

REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE AMEIXEIRA JAPONESA 'AMÉRICA' A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES

THUROW, Liane Bahr¹*; BANDEIRA, Juliana de Magalhães¹; ARGE, Luiz Willian Pacheco¹; PETERS, José Antonio¹; BIANCHI, Valmor João¹.

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

1- INTRODUÇÃO

O melhoramento genético de plantas via transformação necessita que as células ou tecidos transformados sejam regenerados e que haja expressão do transgene(s) na planta, produzindo o fenótipo de interesse. Desta forma, um eficiente sistema de regeneração *in vitro* é indispensável quando se quer fazer uso desta estratégia no melhoramento, uma vez que o controle da morfogênese é influenciado por fatores como espécie, cultivar, tipo de explante, componentes nutricionais do meio, reguladores de crescimento e ambiente de cultivo (Rao et al., 1996).

Em ameixeira (*Prunus* spp.), a falta de conhecimento à respeito da regeneração *in vitro* é limitante para a transformação genética, tornando-se necessário o desenvolvimento de um protocolo eficiente de regeneração a partir de tecidos somáticos de plantas desenvolvidas *in vitro* (Tian et al., 2007). A organogênese direta é o sistema mais adequado, pois evita a ocorrência de escapes e diminui a possibilidade de variação somaclonal, porém é o que apresenta as maiores dificuldades para a regeneração de células transformadas (Tzifira et al., 1997).

Dentre as espécies de clima temperado cultivadas no Brasil, a ameixeira japonesa (*Prunus salicina* Lindl.), é uma das frutíferas de maior difusão nos últimos anos, principalmente, pela demanda do mercado. No entanto, a produção nacional ainda é pequena e insuficiente para suprir tal demanda, devido a vários fatores que limitam o aumento da produção nacional desta fruta, como a falta de cultivares produtivas e adaptadas às condições climáticas das diversas regiões produtoras, a susceptibilidade à *Xylella fastidiosa* e, principalmente, a auto-incompatibilidade gametofítica (Takayama; Isogai, 2005). O desenvolvimento de cultivares de ameixas autoférteis poderia contribuir significativamente para o aumento da produção dessa frutífera. Entre as potenciais estratégias para a obtenção de material autofértil está a transformação genética de cultivares que possuem excelente qualidade de frutos, visando o silenciamento de genes envolvidos na incompatibilidade gametofítica. Para isso, o estabelecimento de protocolos eficientes de multiplicação e regeneração se fazem necessários.

Sendo assim, desenvolveu-se este trabalho com o objetivo de estabelecer um protocolo para regeneração de explantes foliares de *P. salicina* cultivar 'América', visando futuros trabalhos de transformação genética buscando o silenciamento de alelos determinantes da autoincompatibilidade, para obtenção de plantas autoférteis.

2- MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, do Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, da Universidade Federal de Pelotas. O terço basal de folhas oriundas de brotações cultivadas *in vitro*, no meio MS (Murashige; Skoog, 1962) com 0,3 mg L⁻¹ de BAP, foi utilizado com fonte de

explante. O experimento de regeneração constou da utilização de meio MS suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftaleno acético) e concentrações de TDZ (tidiadzuron) (0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹), solidificados com 2,0 g L⁻¹ de gelrite, em pH 5,8. Os explantes foram inoculados com a face abaxial em contato com o meio de cultivo, o qual foi renovado a cada 20 dias. As placas de petri foram mantidas no escuro em sala de crescimento a 25±2°C.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto de quatro unidades experimentais representadas por placas de petri contendo 10 explantes foliares cada.

As avaliações foram realizadas a cada 20 dias, sendo levado em consideração o aspecto das culturas, porcentagem de explantes com calos, número médio de calos por explante, porcentagem de regeneração e número médio de brotações regenerantes. Os resultados foram submetidos a análise de variância e de regressão polinomial, através do software WinStat 2.0 (Machado; Conceição, 2003). Quando necessário, os dados das variáveis discretas foram transformados em $(x+k)^{1/2}$, onde $k=1$, se $x>15$ ou $k=0,5$, se $0<x<15$ e os valores expressos em percentuais foram transformados em $\arcsen(x/100)^{1/2}$.

As brotações regeneradas foram transferidas para meio MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de 2iP (isopentenil adenina) e mantidas no escuro por mais 15 dias aproximadamente (completando 100 dias de cultivo). Após o período de escuro, as brotações foram transferidas para fotoperíodo de 16 horas e 42 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de densidade de fluxo de fótons. Depois que as brotações regeneradas se tornaram clorofiladas foram transferidas para o meio de multiplicação (MS adicionado de 0,3 mg L⁻¹ de BAP).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após 60 dias de cultivo nos meios de regeneração, verificou-se diferenças significativas para a porcentagem de calos por explantes e número médio de calos por explantes. Ambas variáveis apresentaram uma resposta linear crescente pela análise de regressão (Figura 1A e 1B).

De acordo com a equação polinomial para a porcentagem de explantes com formação de calos, o valor máximo calculado através dos dados transformados foi de 1,03% o que representa 70,05% dos valores destransformados na concentração de 4 mg L⁻¹ de TDZ (Figura 1A). Na ausência de reguladores de crescimento não ocorreu formação de calos, enquanto que com 1 mg L⁻¹ de TDZ foi observada pouca formação de calos com aspecto pulverulento, estes, após as sucessivas repicagens, oxidaram, revelando uma baixa responsividade dos explantes de ameixeira cultivados nesta concentração de TDZ, diferentemente dos resultados obtidos por Shibli e Smith (1996), os quais registraram 75% de regeneração a partir de explantes foliares de mirtilheiro, utilizando apenas 0,6 mg L⁻¹ de TDZ. Na regeneração de explantes foliares de macieira, Sarwar e Skirvin (1997) também obtiveram boa formação de calo utilizando entre 0,44 e 0,66 mg L⁻¹ de TDZ.

O número médio de calos por explante foi de no máximo 1,9 na concentração de 4 mg L⁻¹ de TDZ, avaliado pela equação polinomial dos dados transformados, (Figura 1B), o que representa uma média de três calos por explante em valores destransformados. Resultados semelhantes foram obtidos por De Bondt et al. (1996), os quais verificaram melhores resposta de regeneração de explantes foliares de macieira 'Jonagold' em concentrações mais elevadas de TDZ, próximas a 5,0 mg

L⁻¹. De acordo com Kim et al. (1997), a utilização de TDZ em concentrações entre 5 e 10 mg L⁻¹ o número de brotações regeneradas é grande, porém pouco alongadas.

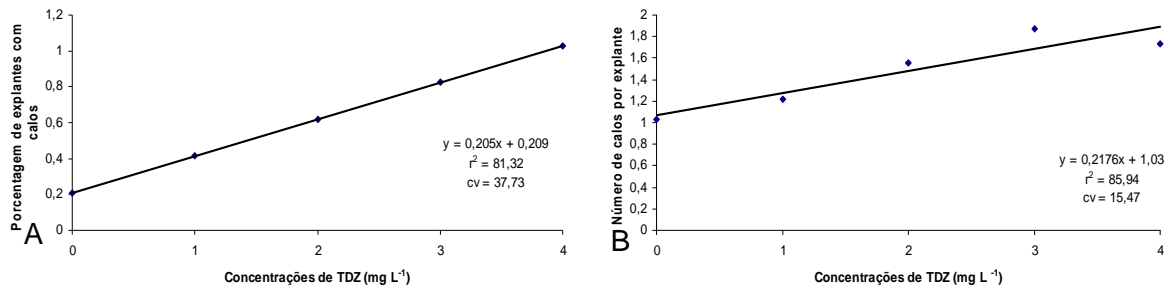


Figura 1 - Percentagem de explantes foliares de ameixeira japonesa, cultivar América, com formação de calos [dados transformados para arcsen $(x/100)^{1/2}$] (A) e número médio de calos por explante [dados transformados para $(x+0,5)^{1/2}$] (B), cultivados em meio MS com 0,5 mg L⁻¹ de ANA e diferentes concentrações de TDZ, após 60 dias de cultivo. UFPel, 2010.

Apesar da tendência linear crescente observada para a variável número de calos formados, o maior valor numérico foi observado com explantes cultivados em meio com 3 mg L⁻¹ de TDZ, porém na concentração de 4 mg L⁻¹ de TDZ houve regeneração de brotações a partir de um único explante foliar, na extremidade excisada do pecíolo, após 85 dias de cultivo (Figuras 2A e 2B). Estas brotações foram transferidas para o meio MS acrescido de 1 mg L⁻¹ de 2iP. Após 15 dias nesse novo meio (100 dias de cultivo), a cultura foi exposta a luz para que as brotações se tornassem clorofiladas e alongassem (Figuras 2C e 2D). Após 130 dias de cultivo as brotações se apresentaram completamente clorofiladas (Figura 2E) e um único explante regenerou dez brotações (Figura 2 F), as quais foram transferidas para o meio de multiplicação. Entretanto, estas brotações oxidaram após 145 dias de cultivo.

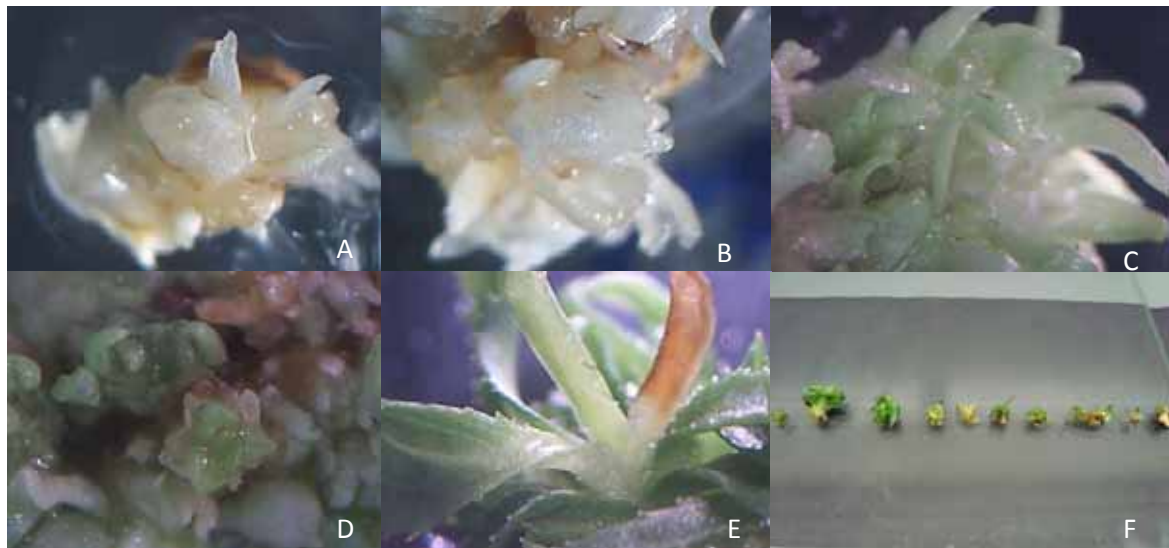


Figura 2: Brotações de ameixeira japonesa, cultivar América, regeneradas a partir de explantes foliares após 85 dias de cultivo no meio MS acrescido de 0,5 mg L⁻¹ de ANA e 4 mg L⁻¹ de TDZ, mantidas no escuro (A e B); brotações transferidas para o meio MS com 1 mg L⁻¹ de 2iP, parcialmente clorofiladas, após terem sido expostos à luz (C e D), e brotações prontas para serem repicadas e multiplicadas para o meio MS com 0,3 mg L⁻¹ de BAP, após 130 dias de cultivo (E e F). UFPel, 2010.

4- CONCLUSÕES

Em condições similares as que foram conduzidas o presente trabalho, a utilização de 4 mg L⁻¹ de TDZ é mais adequada para regeneração de explantes de ameixeira cv. América, pois foi o único tratamento que proporcionou responsividade dos explantes.

Estudos complementares, utilizando 4 mg L⁻¹ de TDZ e variando outros fatores do meio de cultivo se fazem necessários para melhorar a eficiência do processo de regeneração de explantes de ameixeira japonesa (*Prunus salicina*), cv. América.

5- REFERÊNCIAS

DE BONDT, A.; EGGERMONT, K.; PENNINGCKX, I.; GODERIS, I.; BROEKAERT, W.F. Agrobacterium-mediated transformation of apple (*Malus domestica* Borkh): and assessment of factors affecting regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 15, p. 549-554, 1996.

KIM, M.S.; SCHUMANN, C.M.; KLOPFENSTEIN, N.B. Effects of thidiazuron and benzyladenine on axillary shoot proliferation of three green ash (*Fraxinus pennsylvanica* Marsh.) clones. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 48, p. 45-52, 1997.

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

RAO, C.D.; GOH, C.J.; KUMAR, P.P. High frequency adventitious shoot regeneration from excised leaves of *Pawlonia* spp. cultured in vitro. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, p. 204-209, 1996.

SARWAR, M.; SKIRVIN, R.M. Effect of thidiazuron and 6-benzylaminopurine on adventitious shoot regeneration from leaves of three strains of McIntosh apple (*Mallus domestica* Borkh.) in vitro. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 68, p. 95-100, 1997.

SHIBLI, R.A.; SMITH, M.A.L. Direct shoot regeneration from *Vaccinium pahalae* (ohelo) and *V. myrtillus* (Bilberry) leaf explants. **HortScience**, Alexandria, v. 31, n. 7, p. 1225-1228, 1996.

TAKAYAMA, S.; ISOGAI, A. Self-Incompatibility in Plants. **Annual Review of 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.

TZFIRA, T.; JENSEN, C.S.; VAINSTEIN, A.; ALTMAN, A. Transformation and regeneration of transgenic aspen plants via shoot formation from stem explants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 99, p. 554-561, 1997.