67% na segunda). Por outro lado ocorreu maior porcentagem de calos em folhas inteiras e inoculadas com o lado adaxial em contato com o meio (Figura 2B e 2D), com percentuais de 67,78% na primeira avaliação, cujo valor diferiu estatisticamente apenas das folhas com a face abaxial em contato com o meio (40,0%) e 95,55%, na segunda, a qual diferiu dos demais explantes foliares.

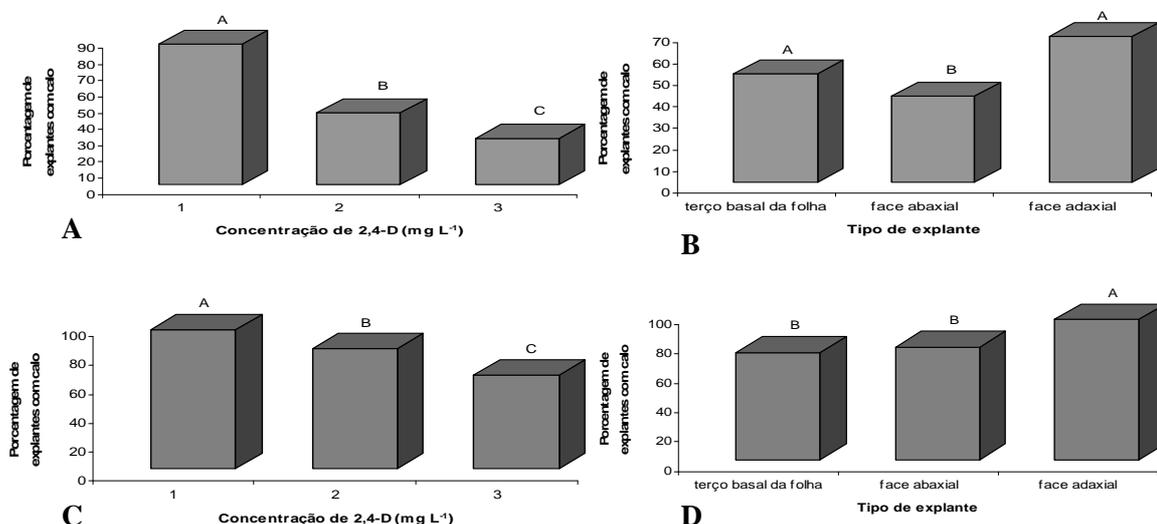


Figura 2- Porcentagem de explantes foliares de ameixeira (*Prunus salicina* Lindl.) 'América' com formação de calos, aos 20 (A, B) e 40 (C, D) dias de cultivo em meio MS com 0,5 mg L⁻¹ de BAP de acordo com a concentração de 2,4-D (1,0; 2,0 e 3,0 mg L⁻¹) utilizada (A, C) e de acordo com o tipo de explante foliar (terço basal da folha, folha inteira com a face abaxial e adaxial em contato com o meio) (B, D). Letras diferentes diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

O número de calos formados na base do pecíolo e na nervura central não foi significativo estatisticamente para nenhum dos fatores analisados. Já o número de calos formados no limbo foliar apresentou diferença significativa para concentração de 2,4-D e tipo de explante utilizado, não havendo interação entre os fatores. O maior número de calos formados no limbo foliar foi no tratamento com 2 mg L⁻¹ de 2,4-D (12,89) sendo que o explante foliar que apresentou o maior número de calos no limbo foliar foram as folhas inteiras com a face abaxial em contato com o meio (14,17), diferindo do explante em que foi utilizado apenas o terço basal da folha.

Os calos transferidos para meio MS suplementados com TDZ oxidaram e não desenvolveram nenhuma estrutura organogênica. Desta forma, tornam-se necessários mais estudos com a finalidade de regenerar folhas de ameixeira japonesa cv. 'América'.

4. CONCLUSÃO

Nas condições em que foram conduzidos os experimentos, pode-se concluir que:

Meio MS com 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D induz maior formação de calos em folhas de ameixeira japonesa cv. 'América';

Folhas inteiras inoculadas com a face adaxial em contato com o meio desenvolvem maior porcentagem de calos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DAVIES, P. J. The plant hormones: their nature, occurrences and functions. In: DAVIES, P. J. (Ed). **Plant hormones, physiology, biochemistry and molecular biology**, v.1, p.1-13, 1995.
- EMBRAPA. Identificação varietal e genotipagem – serviços oferecidos pelo Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Uva e Vinho. **Comunicado Técnico 64** (Luis Fernando Revers, Carlos Alberto Ely Machado). ISSN 1808-6802. Dezembro, 2005.
- FERREIRA, M. G. R.; CÁRDENAS, F. E. N.; CARVALHO, C. H. S.; CARNEIRO, A. A.; DAMIÃO FILHO, C. F. Desenvolvimento de calos em explantes de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) em função da concentração de auxinas e do meio líquido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n.3, p.473-476, 2001.
- GIACOMETTI, D. C. Impacto atual da cultura de tecidos de plantas. In TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**, p.19-28, 1990.
- GLESS, C.; LÖRZ, H.; GÄRTNER-JÄHNE, A. Establishment of a highly efficient regeneration system from leaf base segments of oat (*Avena sativa* L.). **Plant Cell Reports**, v.17, p.441-445, 1998.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, v.1, p.183-260, 1998.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, v. 2, p. 519-531, 1999.

MACHADO, A. A.; CONCEIÇÃO, A. R. **Sistema de análise estatística para Windows**. Winstat. Versão 2.0. UFPel, 2003.

PALÚ, E. G.; SILVA, A. B.; PASQUAL, M. Calogênese *in vitro* em anteras de *Coffea arabica* L. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.4, p.736-742, 2004.

TAKAYAMA, S.; ISOGAI, A. Self-Incompatibility in Plants. **Annual Rev. Plant Biology**, v.56, p.467-489, 2005.

TIAN, L; SIBBALD, S.; SUBRAMANIAN, J.; SVIRCEV, A. Characterization of *Prunus domestica* L. *in vitro* regeneration via hypocotyls. **Scientia Horticulturae**, v.112, p.462–466, 2007.