

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



Dissertação

**Regeneração e transformação genética do portaenxerto de macieira,
Marubakaido (*Malus prunifolia*, Willd Borhk)**

Daiane Tereza Silva

Pelotas, 2014

Daiane Tereza Silva

**Regeneração e transformação genética do portaenxerto de macieira,
Marubakaido (*Malus prunifolia*, Willd Borhk)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Peters

Co-Orientadores: Prof. Dr. Paulo Celso de Mello-Farias

Prof. Dr. Valmor João Bianchi

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB 10/1032
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

S586r

Silva, Daiane Tereza

Regeneração e transformação genética do portaenxerto de macieira, Marubakaido (*Malus prunifolia*, Willd Borhk) / Daiane Tereza Silva. – 61f.: il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2014. – Orientador José Antonio Peters; co-orientador Paulo Celso de Mello-Farias e Valmor João Bianchi.

1.Biologia. 2.Fisiologia vegetal. 3.Maçã. 4.Brotações. 5.Meio de cultura. 6.Higromicina. 7.*Malus prunifolia*. I.Peters, José Antonio. II.Mello-Farias, Paulo Celso de. III.Bianchi, Valmor João. IV.Título

CDD: 634.11

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Antonio Peters - Orientador

Dr. Leonardo Ferreira Dutra

Dra. Daiane de Pinho Benemann

À minha família...

*Meus pais Helvécio e Elisabeth, meu irmão Douglas,
minha cunhada Patricia e minha sobrinha Laura;*

*Ao Anderson e todos que torceram para esta
conquista, que acreditaram em mim, me apoiando e
incentivando, nesta etapa importante da minha vida.*

Dedico

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de estar vivenciando momentos de realizações em minha vida; a meus pais, Helvecio e Elisabeth que me acompanharam, apoiaram e proporcionaram carinho todo esse tempo. Pelo incentivo moral que me proporcionaram um valioso tempo de obtenção de valores, amizades e conhecimentos que adquiri nesses anos de mestrado.

Ao professor e orientador Dr. José Antonio Peters, que me aceitou e confiou em meu trabalho, discutindo de forma amigável todos os contratempos que passamos nesses dois anos, sendo assim um mestre e conselheiro durante essa jornada, me proporcionando todos os meios para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Aos amigos do LCTP, especialmente a Rosane, Cristina, Natalia, Vania, Mauricio, sempre almoçando às 11 da manhã. A todos do grupo da fisiologia vegetal, foram momentos tensos e alegres que passamos juntos, porém todos inesquecíveis. Aos amigos que fiz em Pelotas, Fernanda, Gustavo, Monalize, todos amantes do bom e velho rock. Obrigada pelas festas inesquecíveis, pelas conversas e todas as aventuras, alegrias e angustias que passamos juntos por todo esse tempo.

Ao meu irmão e cunhada, Douglas e Patricia, que sempre me incentivaram e deram muito carinho. Ao meu namorado Anderson Augusto Schock, por estar sempre ao meu lado, estando eu, triste ou feliz. Você é um excelente companheiro que me dá força em todo momento e situação!

Aos meus gatos Cher, Roger e Pequena que me proporcionam a compreensão do mundo animal e do amor incondicional. Obrigada por me animarem sempre que vou pra casa, me oferecendo momentos muito felizes.

À minha sobrinha Laura, que deu outro sentido na minha vida, proporcionando os melhores momentos desta. Não há palavras que traduzam o tamanho do amor que sinto por esta pessoinha linda e sapeca que é a minha lalinha.

*“Anyone who stops learning is old, whether at twenty or eighty.
Anyone who keeps learning stays young. The greatest thing in
life is to keep your mind young.”
(Henry Ford)*

RESUMO

SILVA, Daiane Tereza. **Regeneração e transformação genética do portaenxerto de macieira, Marubakaido (*Malus prunifolia*, Willd Borhk)**. 2014. 60f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS.

Os primeiros cultivos de macieira no Brasil iniciaram-se no final da década de 60 e início da década de 70. A qualidade do material disponível para o plantio naquela época era baixa, visto que os principais produtores desta fruta, como a Europa e os Estados Unidos, apenas iniciavam programas de limpeza clonal, e com isso ocorreram introduções de materiais infectados por vírus e similares. Nos últimos anos a cultura da macieira assumiu grande importância sócio-econômica no Brasil, especialmente no Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Entretanto a qualidade das mudas importadas e produzidas no país ainda não é satisfatória. Introduções recentes de materiais propagativos provenientes dos Estados Unidos, Europa e Japão, mostraram-se parcialmente infectadas por vírus latentes, conforme análises do Laboratório de Virologia da Embrapa Uva e Vinho. Os Vírus são responsáveis por danos em todas as fases de desenvolvimento da macieira, pois interferem nos processos fisiológicos necessários para o metabolismo e crescimento normal da planta. A produção de plantas resistentes a vírus é fundamental para alcançar um nível de produtividade desejada. Por isso, o desenvolvimento de protocolos de regeneração e transformação é relevante para obtenção destas plantas. Os objetivos deste trabalho foram o de desenvolver protocolos de regeneração e transformação para a obtenção de plantas de macieira, cultivar Marubakaido, com resistência a vírus latentes (ASGV e ACLSV). Para a realização dos experimentos foram utilizados explantes foliares, submetidos a diferentes meios de regeneração, com Benzilaminopurina (BAP) e Thidiazuron (TDZ), em concentrações de 2, 3 e 5 mg L⁻¹, bem como Ácido Indolilbutírico (AIB) em concentrações de 0,2 e 0,3 mg L⁻¹. Também foram testadas as fontes do explante, assim como o efeito da exposição dos explantes foliares ao escuro, na percentagem de explantes regenerados e no número de brotações por explante. Folhas oriundas de brotações recém-enraizadas *in vitro* apresentam altas taxas de regeneração e a exposição ao escuro por 20 dias no início do processo, aumentam a taxa de regeneração e o número de brotações, respectivamente. Nos experimentos de transformação avaliou-se a resistência dos tecidos da cultivar Marubakaido ao antibiótico higromicina, pré-cultivo dos explantes em meio de regeneração líquido e o efeito do escuro por duas semanas em relação à eficiência da transformação. Observou-se alta sensibilidade a higromicina (5 mg L⁻¹) e o pré-cultivo dos explantes foliares, antes da infecção, afeta a sobrevivência dos mesmos após o processo de transformação; a exposição a um período de escuro após o processo de transformação melhora a resposta dos explantes. A ausência do plasmídeo na *Agrobacterium tumefaciens* foi o fator determinante para o insucesso dos protocolos testados neste portaenxerto de macieira.

Palavras-chave: *Malus prunifolia*, brotações, meios de cultura, higromicina.

Abstract

SILVA, Daiane Tereza. **Regeneration and genetic transformation of the apple rootstock, Marubakaido (*Malus prunifolia*, Willd Borhk).** 2014. 60p. Dissertation (Master's degree in Plant Physiology) – Graduate Program in Plant Physiology, Institute of Biology, Federal University of Pelotas, Pelotas/RS.

The first apple crops in Brazil began in late 60s and early 70s. The quality of available planting materials was low, since main producers of this fruit, such as Europe and United States, just initiated clonal cleaning programs, and thus were issues of the infected material by viruses and similar. In recent years apple tree culture took great socio-economic importance in Brazil, especially in Rio Grande do Sul and Santa Catarina. However the quality of seedlings imported and produced in the country is still not satisfactory. Recent introductions of propagative materials from United States, Europe and Japan have shown to partially infected with latent viruses, as analyzes of Virology Laboratory of Embrapa Grape and Wine. Viruses are responsible for damage at all stages of development of apple tree, they interfere in the necessary physiological processes for metabolism and normal growth of the plant. The production of virus resistant plants is critical to achieve a desired level of productivity. Therefore, the development of regeneration and transformation protocols is relevant for obtaining such plants. The objectives of this work were to develop protocols for regeneration and transformation to obtain apple plants, Marubakaido cultivar, with resistance to latent viruses (ASGV and ACLSV). For experiments leaf explants were subjected to different regeneration media with benzylaminopurine (BAP) and Thidiazuron (TDZ) at concentrations of 2, 3 and 5 mg L⁻¹ and indolebutyricacid (IBA) at concentrations of 0.2 and 0.3 mg L⁻¹. We also tested explant sources, as well as the effect of exposure of leaf explants to dark, the percentage of regenerated explants and number of shoots per explant. Leaves derived from newly rooted shoots *in vitro* have high regeneration rates and dark exposure for 20 days at the beginning of process, increase the regeneration rate and shoots number, respectively. In transformation experiments evaluated the resistance of Marubakaido tissues to hygromycin antibiotic, pre-culture of explants on the regeneration medium liquid and the effect of dark for two weeks with regard to the transformation efficiency. There was a high sensitivity to hygromycin (5 mg L⁻¹), and the pre-cultivation of leaf explants prior to infection, affect their survival after the transformation process; exposure to a dark period after the transformation process improves the response of the explants. The absence of plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* was the determining factor for failure of tested protocols in this apple rootstock.

Keywords: *Malus prunifolia*, shoots, culture media, hygromycin.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 Brotações e plantas do portaenxerto de macieira, Marubakaido. A) Brotações desenvolvidas em meio de multiplicação (MS + 0,8 mg L⁻¹ de BAP). B) Brotações desenvolvidas em meio de multiplicação com carvão ativado (MS + 0,8 mg L⁻¹ de BAP + 1 g L⁻¹ de carvão ativado). C) Plantas desenvolvidas em meio de enraizamento (MS 50% + 0,5 mg L⁻¹ de AIB)..... 22
- Figura 2 Percentagem de calos do portaenxerto 'Marubakaido' em meio de cultura MS com diferentes concentrações dos reguladores de crescimento BAP e TDZ após 40 dias de cultivo. 1- 2 mg L⁻¹ TDZ + 0,2 mg L⁻¹ AIB, 2- 2 mg L⁻¹ BAP + 0,2 mg L⁻¹ AIB, 3- 3 mg L⁻¹ TDZ + 0,2 mg L⁻¹ AIB, 4- 3 mg L⁻¹ BAP + 0,2 mg L⁻¹ AIB, 5- 5 mg L⁻¹ TDZ + 0,3 mg L⁻¹ AIB e 6- 5 mg L⁻¹ BAP + 0,3 mg L⁻¹ AIB. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%..... 24
- Figura 3 Percentagem de explantes regenerantes do portaenxerto 'Marubakaido' em meio de cultura MS com diferentes concentrações dos reguladores de crescimento BAP e TDZ após 40 dias de cultivo. 1- 2 mg L⁻¹ TDZ + 0,2 mg L⁻¹ AIB, 2- 2 mg L⁻¹ BAP + 0,2 mg L⁻¹ AIB, 3- 3 mg L⁻¹ TDZ + 0,2 mg L⁻¹ AIB, 4- 3 mg L⁻¹ BAP + 0,2 mg L⁻¹ AIB, 5- 5 mg L⁻¹ TDZ + 0,3 mg L⁻¹ AIB e 6- 5 mg L⁻¹ BAP + 0,3 mg L⁻¹ AIB. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%..... 25
- Figura 4 Brotações e explantes foliares regenerantes do portaenxerto 'Marubakaido'. A) Brotações desenvolvidas em meio de multiplicação (MS + 0,8 mg L⁻¹ de BAP). B) Explante foliar proveniente do meio de multiplicação e regeneração em meio MS contendo 5,0 mg L⁻¹ TDZ + 0,3 mg L⁻¹ AIB. C) Explante foliar

	oriundo do meio de enraizamento ($\frac{1}{2}$ MS + 0,5 mg L ⁻¹ AIB) e regeneração em meio MS contendo 3,0 mg L ⁻¹ BAP + 0,2 mg L ⁻¹ AIB.....	26
Figura 5	Percentagem de calos e de explantes regenerantes do portaenxerto ‘Marubakaido’ em meio de cultura MS com os reguladores de crescimento BAP e TDZ após 40 dias de cultivo. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.....	27
Figura 6	Percentagem de formação de calos e de explantes regenerantes do portaenxerto ‘Marubakaido’ em meio de cultura MS com diferentes reguladores (BAP e TDZ) após 40 dias de cultivo. Letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre si para a fonte do explante e letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si para o regulador de crescimento pelo teste de Tukey a 5%.....	29
Figura 7	Regeneração de brotações do portaenxerto ‘Marubakaido’ em explantes foliares, aos 40 dias em meio de regeneração. A) Explante proveniente do meio de multiplicação e meio com 3 mg L ⁻¹ TDZ + 0,2 mg L ⁻¹ AIB. B) Explante oriundo do meio de multiplicação com carvão ativado e meio com 3 mg L ⁻¹ TDZ + 0,2 mg L ⁻¹ AIB. C) Explante proveniente do meio de enraizamento e meio com 3 mg L ⁻¹ TDZ + 0,2 mg L ⁻¹ AIB. D) Explante oriundo do meio de multiplicação e meio com 3 mg L ⁻¹ BAP + 0,2 mg L ⁻¹ AIB. E) Explante proveniente do meio de multiplicação com carvão ativado e meio com 3 mg L ⁻¹ BAP + 0,2 mg L ⁻¹ AIB. F) Explante oriundo do meio de enraizamento e meio com 3 mg L ⁻¹ BAP + 0,2 mg L ⁻¹ AIB.....	29
Figura 8	Número médio de brotações por explantes regenerantes do portaenxerto ‘Marubakaido’, em meio de cultura MS com os reguladores de crescimento BAP e TDZ e diferentes fontes de	

explantes. Médias seguidas por letras maiúsculas diferem entre si para o fator fonte do explante, médias seguidas por letras minúsculas diferem entre si para o fator regulador de crescimento pelo teste de Tukey a 5%..... 31

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Plasmídeo pCambia1300 em orientação senso e antisenso utilizado para transformação genética do portaenxerto de macieira, Marubakaido..... 44
- Figura 2 Teste de resistência a higromicina em explantes foliares do portaenxerto de macieira, Marubakaido. (A) Controle, 0 mg L⁻¹. (B) 2,5 mg L⁻¹. (C) 5,0 mg L⁻¹. (D) 7,5 mg L⁻¹. (E) 10 mg L⁻¹. (F) 25 mg L⁻¹. (G) 50 mg L⁻¹. (H) 75 mg L⁻¹. (I) 100 mg L⁻¹..... 49
- Figura 3 Explantes foliares e gemas do portaenxerto de macieira, Marubakaido, após a inoculação por *A. tumefaciens* (protocolo 2). (A) Explantes foliares após a infecção em meio de co-cultivo. (B) Controle negativo, com 10 mg L⁻¹ de higromicina. (C) Controle positivo, sem higromicina. (D) Gema infectada por *A. tumefaciens*..... 52
- Figura 4 Eletroforese em gel de agarose, visando à confirmação da ausência do plasmídeo 1300 na 1300 AS+S. Marcador molecular (M), 1300 AS+S (cedida pela EMBRAPA-UVA E VINHO), 3300 AS+S (*Agrobacterium tumefaciens* cedida pela EMBRAPA-UVA E VINHO, não faz parte deste trabalho), 3300 (plasmídeo), 1300 (plasmídeo)..... 53

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1 Composição e identificação dos meios de cultura para regeneração de explantes foliares do portaenxerto de macieira, cultivar Marubakaido..... 21
- Tabela 2 Número médio de brotações por explantes regenerantes do portaenxerto 'Marubakaido', em meio de cultura MS com diferentes concentrações de BAP e TDZ..... 26
- Tabela 3 Número médio de brotações por explantes regenerantes do portaenxerto 'Marubakaido', em meio de cultura MS com diferentes reguladores de crescimento..... 28

CAPÍTULO 2

- Tabela 1 Composição dos meios de co-cultivo e regeneração dos explantes foliares do portaenxerto de macieira, cultivar Marubakaido..... 48
- Tabela 2 Eventos de transformação protocolo 1 com explantes regenerados e multiplicados de macieira, cultivar Marubakaido..... 50
- Tabela 3 Eventos de transformação protocolo 2 com explantes regenerados e multiplicados de macieira, cultivar Marubakaido..... 51
- Tabela 4 Eventos de transformação protocolo 3 com explantes regenerados e multiplicados de macieira, cultivar Marubakaido..... 51

SUMÁRIO

RESUMO	06
ABSTRACT	07
INTRODUÇÃO GERAL	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
CAPÍTULO 1 – Regeneração de brotações do portaenxerto de macieira, cultivar Marubakaido	
INTRODUÇÃO	17
MATERIAL E MÉTODOS	20
RESULTADOS	24
DISCUSSÃO	31
CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
CAPÍTULO 2 – Transformação genética do portaenxerto de macieira, cultivar Marubakaido, mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	
INTRODUÇÃO	41
MATERIAL E MÉTODOS	43
RESULTADOS	49
DISCUSSÃO	53
CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

INTRODUÇÃO GERAL

A macieira pertence à família Rosaceae, sendo originária das montanhas do Cáucaso, Oriente Médio e Leste Asiático. Bastante cultivada na Ásia e Europa desde os tempos mais antigos, hoje é cultivada em várias regiões do mundo (BLEICHER, 2006). A produção mundial de maçãs, em 2012/13, segundo dados do *United States Department of Agriculture* (USDA), será de 67,8 milhões de toneladas, o que a torna, uma das principais frutíferas de clima temperado e a segunda mais produzida no mundo (USDA, 2014). No Brasil, o plantio de macieira está concentrado nos estados da região sul, onde a área plantada ultrapassa 38,5 mil hectares, possuindo uma cadeia produtiva própria, que possibilitou o país passar da posição de importador para exportador (ISPA, 2013).

O Marubakaido (*Malus prunifolia*) é um portaenxerto de macieira de origem japonesa, sendo utilizado na cultura da macieira por apresentar adaptabilidade a diferentes tipos de solos, resistência à *Phytophthora* sp., ao pulgão lanígero e a podridão do colo, ser de fácil propagação por estacas dormentes, produtivo, não apresentar nódulos radiculares e ser vigoroso. É indicado para replantio ou plantio em baixa densidade e pode ser ainda utilizado para plantios adensados mediante a utilização de filtros de cultivares ananizantes, contudo, é sensível a viroses (DENARDI, 2002; GIACOBBO et al., 2003).

No Brasil a cultura da macieira está sujeita ao ataque de inúmeras doenças típicas de clima tropical, devido às condições climáticas que acarretam na diminuição da produção e aumento do uso de bactericidas e fungicidas (PETRI, 2002). Dentre as doenças destacam-se a mancha clorótica foliar e o acanalamento do tronco, que são causadas pelos vírus: “Apple chlorotic leafspot vírus” (ACLSV) e “Apple stem grooving vírus” (ASGV), respectivamente (NICKEL et al., 1999 e 2001). Estes influenciam na produção de mudas, diminuindo a quantidade e qualidade das mesmas, afetando a viabilidade das enxertias, reduzindo a produtividade do pomar devido à menor produção por planta como também o tamanho dos frutos (NICKEL et al., 2001). Plantas infectadas podem ter seu desempenho comprometido por toda vida, pois a produção pode ser reduzida entre 15 e 45% segundo a cultivar e o vírus, sendo que a queda de produção é potencializada por infecções múltiplas. O impacto na produção depende do vírus em combinação com a cultivar, portaenxerto, nutrição e idade da planta (NICKEL, 2004).

Assim, uma das prioridades atuais dos programas de melhoramento, é a obtenção de portaenxertos de macieira com resistência as viroses. Por muitos anos, o único método disponível para a introdução de características de interesse em plantas foi o melhoramento clássico, envolvendo cruzamentos, seguidos pela seleção de plantas com fenótipo desejável (SANTARÉN, 2000). No entanto, os métodos tradicionais de melhoramento demandam longo prazo, pois, depende de vários cruzamentos e ciclos de seleção e também por ser restringido a espécies com reprodução sexuada (MONQUERO, 2005). Tendo em vista as dificuldades decorrentes do melhoramento genético tradicional, as ferramentas biotecnológicas, como a transformação genética, possibilitam a abertura de novas perspectivas aos programas de melhoramento, ampliando e disponibilizando novos genes (PEREIRA et al., 2001).

A transformação genética é o processo de introdução controlada de ácidos nucleicos exógenos em um genoma receptor alterando a estrutura genética de um organismo, sem comprometer a viabilidade celular (SANTARÉN, 2000). Esta é uma técnica que pode auxiliar em programas de melhoramento genético pela introdução de uma nova característica ou a alteração de uma preexistente, em cultivares ou genótipos já melhorados, sem modificar a estrutura genética global da planta e possibilita o uso de alternativas genotípicas desejáveis não encontradas com facilidade na natureza. Plantas transgênicas são também importantes ferramentas para estudos moleculares de função e expressão de genes, de processos fisiológicos e de desenvolvimento vegetal (VALOIS, 2001).

Na transformação genética a introdução de genes de interesse acontece de forma direta ou indireta; a transformação direta consiste no uso de métodos químicos e físicos e, atualmente, as duas principais são a biolística e a eletroporação, no entanto, existem outros métodos como a microinjeção, transformação de pólen e lipossomos. Já a transformação indireta consiste no uso de um vetor, como a *Agrobacterium tumefaciens*, para intermediar a transferência e integração de um fragmento de DNA no genoma das células de plantas infectadas (ANDRADE, 2003).

Sendo assim, para a introdução de genes por transformação genética é necessário à utilização de técnicas de cultura de tecidos, como a micropropagação, para a produção de plantas clonais, pois esta permite a multiplicação e o melhoramento de cultivares específicas e de interesse econômico, como a macieira.

Nesse contexto, para que o processo de transformação seja efetivo, o DNA deve ser introduzido em células ou tecido vegetal apto a regenerar plantas completas, sendo um dos fatores limitantes, a baixa eficiência dos processos de regeneração (SANTARÉN, 2000). Este depende do controle da morfogênese, o qual é influenciado por vários fatores como espécie, cultivar, tipo de explante, componentes nutricionais do meio, reguladores de crescimento e ambiente de cultura (RAO et al., 1996). Durante a regeneração novos órgãos podem se desenvolver a partir de explantes de diferentes partes da planta, como folhas, caules e raízes (MAGYAR-TÁBORI et al., 2010). E esta pode ocorrer por meio de organogênese e embriogênese, as quais podem ser diretas, sem formação de calos, ou indireta, ocorrendo a partir de células do calo na região do corte, antes da formação do órgão (TELLES; BIASI 2005). Contudo, a organogênese direta é a mais desejável quando se espera fidelidade genética, visto que, diminui a ocorrência de variação somaclonal (DHANDAPANI, 2008).

Diante do exposto acima, o presente trabalho objetivou aperfeiçoar o protocolo de regeneração para explantes do portaenxerto de macieira, cv. Marubakaido, visando à obtenção de linhagens transgênicas via *Agrobacterium tumefaciens*, para a resistência aos vírus latentes (ASGV e ACLSV) usando tecnologia de RNA interferente.

Referências bibliográficas

- ANDRADE, S. R. M. de. Transformação de plantas. Planaltina: Embrapa Cerrados. p.28, 2003.
- BLEICHER, J. História da macieira. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis-SC: EPAGRI, 2006. p.29-36.
- DENARDI, F. Porta-enxertos. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis-SC: EPAGRI, 2002. p.169-227.
- DHANDAPANI, M.; KIM, D. H.; HONG, S. B. Efficient plant regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis from the explants of *Catharanthus roseus*. **In Vitro Cellular Developmental Biology Plant**, New York, v.44, n.1, p.18-25, 2008.
- GIACOBBO, C. L.; GOMES, F. R. C.; KROTH, L. L.; CONCEIÇÃO, M. K.; FORTES, G. R. de L. Multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido (*Malus prunifolia* Willd, Borkh) com diferentes níveis de Benzilaminopurina e ácido naftalenacético. **Revista Brasileira de Agrobiologia**, Pelotas, v.9, n.1, p.31-33, jan/mar. 2003.

ISPA, **Informativo da Secretaria de Política Agrícola**. Cenário da cadeia produtiva da maçã. Disponível em: www.agapomi.com.br. Acesso em 31 de jan. 2014.

MAGYAR-TÁBORI, K.; DOBRÁNSZKI, J.; SILVA, J. A. T.; BULLEY, S. M.; HUDÁK, I. The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.101, n.3, p.251-267, jun. 2010.

MONQUERO, P. A. Plantas transgênicas resistentes aos herbicidas: situação e perspectivas. **Bragantia**, Campinas, v.64, n.4, p.517-531, 2005.

NICKEL, O.; JELKMANN, W.; KUHN, G. B. Occurrence of *Apple stem grooving capillovirus* in Santa Catarina, Brazil, detected by RT-PCR. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, n.3, p.444-446, 1999.

NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M.; JELKMANN, W.; KUHN, G. B. Sequence analysis of the capsid protein gene of an isolate of *Apple stem grooving virus*, and its survey in southern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, n.3, p.655-659, set. 2001.

NICKEL, O. Doenças causadas por vírus. In: KOVALESKI, A. (Ed.). **Maçã: fitossanidade**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. p.61-79. (Frutas do Brasil. 38).

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L.; SILVA, J. B. Efeito da aplicação de baixa temperatura em plantas de macieira sobre o crescimento durante a aclimatização. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.1, p.89-95, jan. 2001.

PETRI, J. L. Fatores edafoclimáticos. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis-SC: EPAGRI, 2002. 743p.

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, n.3, p.204-209, 1996.

SANTARÉN, E. R. Métodos eficientes para a transformação genética de plantas. **Revista de Ciência & Tecnologia**, Piracicaba, v.15, p.81-90, jun. 2000.

SILVEIRA, C. A.; CITADIN, I.; FORTES, G. R. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira M-7 (*Malus* sp.) sob diferentes tipos e concentrações de auxinas. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.7, n.2, p.107-109, mai/ago. 2001.

TELLES, C. A.; BIASI, L. A. Organogênese do caquizeiro a partir de ápices meristemáticos, segmentos radiculares e foliares. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.27, n.4, p.581-586, oct/dec. 2005.

USDA, **United States Department of Agriculture**. Disponível em: <<http://usda.org>>. Online. Acesso em 31 jan. 2014.

VALOIS, A. A. A. Importância dos transgênicos para a agricultura. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v.18, n.1, p.27-53, jan/abr. 2001.

CAPÍTULO 1 - Regeneração de brotações do portaenxerto de macieira, cultivar Marubakaido

Introdução

A macieira é uma frutífera lenhosa, que é adaptável a diferentes ecossistemas, crescendo desde os trópicos até altas latitudes. Pertence à família Rosaceae, gênero *Malus*, que abrange mais de 30 espécies espalhadas por todo mundo (IUCHI, 2002). É uma cultura extremamente versátil, podendo as frutas ser consumidas diretamente da árvore ou armazenadas por até um ano em um ambiente controlado. Além disso, podem ser transformadas em bebidas e são ingredientes de bolos, tortas e doces (TIAN et al., 2011). Cultivada em regiões temperadas de ambos os hemisférios (HARRIS et al., 2002), é conseqüentemente, a fruta mais comercializada *in natura* tanto no contexto internacional quanto brasileiro. A cultura da macieira é recente no Brasil e estabeleceu-se a partir da década de 1970 por meio de grandes empresas atraídas por incentivos de políticas públicas (MELLO, 2006).

A produção mundial de maçãs, em 2012/13, segundo dados do *United States Department of Agriculture* (USDA), será de 67,8 milhões de toneladas, das quais a produção chinesa corresponde a 56%. Nas últimas 6 safras, a produção aumentou 53% na China e 10% na União Européia. Em termos mundiais, a produção de maçãs é crescente (28% em 6 anos) (USDA, 2014). A safra nacional 2012/13 de maçã apresentou um volume de 1,37 milhão de toneladas e área colhida de 38,5 mil hectares (IBGE, 2013). A produção de maçãs, no Brasil, está localizada basicamente na região Sul, compreendendo os Estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, que têm respondido por mais de 98% da oferta nacional.

A produção de mudas de macieira baseia-se fundamentalmente no uso da enxertia. O portaenxerto tem fundamental importância, pois este é usado para controlar o vigor da planta, bem como para oferecer resistência a patógenos e adaptação a diferentes tipos de solo (VIEIRA et al., 2007). Sendo assim, inúmeros portaenxertos de macieira clonal pertencentes às categorias de anão, semi-anão e vigoroso têm sido desenvolvidos (NOORMOHAMMADI et al., 2013). Dentre estes, destaca-se o 'Marubakaido', cultivar selvagem de origem japonesa, vigorosa, de alta adaptabilidade a diferentes tipos de solo, fácil propagação por estacas dormentes, muito produtivo, sem nódulos radiculares, resistente a *Phytophthora* spp e ao pulgão

lanífero, mas sensível a viroses. É indicado para replantio ou plantio em baixa densidade (DENARDI, 2002). Pode ainda ser utilizado para plantios adensados mediante a utilização de filtros de portaenxertos ananizantes (GIACOBBO et al., 2003).

Um grande número de vírus infecta a macieira, entre os quais se destacam o “Apple stem grooving vírus” (ASGV) e “Apple chlorotic leafspot vírus” (ACLSV) (NICKEL et al., 1999; 2001). Os vírus influenciam na produção de mudas diminuindo a quantidade e qualidade das mesmas, afetando a viabilidade das enxertias, reduzindo a produtividade do pomar devido a menor produção por planta como também o tamanho dos frutos. Segundo Nickel (2003), a viabilidade de pomares com plantas viróticas é menor, pois são mais sensíveis a doenças fúngicas e isso aumenta a necessidade de agrotóxicos, além de serem mais sensíveis a estresses abióticos (geadas tardias). Esta situação representa um patamar tecnológico incompatível com exigências ambientais e conceitos modernos de sanidade como a certificação de material propagativo.

O melhoramento convencional foi, por muitos anos, o único método disponível para a introdução de características de interesse em plantas, e este envolvia cruzamentos, seguidos pela seleção de plantas com fenótipo desejável. Porém, esse processo provou ser uma tarefa difícil, devido ao longo tempo necessário para as plantas gerarem frutos, elevado grau de autoincompatibilidade e variações amplas no fenótipo (ORAGUZIE et al., 2004), além de terem alto nível de heterozigosidade, o que dificulta e aumenta o tempo necessário para um programa de melhoramento genético por meio do método de hibridização (CABONI et al., 2000). Portanto, para manter a cultura da macieira em nível de produtividade desejada, o emprego de técnicas biotecnológicas, como a transformação, são algumas das alternativas a serem utilizadas.

Neste contexto, a transformação genética é aplicada para melhorar a tolerância ao estresse, modificar hábitos de crescimento, aumentar a qualidade dos frutos e inserir resistência a doenças (GAMBINO; GRIBAUDO, 2012). O sequenciamento recente do genoma da macieira proporcionou o primeiro passo para a inserção de genes desejáveis, para que estas possam ser geneticamente modificadas de forma eficiente (GAMBINO; GRIBAUDO, 2012). Contudo, para a aplicação com sucesso das técnicas de transformação genética, é necessário que as

células ou tecidos transformados sejam regenerados em plantas que expressem o gene introduzido (SCHUCH; PETERS, 2002).

Sendo assim, a transformação genética, depende do controle da morfogênese e vários fatores podem influenciar o sucesso da regeneração de brotos *in vitro*, entre eles a espécie, cultivar, tipo de explante, componentes nutricionais do meio, ambiente de cultivo e reguladores de crescimento, entre os quais o balanço entre auxinas e citocininas tem provado ser um dos mais importantes (GAHAN; GEORGE, 2008; MAGYAR-TABORI et al., 2010). Assim como, a incubação no escuro, que tem um papel crucial na regeneração e tem sido estudada em folhas de macieira (DOBRÁNSZKI; SILVA, 2011; ZHANG et al., 2014), rosas (IBRAHIM; DEBERGH, 2001) e *Buddleia* (DAI; CASTILLO, 2007). A formação de brotações adventícias pode ocorrer diretamente a partir de tecidos do explante excisados sem formação de calos (organogênese direta) ou indiretamente, quando os explantes formam inicialmente calos e destes originam-se gemas e brotações (DOBRÁNSZKI; SILVA, 2010). Contudo, a disponibilidade de um sistema de regeneração direta eficiente é desejável para produzir mínima variação somaclonal, populações clonais homogêneas, e expressão estável de plantas transgênicas nas condições de campo (DAI et al., 2014; JOSHI et al., 2013).

Durante a organogênese adventícia novos órgãos podem se desenvolver a partir de explantes de diferentes partes da planta, como folhas, caules e raízes (MAGYAR-TÁBORI et al., 2010). A organogênese *in vitro* envolve várias alterações bioquímicas e moleculares, como a percepção e transdução dos reguladores de crescimento, rediferenciação após a desdiferenciação de células diferenciadas, organização para órgãos específicos de primórdios e meristemas, entre outros. Este processo depende dos reguladores de crescimento aplicados exogenamente, e habilidade do tecido vegetal para perceber esses reguladores (MAGYAR-TÁBORI et al., 2010). Três fases da organogênese são distinguíveis: (1) Competência ou desdiferenciação: quando as células se tornam capazes de responder a sinais hormonais para a indução de órgãos (HOWELL et al., 2003). Desdiferenciação significa a aquisição de competência organogênica, sendo que um ferimento normalmente desencadeia desdiferenciação em cultura de tecidos; (2) Determinação: quando as células competentes dos explantes são determinadas para a formação de órgãos específicos, sendo esse processo influenciado por um equilíbrio específico de reguladores de crescimento. A partir das células

competentes, a formação de brotações adventícias pode ser induzida por citocininas (GAHAN; GEORGE, 2008). (3) Morfogênese: que segue independentemente dos reguladores adicionados (MAGYAR-TABORI et al., 2010).

As citocininas adicionadas ao meio são muito importantes durante a cultura de tecido porque induzem divisão e morfogênese (HOWELL et al., 2003). Existem duas classes principais de citocininas de acordo com a estrutura química da cadeia lateral: citocininas isoprenoides e aromáticas, as quais diferem na sua bioquímica, receptores, atividade biológica e metabolismo (STADEN et al., 2008). Algumas citocininas, tais como Thidiazuron (TDZ), demonstraram ser efetiva, em plantas lenhosas, para a micropropagação e regeneração de espécies ou genótipos recalcitrantes (MAGYAR-TABORI et al., 2010). Segundo Magyar-Tabori et al. (2010) para a macieira as citocininas mais eficientes são TDZ e Benzilaminopurina (BAP), enquanto outras, Zeatina (Zea), isopentiladenina (2iP), ou cinetina (KIN) são muito menos eficazes.

A regeneração de plantas de macieiras tem sido descrita a partir de diferentes explantes, tais como: folhas (ZHANG et al., 2014), cotilédones (DAI et al., 2014), raízes (YAMASHITA et al., 2004) e entrenós (NOORMOHAMMADI et al., 2013). Martins et al. (2001) estudaram a organogênese de macieira (*Malus* sp.) do portaenxerto M7, utilizando folhas como explante e os resultados evidenciaram que a escarificação e a disposição dos mesmos com a superfície abaxial em contato com o meio proporcionaram maior intensidade de calo, independentemente do meio conter BAP ou CPPU (N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea).

Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo aperfeiçoar o protocolo de regeneração para explantes do portaenxerto de macieira, Marubakaido, visando programas de transformação genética.

Material e Métodos

Material Vegetal

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, do Departamento de Botânica, do Instituto de Biologia, da Universidade Federal de Pelotas, RS. O material *in vitro* fornecido pela EMBRAPA UVA E VINHO, Bento Gonçalves, RS, foi multiplicado e com estes foram realizados três experimentos utilizando explantes foliares de plantas e brotações do portaenxerto de macieira, Marubakaido (*Malus prunifolia*, Willd Borkh).

Metodologia

Os explantes foram folhas retiradas de brotações ou plantas desenvolvidas em meios de multiplicação sem e com carvão ativado e de enraizamento após 20 dias da repicagem. Na fase de multiplicação sem carvão ativado, utilizou-se meio contendo sais minerais de Murashige & Skoog (MS) com nitrato de amônio e nitrato de potássio reduzido a $\frac{3}{4}$, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ ágar, 0,8 mg L⁻¹ de Benzilaminopurina (BAP); na multiplicação com carvão ativado foi utilizada a mesma formulação do meio acima com a adição de 1 g L⁻¹ de carvão ativado. Já na fase de enraizamento o MS foi reduzido a 50% dos sais com exceção de vitaminas e ferro, 20 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar e 0,5 mg L⁻¹ de Ácido Indolilbutírico (AIB). O pH foi ajustado para 5,7 antes da adição do ágar. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 23 ± 2°C, densidade de fluxo de fótons de 40 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

Para a regeneração de brotações foram utilizados seis tratamentos, conforme descritos na Tabela 1. Os sais minerais e os constituintes orgânicos utilizados foram os mesmos do meio MS e a estes foram acrescentados 30 g L⁻¹ de sorbitol e os reguladores de crescimento BAP ou TDZ e AIB em diferentes concentrações. Os meios tiveram o pH ajustado para 5,7 e após adicionou-se 2 g L⁻¹ de Phytigel. Posteriormente foram autoclavados durante 20 minutos à temperatura de 121°C e 1,5 atm e distribuídos 25 mL de cada meio de cultura em placas de Petri descartáveis.

Tabela 1 – Composição e identificação dos meios de cultura para regeneração de explantes foliares do portaenxerto de macieira, cultivar Marubakaido.

Identificação do meio	BAP (mg L ⁻¹)	TDZ (mg L ⁻¹)	AIB (mg L ⁻¹)
1	0	2	0,2
2	2	0	0,2
3	0	3	0,2
4	3	0	0,2
5	0	5	0,3
6	5	0	0,3

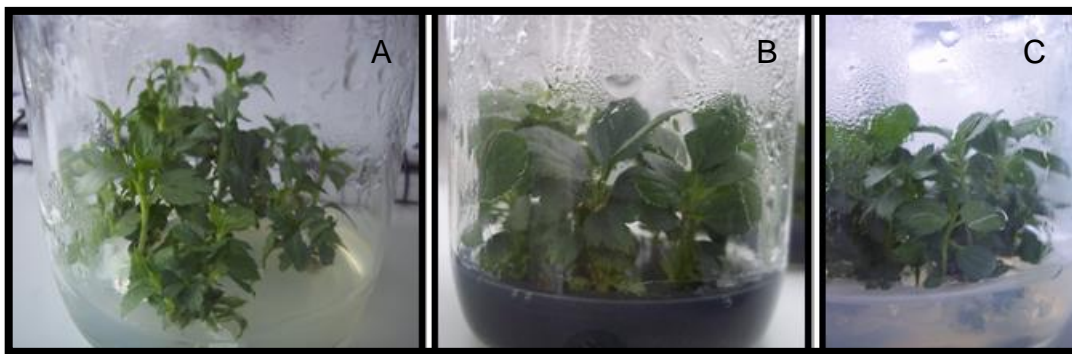


Figura 1 – Brotações e plantas do portaenxerto de macieira, Marubakaido. A) Brotações desenvolvidas em meio de multiplicação (MS + 0,8 mg L⁻¹ de BAP). B) Brotações desenvolvidas em meio de multiplicação com carvão ativado (MS + 0,8 mg L⁻¹ de BAP + 1 g L⁻¹ de carvão ativado). C) Plantas desenvolvidas em meio de enraizamento (MS 50% + 0,5 mg L⁻¹ de AIB).

Experimento 1 – Efeito de diferentes concentrações dos reguladores de crescimento em explantes foliares provenientes de brotações desenvolvidas em meio de multiplicação

Os explantes foram retirados de brotações em meio de multiplicação sem carvão (Figura 1A), sendo constituídos por folhas inteiras, escarificadas em três locais na nervura central e dispostas com o lado abaxial em contato com os meios de regeneração citados acima (Tabela 1). Foram inoculados cinco explantes em cada placa e estes permaneceram 40 dias em sala de crescimento, com temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os explantes foram transferidos para meios novos a cada 20 dias.

O experimento foi conduzido em delineamento completamente casualizado, com seis tratamentos e dez repetições, sendo cada repetição composta por cinco explantes.

Experimento 2 – Efeito dos reguladores de crescimento BAP e TDZ em explantes foliares provenientes de plantas desenvolvidas em meio de enraizamento

Os explantes foram retirados de plantas enraizadas *in vitro* (Figura 1C), sendo constituídos por folhas inteiras, escarificadas em três locais na nervura central e dispostas com o lado abaxial em contato com os meios de regeneração 3 e 4 citados

acima (Tabela 1). Foram inoculados cinco explantes em cada placa e estes permaneceram sob as mesmas condições do experimento anterior, sendo transferidos para meios novos a cada 20 dias.

O experimento foi conduzido em delineamento completamente casualizado, com dois tratamentos e dez repetições, sendo cada repetição composta por cinco explantes.

Experimento 3 – Efeito do escuro e dos reguladores de crescimento BAP e TDZ em explantes foliares provenientes de diferentes meios

Os explantes foram retirados de brotações provenientes de meios de multiplicação com e sem carvão ativado e de plantas desenvolvidas em meio de enraizamento (Figura 1). Utilizaram-se como explante, folhas inteiras, escarificadas em três locais na nervura central e dispostas com o lado abaxial em contato com os meios de regeneração 3 e 4 citados acima (Tabela 1). Foram inoculados dez explantes em cada placa e estes permaneceram 20 dias em câmara de crescimento com temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ausência completa de luz. Posteriormente foram transferidos para meio novo, fotoperíodo de 16 horas e $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de densidade de fluxo de fótons, onde permaneceram durante mais 20 dias. O experimento foi conduzido em delineamento completamente casualizado, com dois tratamentos e três repetições, sendo cada repetição composta por dez explantes.

Variáveis analisadas e tratamento estatístico

As variáveis analisadas nos três experimentos foram percentagem de formação de calos, percentagem de explantes regenerantes e o número médio de brotações por explante regenerante. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey, com 5% de probabilidade de erro, utilizando o programa WinStat 1.0 (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2007).

Resultados

Experimento 1 – Efeito de diferentes concentrações dos reguladores de crescimento em explantes foliares provenientes de brotações desenvolvidas em meio de multiplicação

Com relação à percentagem de explantes com calos, verificou-se significância para as diferentes concentrações dos reguladores de crescimento BAP e TDZ. A análise desta variável evidenciou que nos tratamentos 3 (3,0 mg L⁻¹ de TDZ e 0,2 mg L⁻¹ de AIB) e 4 (3,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,2 mg L⁻¹ de AIB), foi obtido 90% e 100%, respectivamente (Figura 2), sendo superior aos demais tratamentos, embora não ocorrendo diferenças significativas entre os tratamentos 2 e 6 (86% e 80% respectivamente). Menor indução de calos ocorreu no tratamento 5 [5,0 mg L⁻¹ de TDZ e 0,3 mg L⁻¹ de AIB (SEONG et al., 2005)] com 57%, que não diferiu dos tratamentos 1 (62,5%) e 6. A formação de calos não é desejável neste trabalho, pois os explantes que formam calos não regeneram.

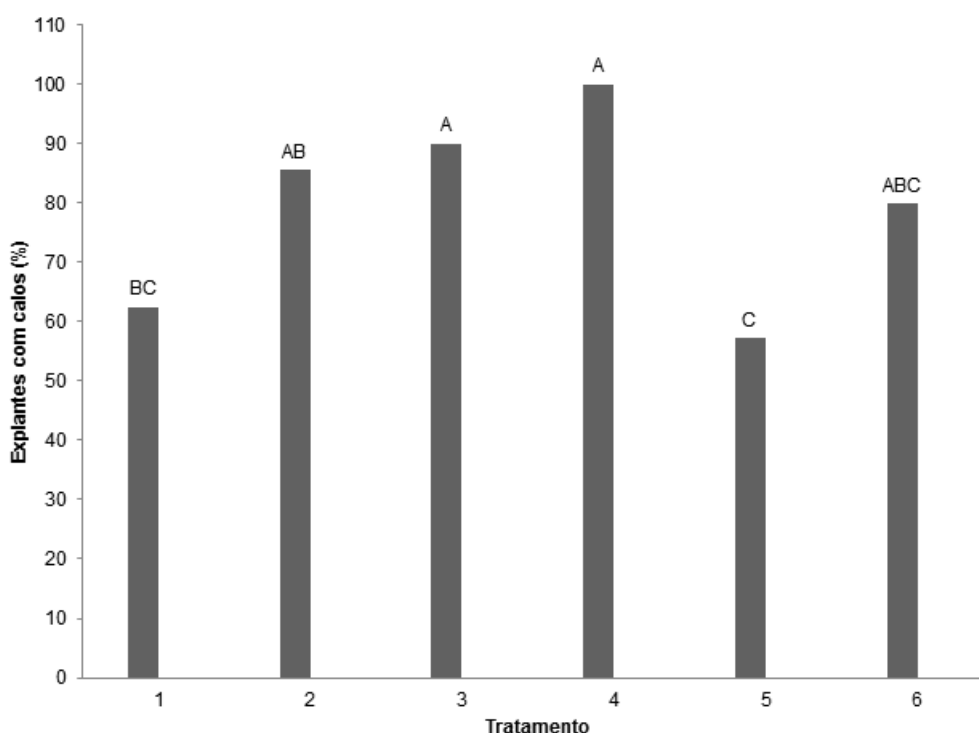


Figura 2 – Percentagem de calos do portaenxerto ‘Marubakaido’ em meio de cultura MS com diferentes concentrações dos reguladores de crescimento BAP e TDZ após 40 dias de cultivo. 1- 2 mg L⁻¹ TDZ + 0,2 mg L⁻¹ AIB, 2- 2 mg L⁻¹ BAP + 0,2 mg L⁻¹ AIB, 3- 3 mg L⁻¹ TDZ + 0,2 mg L⁻¹ AIB, 4- 3 mg L⁻¹ BAP + 0,2 mg L⁻¹ AIB, 5- 5 mg L⁻¹ TDZ + 0,3 mg L⁻¹ AIB e 6- 5 mg L⁻¹ BAP + 0,3 mg L⁻¹ AIB. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

A percentagem de explantes regenerantes, critério importante neste tipo de estudo, diferiu significativamente entre os tratamentos (Figura 3). As respostas mais significativas foram obtidas com os meios 1 (2,0 mg L⁻¹ de TDZ e 0,2 mg L⁻¹ de AIB) e 5 (5,0 mg L⁻¹ de TDZ e 0,3 mg L⁻¹ de AIB) com 43% e 51% de regenerantes, respectivamente. Os tratamentos 3, 2 e 6 (com 10%, 17% e 19% de explantes regenerantes respectivamente) foram significativamente inferiores quanto a esta variável; o tratamento 4 não apresentou explantes com brotações e/ou gemas.

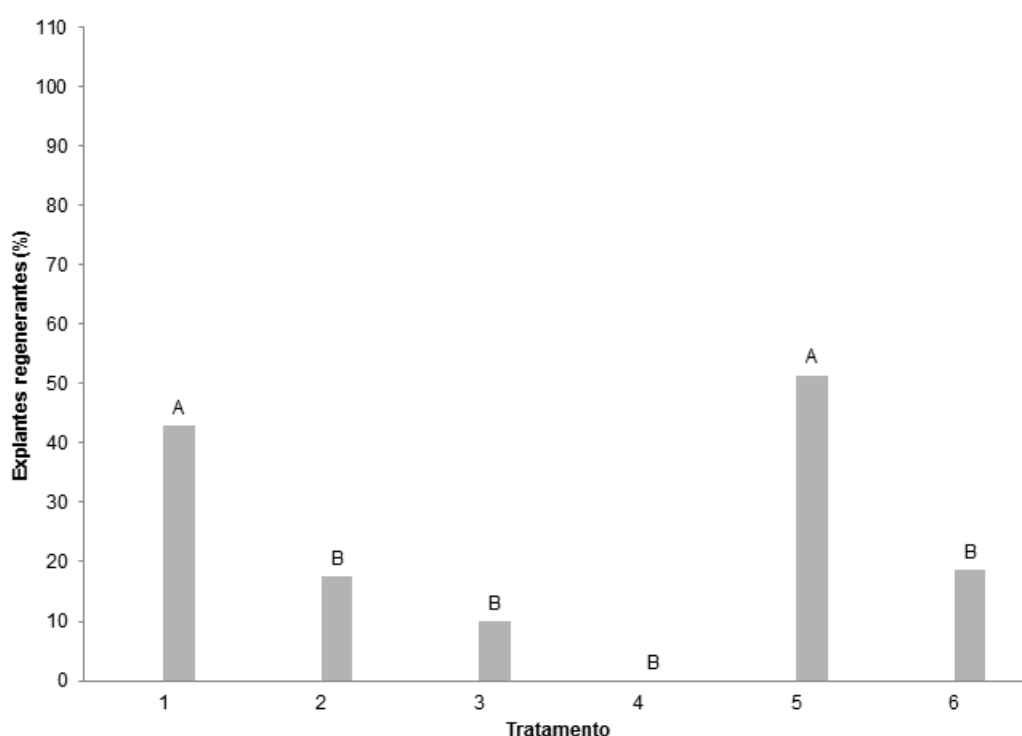


Figura 3 – Percentagem de explantes regenerantes do portaenxerto ‘Marubakaido’ em meio de cultura MS com diferentes concentrações dos reguladores de crescimento BAP e TDZ após 40 dias de cultivo. 1- 2 mg L⁻¹ TDZ + 0,2 mg L⁻¹ AIB, 2- 2 mg L⁻¹ BAP + 0,2 mg L⁻¹ AIB, 3- 3 mg L⁻¹ TDZ + 0,2 mg L⁻¹ AIB, 4- 3 mg L⁻¹ BAP + 0,2 mg L⁻¹ AIB, 5- 5 mg L⁻¹ TDZ + 0,3 mg L⁻¹ AIB e 6- 5 mg L⁻¹ BAP + 0,3 mg L⁻¹ AIB. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

A análise da variância para o número médio de brotações por explantes regenerantes evidenciou que o tratamento com mais alto percentual de explantes regenerados, tratamento 5 (Figura 4B), também determinou a maior média para o número de brotações (3,5 brotações/regenerantes), embora não tenha diferido dos tratamentos 1, 3 e 6, que apresentaram, respectivamente, 2,4, 2,6 e 2,9 brotações/explantes regenerantes (Tabela 2). Deste modo, o tratamento 5 (5 mg L⁻¹

TDZ + 0,3 mg L⁻¹ AIB) induz maior taxa de regeneração e número médio de brotações por explante regenerante de folhas provenientes de brotações em meio de multiplicação sem carvão ativado, entretanto, as brotações originadas apresentaram alto grau de hiperidricidade. Conjuntamente, as folhas provenientes da multiplicação sem carvão ativado mostraram-se frágeis e pequenas ocorrendo à morte de vários explantes.

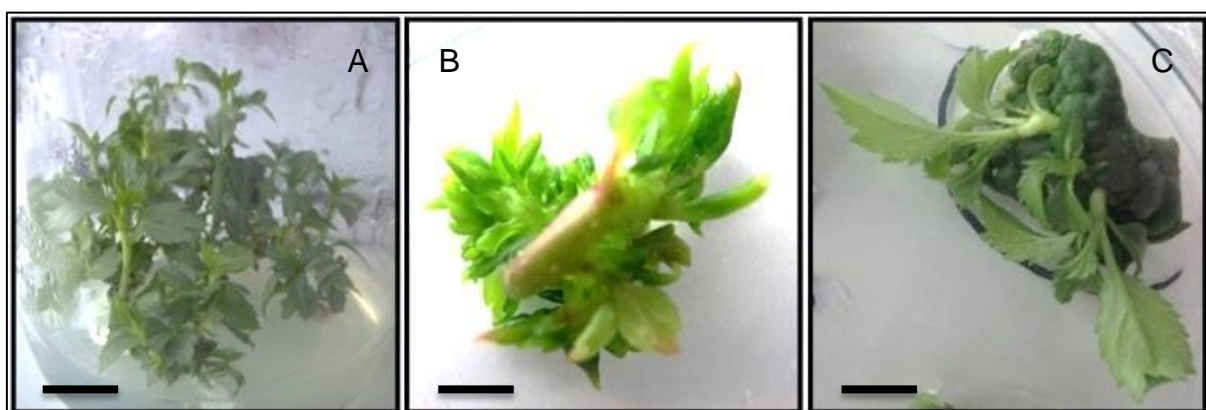


Figura 4 – Brotações e explantes foliares regenerantes do portaenxerto 'Marubakaido'. A) Brotações desenvolvidas em meio de multiplicação (MS + 0,8 mg L⁻¹ de BAP). B) Explante foliar proveniente do meio de multiplicação e regeneração em meio MS contendo 5,0 mg L⁻¹ TDZ + 0,3 mg L⁻¹ AIB. C) Explante foliar oriundo do meio de enraizamento (½MS + 0,5 mg L⁻¹ AIB) e regeneração em meio MS contendo 3,0 mg L⁻¹ BAP + 0,2 mg L⁻¹ AIB.

Tabela 2 – Número médio de brotações por explantes regenerantes do portaenxerto 'Marubakaido', em meio de cultura MS com diferentes concentrações de BAP e TDZ.

Meio de cultura	Número médio de brotações
1 - 2 mg L ⁻¹ TDZ + 0,2 mg L ⁻¹ AIB	2,4 ab
2 - 2 mg L ⁻¹ BAP + 0,2 mg L ⁻¹ AIB	2,0 b
3 - 3 mg L ⁻¹ TDZ + 0,2 mg L ⁻¹ AIB	2,6 ab
4 - 3 mg L ⁻¹ BAP + 0,2 mg L ⁻¹ AIB	0,0 c
5 - 5 mg L ⁻¹ TDZ + 0,3 mg L ⁻¹ AIB	3,5 a
6 - 5 mg L ⁻¹ BAP + 0,3 mg L ⁻¹ AIB	2,9 ab
C.V.(%)	31,40

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Experimento 2 – Efeito dos reguladores de crescimento BAP e TDZ em explantes foliares provenientes de plantas desenvolvidas em meio de enraizamento

Foram testadas folhas oriundas de brotações enraizadas, pois estas se apresentavam com maior área e espessura. Os dados da análise de variância deste tipo de explante e dos dois meios de cultura diferiram estatisticamente para a percentagem de calos e explantes regenerantes (Figura 5). Os explantes cultivados no meio com $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ de TDZ apresentaram maior percentagem de calos (56%) em relação ao meio com mesma concentração de BAP (32%). Já para a variável, explantes regenerantes, o meio contendo BAP apresentou alta percentagem de regeneração (71%), associada à baixa formação de calos nos explantes (Figuras 4C e 5).

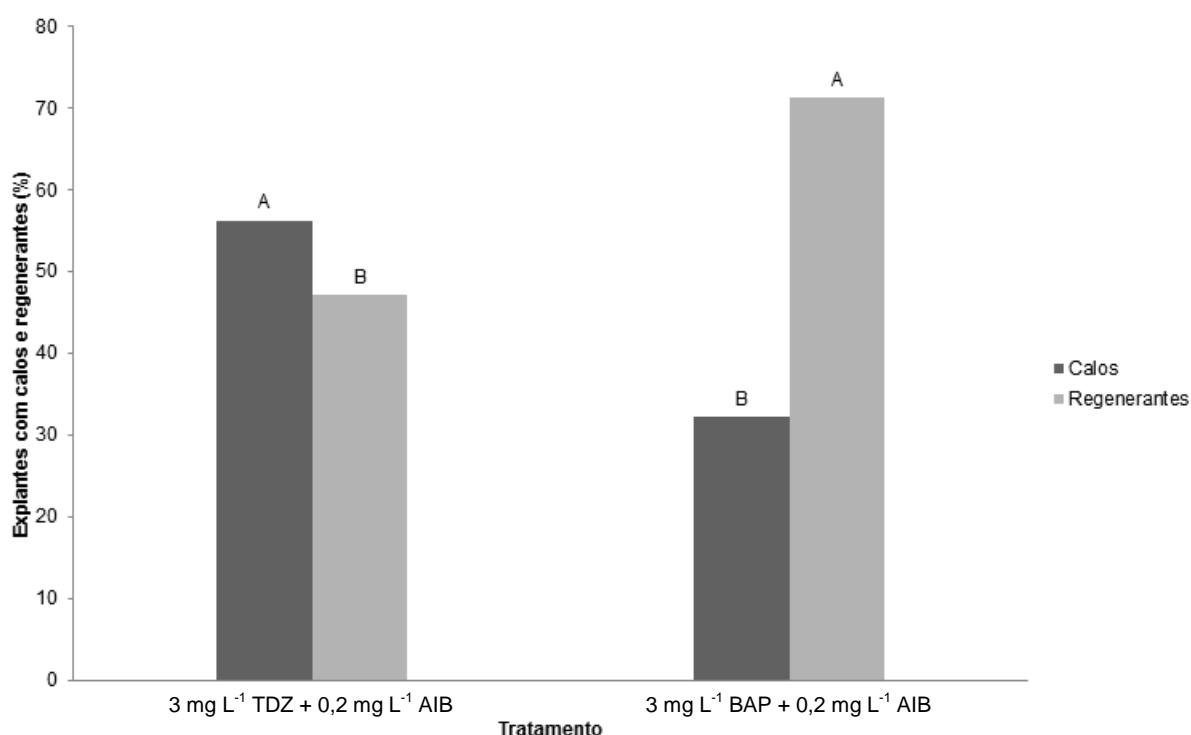


Figura 5 – Percentagem de calos e de explantes regenerantes do portaenxerto 'Marubakaido' em meio de cultura MS com os reguladores de crescimento BAP e TDZ após 40 dias de cultivo. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5%.

O número médio de brotações por explantes regenerantes diferiu estatisticamente entre os tratamentos com TDZ ou BAP (Tabela 3). O meio contendo

BAP apresentou maior número de brotações por explantes (5,0) em relação ao TDZ (3,4). Sendo assim, o tratamento 4 (3 mg L⁻¹ BAP + 0,2 mg L⁻¹ AIB) induz maior taxa de regeneração e número médio de brotações por explante regenerante de folhas provenientes de plantas em meio de enraizamento.

Tabela 3 – Número médio de brotações por explantes regenerantes do portaenxerto 'Marubakaido', em meio de cultura MS com diferentes reguladores de crescimento.

Regulador de crescimento	Número médio de brotações
BAP	5,0 a
TDZ	3,4 b
C.V.(%)	21,83

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si para o fator regulador de crescimento pelo teste de Tukey a 5%.

Pode-se observar que houve maior eficiência na porcentagem de explantes regenerantes e maior número médio de brotações por explantes regenerantes no tratamento 4 (3 mg L⁻¹ BAP + 0,2 mg L⁻¹ AIB) em relação ao mesmo tratamento do experimento 1, no qual se utilizou explantes oriundos da multiplicação sem carvão ativado.

Experimento 3 – Efeito do escuro e dos reguladores de crescimento BAP e TDZ em explantes foliares provenientes de diferentes meios

Em relação à porcentagem de explantes com calos, a análise dos dados diferiu estatisticamente apenas para o fator fonte dos explantes. Considerando-se todos os tratamentos, naqueles em que os explantes foram retirados de brotações provenientes da multiplicação sem carvão ativado, ocorreu uma porcentagem de calos mais alta (60% e 70% para TDZ e BAP, respectivamente) do que naqueles que foram retirados da multiplicação com carvão ativado e do enraizamento (Figura 6).

Na porcentagem de explantes regenerantes houve diferença significativa para o fator fonte dos explantes, sendo que somente para os explantes oriundos do enraizamento ocorreu diferença estatística entre os reguladores de crescimento,

BAP e TDZ (Figura 6). Verificou-se formação de um maior número de explantes regenerantes naqueles tratamentos em que os explantes foram retirados de brotações oriundas do enraizamento (97% para TDZ e 87% para BAP) e da multiplicação com carvão ativado (87,5% para ambos os tratamentos), como pode ser observado na Figura 7.

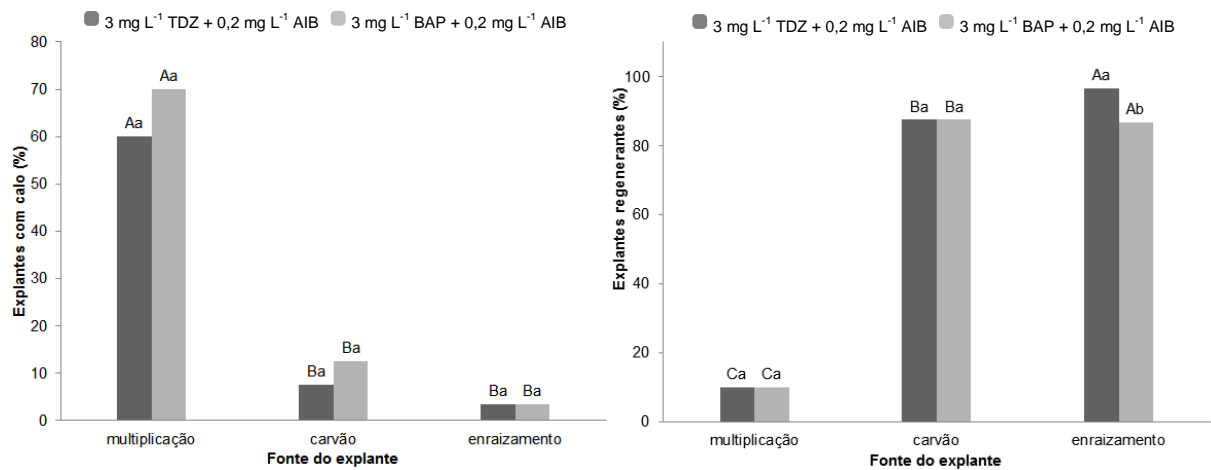


Figura 6 – Percentagem de formação de calos e de explantes regenerantes do portaenxerto 'Marubakaido' em meio de cultura MS com diferentes reguladores (BAP e TDZ) após 40 dias de cultivo. Letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre si para a fonte do explantes e letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si para o regulador de crescimento pelo teste de Tukey a 5%.

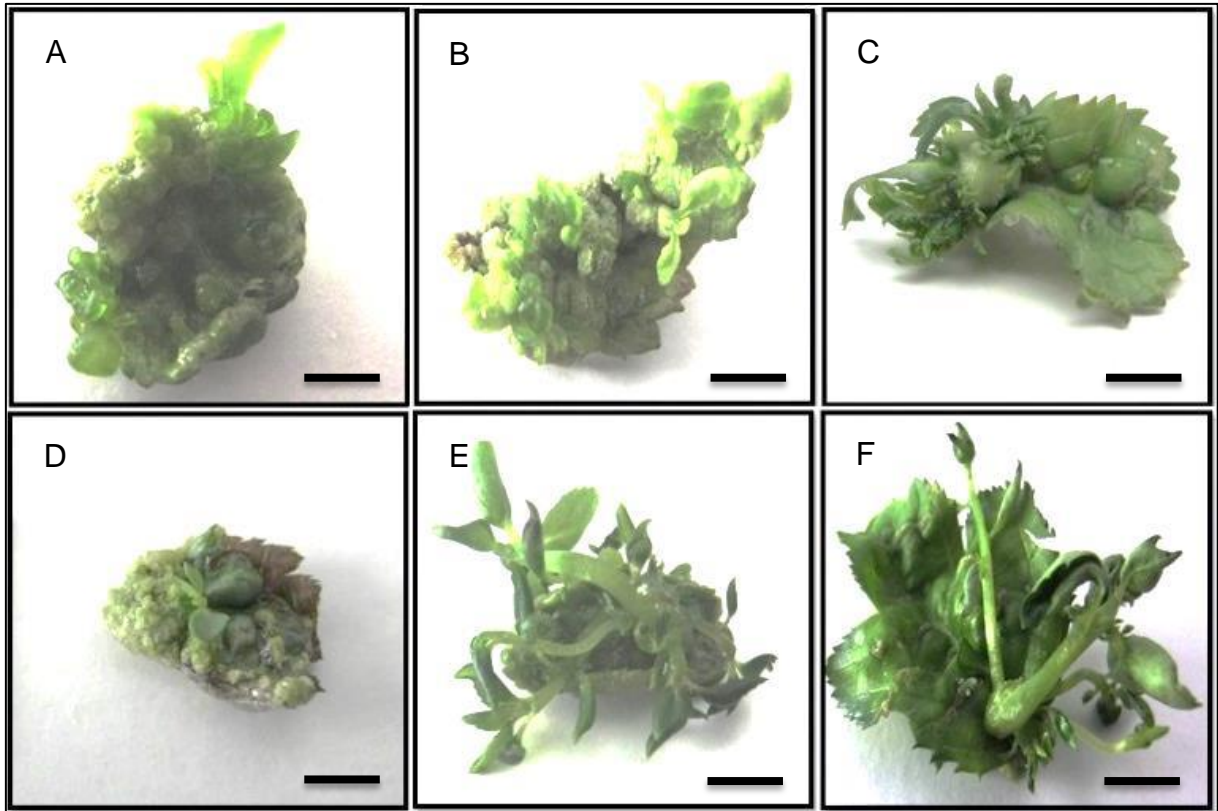


Figura 7 – Regeneração de brotações do portaenxerto ‘Marubakaido’ em explantes foliares, aos 40 dias em meio de regeneração. A) Explante proveniente do meio de multiplicação e meio com 3 mg L^{-1} TDZ + $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ AIB. B) Explante oriundo do meio de multiplicação com carvão ativado e meio com 3 mg L^{-1} TDZ + $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ AIB. C) Explante proveniente do meio de enraizamento e meio com 3 mg L^{-1} TDZ + $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ AIB. D) Explante oriundo do meio de multiplicação e meio com 3 mg L^{-1} BAP + $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ AIB. E) Explante proveniente do meio de multiplicação com carvão ativado e meio com 3 mg L^{-1} BAP + $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ AIB. F) Explante oriundo do meio de enraizamento e meio com 3 mg L^{-1} BAP + $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ AIB.

Em relação ao número médio de brotações por explantes regenerantes (Figura 8) não houve significância dos reguladores de crescimento BAP ou TDZ. Porém, houve a formação de um maior número de brotações nos explantes provenientes do enraizamento (6,8 brotações/regenerantes no meio com TDZ e 5,3 brotações/regenerantes no meio com BAP), contudo, estes resultados não diferiram estatisticamente dos explantes oriundos da multiplicação com carvão ativado (3,8 brotações/regenerantes no meio com TDZ e 3,6 brotações/regenerantes no meio com BAP). Os explantes provenientes da multiplicação sem carvão ativado foram significativamente inferiores em relação às demais fontes de explantes. Por conseguinte, o tratamento 3 (3 mg L^{-1} TDZ + $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ AIB) induz maior taxa de regeneração e número médio de brotações por explante regenerante de folhas provenientes de plantas em meio de enraizamento.

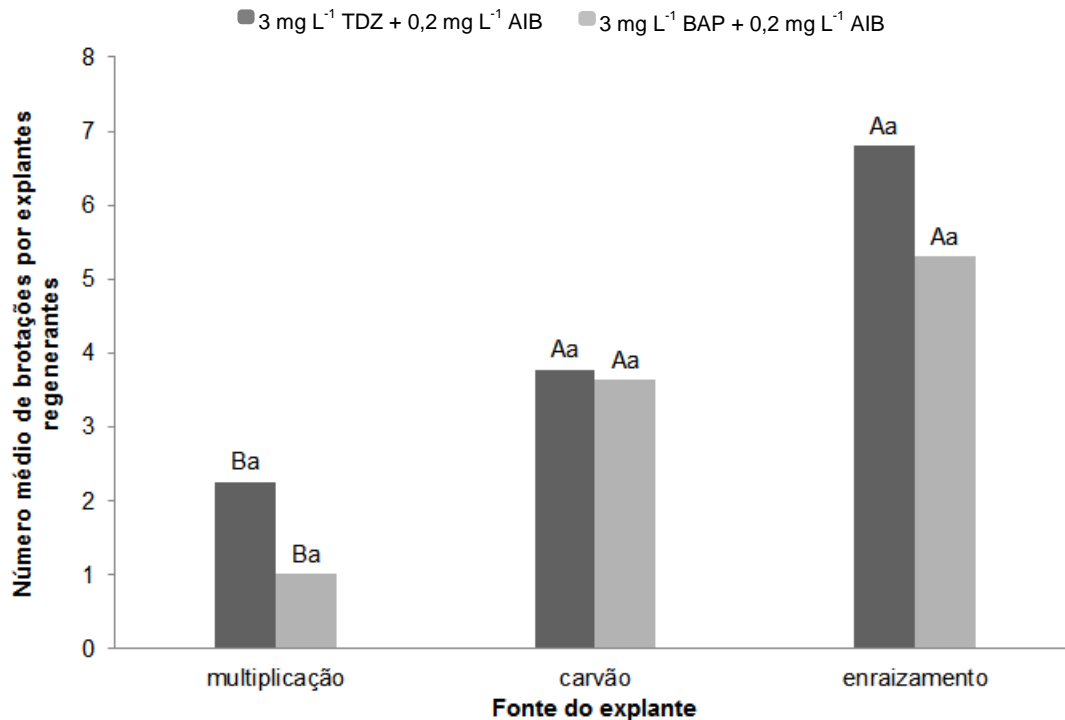


Figura 8 – Número médio de brotações por explantes regenerantes do portaenxerto 'Marubakaido', em meio de cultura MS com os reguladores de crescimento BAP e TDZ e diferentes fontes de explantes. Médias seguidas por letras maiúsculas diferem entre si para o fator fonte do explantes, médias seguidas por letras minúsculas diferem entre si para o fator regulador de crescimento pelo teste de Tukey a 5%.

Discussão

Efeito dos diferentes explantes foliares provenientes da multiplicação (com e sem carvão ativado) e enraizamento

No presente estudo, um sistema de regeneração de brotos foi desenvolvido usando folhas de *Malus prunifolia* provenientes de brotações desenvolvidas em meios de multiplicação (com e sem carvão ativado) e de enraizamento *in vitro*, colocadas com suas superfícies abaxiais em contato com os meios. As taxas de regeneração de brotos foram menores (10%) quando foram utilizadas folhas de brotações desenvolvidas em meio de multiplicação e maiores (97%) quando se utilizaram folhas provenientes de brotações em enraizamento (Figura 5), sendo que as folhas retiradas de brotações desenvolvidas em meio de multiplicação sem carvão ativado geralmente eram pequenas e menores que as obtidas em meios de multiplicação com carvão e de enraizamento, pois, apresentam tecido vascular pouco desenvolvido, necessitando, talvez níveis mais altos de citocininas para a indução da morfogênese (MAGYAR-TÁBORI et al., 2010). O carvão ativado tem

capacidade de modificar a composição do meio, devido à fina rede de poros, área superficial grande e volume que lhe confere habilidade única de adsorção (BAKER et al., 1992). Essa característica permite que o carvão ativado adsorva uma grande variedade de compostos, incluindo gases, como o etileno, e, portanto, melhore ou regule o crescimento de plantas *in vitro* (THOMAS 2008). Neste trabalho constatou-se que as folhas provenientes do meio de multiplicação com carvão ativado eram maiores e mais fáceis de manipular (semelhante às folhas oriundas do enraizamento) do que as folhas provenientes do meio de multiplicação sem carvão ativado.

Em experimentos de regeneração de partes aéreas ou brotações, o órgão ou tecido mais utilizado como fonte de explante é a folha (MARTINS et al., 2001; SCHUCH; PETERS, 2002; ALVES et al., 2004; ERIG; SCHUCH, 2005). TANG et al. (2002) observaram que, geralmente, os brotos surgiam a partir da nervura da folha ou em associação com o tecido vascular. Provavelmente a superioridade deste tipo de explante possa estar relacionada com maior área, aliada a partes seccionadas em contato com o meio de cultura, favorecendo que nutrientes e reguladores de crescimento sejam absorvidos de forma eficiente a partir do meio, estimulando então a regeneração. Além disso, o ferimento em geral provoca uma resposta relacionada ao estresse, que resulta na produção de uma série de compostos, como o ácido jasmônico, peróxido de hidrogênio, etileno, bem como diversas enzimas antioxidantes, que também poderiam induzir calos e mesmo a diferenciação celular (NOORMOHAMMADI et al., 2013). Ainda neste tipo de explante, outro fator chave na morfogênese é a orientação dos mesmos no meio de cultura, determinando respostas morfogenéticas diferenciais em macieira, como salientado por Zhang (2014), que encontrou taxas de regeneração de brotos maiores (95,93%) quando as folhas foram colocadas com suas superfícies abaxiais em contato com o meio, isto porque o tecido epidérmico abaxial é menos espesso e possui mais estômatos, possibilitando maior absorção dos reguladores de crescimento (Yepes; Aldwinckle, 1994).

A maior parte das gemas/brotações se originou a partir das escarificações feitas nas folhas, principalmente na nervura central. Pérez-Tornero et al. (2000) relataram que, normalmente, a regeneração está associada com o tecido vascular ou com as extremidades cortadas da folha. A idade das folhas também pode afetar a capacidade de regeneração, sendo folhas jovens e expandidas as mais adequadas

para a regeneração (MAGYAR-TÁBORI et al., 2010), afirmativa esta que corrobora os resultados deste trabalho, visto que maiores taxas de regeneração (97%) foram obtidas em folhas retiradas de brotações enraizadas (Figura 5). Isto, provavelmente porque as plantas enraizadas possuem maior teor de citocinina endógeno, principalmente pela presença de raízes, alterando desta forma, o balanço auxina/citocinina e favorecendo a regeneração. Outra razão para a utilização de brotos enraizados como fonte de explante é a praticidade de trabalhar com o material, pois o tecido é mais desenvolvido e uniforme (BULLEY; JAMES, 2004).

Efeito das citocininas BAP e TDZ nos explantes foliares

Quanto à utilização dos reguladores de crescimento, a maior taxa de regeneração (97%) e número de brotos por explantes regenerantes (6,8), foram obtidos no meio contendo $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ de TDZ + $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB (Figura 5 e 7) com explantes oriundos de plantas em enraizamento. Segundo Magyar-Tábori et al. (2010) a eficácia do TDZ para induzir a organogênese pode estar relacionada com sua reduzida sensibilidade à degradação enzimática. Neste trabalho, a capacidade de regeneração de brotos em explantes de Marubakaido foi fortemente afetada pelo tipo e concentração de citocinina aplicada.

Durante a organogênese *in vitro*, as citocininas promovem a expressão de genes essenciais para induzir a formação de novas gemas (SU et al., 2011). Gordon et al. (2007) mostraram que a aquisição de competência para formar gemas em explantes de raiz ocorre em regiões que são altamente sensíveis às citocininas mas não a auxinas, e que um equilíbrio nos gradientes destes hormônios é necessário para a especificação da identidade da célula. Segundo Su et al. (2011), as respostas das citocininas são reguladas negativamente pela auxina; altos níveis de citocinina são necessários para a manutenção das células-tronco no meristema, enquanto a auxina é fundamental para a iniciação do órgão.

A morfogênese pode ser manipulada controlando as condições *in vitro*, tais como fonte e concentração de nitrogênio, origem da folha, maturidade da folha e posição no caule, luz, umidade do frasco, potencial osmótico por meio de nutrientes minerais, carboidratos, reguladores de crescimento (citocininas e auxinas) e orientação dos explantes (BHATIA et al. 2004, 2005; ALDWINCKLE; MALNOY, 2009; MAGYAR-TÁBORI et al., 2010; NOORMOHAMMADI et al., 2013). Estas condições interagem com fatores intrínsecos dos explantes (HAZARIKA, 2006; ZIV;

CHEN, 2008), sendo que a interação entre a auxina e citocinina é particularmente importante para controlar alguns processos de desenvolvimento, tais como a formação e manutenção de meristemas (SU et al., 2011). Observou-se que a formação de gemas e brotações nos explantes de Marubakaido, ocorria, principalmente, nos locais onde foram realizados cortes e ferimentos e diretamente dos tecidos dos explantes (Figura 6).

Em todos os tratamentos observou-se a presença de brotações com características de hiperidricidade. A hiperidricidade é frequentemente associada ao microambiente, disponibilidade de água, fornecimento de micronutrientes e equilíbrio hormonal (HAZARIKA, 2006). Contudo, o tipo e concentração do agente de gelificação tem significativo efeito no desempenho do tecido cultivado (PEREIRA-NETTO et al., 2007), incluindo a ocorrência de hiperidricidade (CASANOVA et al., 2008) e estes efeitos estão relacionados com o fato de que os géis alteram a disponibilidade de água no meio. Portanto, o gelrite pode ter sido o principal responsável pela hiperidricidade das brotações regeneradas, pois sua estrutura física permite um aumento da absorção de substâncias, tais como: citocininas, NH_4^+ e água (IVANOVA; STADEN, 2011). Em estudos anteriores (IVANOVA et al., 2006), os níveis mais elevados de citocininas endógenas foram detectados em brotos de *Aloe polyphylla* cultivados em meios com gelrite do que em brotos cultivados em meios com ágar.

Efeito do escuro em diferentes explantes foliares

No presente estudo foi obtido maior taxa de regeneração (96,7%) e número médio de brotos por explantes regenerantes (6,8) quando utilizados explantes provenientes de brotações em meio de enraizamento e incubados no escuro no início do processo de regeneração, indicando que este procedimento é um fator importante para o aumento da taxa de regeneração de gemas/brotos do portaenxerto Marubakaido. O efeito do escuro na folha de Marubakaido corresponde a descobertas anteriores sobre o efeito positivo do escuro na regeneração de tecidos foliares de macieira (ERIG; SCHUCH, 2005; MAGYAR-TÁBORI et al., 2010; DOBRÁNSZKI; SILVA, 2011; ZHANG et al., 2014) em que a maior taxa organogênica de folhas foi observada quando os explantes foram expostos ao escuro no início da fase de regeneração. Este procedimento e tipo de explante é comumente usado para a organogênese de diferente espécies, como boldo (MOTA

et al., 2010), *Buddleia* (DAI; CASTILLO, 2007), rosa (IBRAHIM; DEBERGH, 2001) e cereja doce (CANLI; TIAN, 2008).

ESPINOSA et al. (2006) também relataram que as percentagens mais elevadas de regeneração foram obtidas quando explantes foliares de *Prunus serotina* foram mantidos no escuro durante três semanas e, em seguida, transferidos para a luz, durante 2 semanas.

Deve-se levar em conta que a exposição à radiação ultravioleta pode ser um estímulo para a síntese de compostos fenólicos. E estes dificultam a regeneração de brotos nas plantas lenhosas, pois acumulam polifenóis e produtos de oxidação, como: melanina, suberina, lignina, cutina e calose em torno da superfície incisada (ANDRADE et al., 2000). Estes compostos podem modificar a composição do meio de cultivo, escurecer os explantes, além de causar a inibição do crescimento e a morte dos explantes em grande número de espécies (MONACO et al, 1977). Portanto, o aumento na formação de brotos, bem como o número médio de brotos por explante regenerante, pode estar relacionado à menor concentração de compostos fenólicos.

Desta forma, no presente estudo o tratamento com 3 mg L⁻¹ de TDZ + 0,2 mg L⁻¹ de AIB aplicado em brotações oriundas de meios de enraizamento e mantidas no escuro por 20 dias e posteriormente expostas à luz apresentou maior eficiência na regeneração de explantes foliares da cultivar Marubakaido, quando comparado com os demais tratamentos. Estes resultados confirmam que órgãos retirados de brotações desenvolvidas em diferentes meios diferem no potencial organogênico e, por conseguinte, também no processo de regeneração, indicando que os mesmos apresentam diferenças funcionais e bioquímicas que afetariam o potencial morfogenético (DOBRÁNSZKI et al., 2005).

Conclusões

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

-As condições de cultivo das fontes dos explantes afetam significativamente a percentagem de regeneração de brotações dos mesmos;

-Folhas oriundas de brotações recém-enraizadas *in vitro* apresentam altas taxas de regeneração;

-A exposição a um período de escuro no início da regeneração melhora a resposta dos explantes provenientes de brotações enraizadas;

-Meio de cultura MS suplementado com 3 mg L⁻¹ de TDZ + 0,2 mg L⁻¹ de AIB induz maior taxa de regeneração de folhas oriundas de brotações enraizadas.

Referências bibliográficas

ALDWINCKLE, H.; MALNOY, M. Plant regeneration and transformation in the rosaceae. **Transgenic Plant Journal** 3, (Special Issue 1), 2009. p.1-39.

ALVES, E. C. S. C.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.5, p.421-430, 2004.

ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S. Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemao). **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.1, p.174-180, 2000.

BAKER, F.S.; MILLER, C. E.; REPIK, A. J.; TOLLES, E. D. Activated carbon. **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**, v.4, n.1, p.1015-1037, 1992.

BHATIA, P.; ASHWATH, N.; SENARATNA, T.; DAVID, M. Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.78, n.1, p.1-21, 2004.

BHATIA, P.; ASHWATH, N.; MIDMORE, D. J. Effects of genotype, explant orientation, and wounding on shoot regeneration in tomato. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Toledo, v.41, n.4, p.457-464, 2005.

BULLEY, S. M. W.; JAMES, D. J. Regeneration and genetic transformation of apple (*Malus* spp.). In: CURTIS, I. S. (Ed) **Transgenic crops of the world: essential protocols**. Dordrecht: Springer, 2004. p.199-214.

CABONI, E.; LAURI, P.; DAMIANO, C.; D'ANGELI, S. Somaclonal variation induced by adventitious shoot regeneration in pear and apple. **Acta Horticulturae**, v.530, p.195-201, 2000.

CANLI, F. A.; TIAN, L. *In vitro* shoot regeneration from stored mature cotyledons of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. **Scientia Horticulturae**, Netherlands, v.116, n.1, p.34-40, 2008.

CASANOVA, E.; MOYSETT, L.; TRILLAS, M. I. Effects of agar concentration and vessel closure on the organogenesis and hyperhydricity of adventitious carnation shoots. **Biologia Plantarum**, Netherlands, v.52, n.1, p.1-8, 2008.

DAI, W.; CASTILLO, C. Factors affecting plant regeneration from leaf tissues of *Buddleia* species. **Hortscience**, Alexandria, v.42, n.7, p.1670-1673, 2007.

DAI, H.; LI, W.; MAO, W.; ZHANG, L.; HAN, G.; ZHAO, K.; LIU, Y.; ZHANG, Z. Development of an efficient regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation system in crab apple (*Malus micromalus*) using cotyledons as explants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, New York, v.50, n.1, p.1-8, 2014.

DENARDI, F. Porta-enxertos. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis-SC: EPAGRI, 2002. p.169-227.

DOBRÁNSZKI, J.; JÁMBOR-BENCZÚR, E.; HUDÁK, I.; MAGYAR-TÁBORI, K. Model experiments for establishment of *in vitro* culture by micrografting in apple. **International Journal of Horticultural Science**, v.1, n.11, p.47-49, 2005.

DOBRÁNSZKI, J.; SILVA, J. A. T. Micropropagation of apple - A review. **Biotechnology Advances**, Oxford, v.28, n.4, p.462-488, 2010.

DOBRÁNSZKI, J.; SILVA, J. A. T. Adventitious shoot regeneration from leaf thin cell layers in apple. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.127, n.3, p.460-463, 2011.

ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 6., 2003. Fraiburgo-SC. **Anais...** Caçador-SC: EPAGRI, 2003. p.180.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Morfogênese *in vitro* de brotos de macieira (*Malus domestica* borkh.) a partir de fragmentos delgados de folhas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.29, n.3, p.575-581, 2005.

ESPINOSA, A. C.; PIJUT, P. M.; MICHLER, C. H. Adventitious shoot regeneration and rooting of *Prunus serotina* *in vitro* cultures. **HortScience**, Alexandria, v.41, n.1, p.193-201, 2006.

GAHAN, P. B.; GEORGE, E. F. Adventitious regeneration. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. D. **Plant propagation by tissue culture**, The Background. Basingstoke: Springer, 2008. p.355-401.

GAMBINO, G.; GRIBAUDO I. Genetic transformation of fruit trees: current status and remaining challenges. **Transgenic Research**, Dordrecht, v.21, n.6, p.1163-1181, 2012.

GIACOBBO, C. L.; GOMES, F. R. C.; KROTH, L. L.; CONCEIÇÃO, M. K.; FORTES, G. R. L. Multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido (*Malus prunifolia* Willd, Borkh) com diferentes níveis de benzilaminopurina e ácido naftalenacético. **Revista Brasileira de Agrocência**, Pelotas, v.9, n.1, p.31-33, 2003.

GORDON, S. P.; HEISLER, M. G.; REDDY, G. V.; OHNO, C.; DAS, P.; MEYEROWITZ, E. M. Pattern formation during de novo assembly of the *Arabidopsis* shoot meristem. **Development**, Cambs, v.134, n.19, p.3539-3548, 2007.

HARRIS, S. A.; ROBINSON, J. P.; JUNIPER, B. E. Genetic clues to the origin of the apple. **Trends in Genetics**, London, v.18, n.8, p.426-430, 2002.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.108, n.2, p.105-120, 2006.

HOWELL, S. H.; LALL, S.; CHE, P. Cytokinins and shoot development. **Trends in Plant Science**, London, v.8, n.9, p.453-459, 2003.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola 2013**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Online. Acesso em 30 jan. 2014.

IBRAHIM, R.; DEBERGH, P. C. Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from *in vitro* leaf explants of roses (*Rosa hybrida* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.88, n.1, p.41-57, 2001.

IUCHI, V. L. Botânica e fisiologia. In: EPAGRI. **A Cultura da Macieira**. Florianópolis-SC: EPAGRI, 2002. p.743.

IVANOVA, M.; NOVÁK, O.; STRNAD, M.; STADEN, J. V. Endogenous cytokinins in shoots of *Aloe polyphylla* cultured *in vitro* in relation to hyperhydricity, exogenous cytokinins and gelling agents. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.50, n.2-3, p.219-230, 2006.

IVANOVA, M.; STADEN, J. V. Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.104, n.1, p.13-21, 2011.

JOSHI, S.; JAIN, M.; TILLMAN, B. L.; ALTPETER, F.; GALLO, M. Comparative analysis of direct plant regeneration from immature leaf whorl and floral explants for three elite US sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) genotypes. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, New York, v.49, n.6, p.674-681, 2013.

MACHADO, A. A.; CONCEIÇÃO, A. R. **Sistema de análise estatística para Windows. Winstat**. Versão 1.0. UFPel, 2007.

MAGYAR-TÁBORI, K.; DOBRÁNSZKI, J.; SILVA, J. A. T.; BULLEY, S. M.; HUDÁK, I. The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.101, n.3, p.251-267, 2010.

MARTINS, C. R.; SCZEPANSKI, P. H. G.; BACHETTINI, P. S.; FRANÇA, R. B.; FORTES, G. R. L. Calogênese de tecido foliar de porta-enxerto de macieira m.7 (*Malus* sp.) induzida por BAP e CPPU. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.3, p.714-717, 2001.

MELLO, L. M. R. **Produção e mercado de maçã**. Embrapa Uva e Vinho: Bento Gonçalves, 2006. 4p. (Circular técnica 64).

MONACO, L. C.; SÖNDAHL, M. R.; CARVALHO, A. Applications of tissue culture in the improvement of coffee. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y. P. S. **Applied and**

fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Berlin: Springer-Verlag, 1977. p.109-126.

MOTA, M. S.; BANDEIRA, J. de M.; BRAGA, E. J. B.; BIANCHI, V. J.; PETERS, J. A. *In vitro* shoot regeneration of boldo from leaf explants. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.10, p.2210-2213, 2010.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-479, 1962.

NICKEL, O.; JELKMANN, W.; KUHN, G. B. Occurrence of *Apple stem grooving capillovirus* in Santa Catarina, Brazil, detected by RT-PCR. **Fitopatologia Brasileira**, Lavras, v.24, n.3, p.444-446, 1999.

NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M.; JELKMANN, W.; KUHN, G. B. Sequence analysis of the capsid protein gene of an isolate of *Apple stem grooving virus*, and its survey in southern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Lavras, v.26, n.3, p.655-659, 2001.

NOORMOHAMMADI, Z.; FARAHANI, F.; SAFARZADEH, M. Study of morphological traits changes in different media culture of two apple rootstocks (M26 and MM106). **Malaysian Applied Biology Journal**, v.42, n.1, p.25-33, 2013.

ORAGUZIE N. C.; RIKKERINK E.; GARDINER S.; BUS V.; CURRIE A.; RUSHOLME R.; PANDALAI S. G. A review of developments in breeding techniques and gene technology tools for new cultivar development in apple. **Recent Research Developments in Genetics & Breeding**, v.1, n.2, p.223-257, 2004.

PEREIRA-NETTO, A. B.; PETKOWITZ, C. L. O.; CRUZ-SILVA, C. T. A.; GAZZONI, M. T.; MELLO, A. F. P.; SILVEIRA, J. L. M. Differential performance of Marubakaido apple rootstock grown in culture media containing different agar brands: dynamic rheological analysis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Oxon, v.43, n.4, p.356-363, 2007.

PÉREZ-TORNERO, O.; EGEA, J.; VANOOSTENDE, A.; BURGOS, L. Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot. **Plant Science**, Clare, v.158, n.1-2, p.61-70, 2000.

PÉREZ-TORNERO, O.; TALLÓN, C. I.; PORRAS, I. An efficient protocol for micropropagation of lemon (*Citrus limon*) from mature nodal segments. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.100, n.3, p.263-271, 2010.

SCHUCH, M. W.; PETERS, J. A. Regeneração de brotações de macieira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.2, p.301-305, 2002.

SEONG, E. S.; SONG, K. J.; JEGAL, S.; YU, C. Y.; CHUNG, I.M. Silver nitrate and aminoethoxyvinylglycine affect *Agrobacterium*-mediated apple transformation. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.45, n.1, p.75-82, 2005.

STADEN, J. V.; ZAZIMALOVA, E.; GEORGE, E. F. Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.;

KLERK, G-J. D. **Plant propagation by tissue culture**, The Background. Basingstoke: Springer, 2008. p.205-226.

SU Y. H.; LIU Y. B.; ZHANG X. S. Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. **Molecular Plant**, Oxford, v.4, n.4, p.616-625, 2011.

TANG, H.; REN, Z.; REUSTLE, G.; KRCZAL, G. Plant regeneration from leaves of sweet and sour cherry cultivars. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.93, n.3-4, p.235-244, 2002.

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, v.26, n.6, p.618-631, 2008.

TIAN, J.; SHEN, H.; ZHANG, J.; SONG, T.; YAO, Y. Characteristics of chalcone synthase promoters from different leaf-color *Malus crabapple* cultivars. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.129, n.3, p.449-458, 2011.

USDA, **United States Department of Agriculture**. Disponível em: <<http://usda.org>>. Online. Acesso em 31 jan. 2014.

VIEIRA, R. L.; LEITE, G. B.; WAMSER, A. F. Efeito de substratos porosos no enraizamento *in vitro* do portaenxerto de macieira m-9 (*Malus pumilla*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.29, n.1, p.128-132, 2007.

YAMASHITA, H.; DAIMON, H.; AKASAKA-KENNEDY, Y.; MASUDA, T. Plant regeneration from hairy roots of apple rootstock, *Malus prunifolia* Borkh. vr. *Ringo Asami*, strain Nagano n^o1, transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Japan, v.73, n.6, p.505-510, 2004.

YEPES, L. M.; ADLWINCKLE, H. S. Factors

ZHANG, X.; QIN, Y.; LIANG, D.; ZOU, Y.; MA, F. Enhancement of *in vitro* shoot regeneration from leaf explants of apple rootstock G.41. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, New York, v.50, n.2, p.263-270, 2014.

ZIV, M.; CHEN, J. The anatomy and morphology of tissue cultured plants. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. D. **Plant propagation by tissue culture**, The Background. Basingstoke: Springer, 2008. p.465-477.

CAPÍTULO 2 - Transformação genética do portaenxerto de macieira, cultivar Marubakaido, mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Introdução

A maçã é um dos frutos mais importantes produzidos no Brasil, chegando a 1,37 milhão de toneladas na safra 2012/2013 (IBGE, 2013). No entanto, muitos fatores restringem a expansão desta cultura, dentre eles, a incidência dos vírus “Apple stem grooving vírus” (ASGV) e “Apple chlorotic leafspot vírus” (ACLSV) (NICKEL et al., 1999 e 2001). Os vírus afetam a viabilidade das enxertias, reduzem a produtividade do pomar devido à diminuição da quantidade e qualidade das mudas, diminuem a produção por planta e reduzem o tamanho dos frutos. Portanto, um dos objetivos atuais dos programas de melhoramento genético de macieira no Sul do Brasil é a obtenção de cultivares resistente a ASGV e ACLSV. ASGV (gênero *Capillovirus*) e ACLSV (gênero *Trichovirus*) (NICKEL et al., 2001), são amplamente disseminados em macieiras, pereiras asiáticas e europeias, marmeleiros, cerejeiras e damasqueiros (SILVA et al., 2008). Ambos os vírus tem partículas filamentosas e flexíveis, genomas de ssRNA, caudas poli-A de 6496 e 7555 nanômetros, respectivamente (CANDRESSE et al., 1995; MAGOME et al., 1997); não possuem vetores conhecidos e pertencem a família Flexiviridae.

A melhoria das frutíferas perenes por cruzamento requer muito mais tempo que culturas anuais, pois as plantas tem um longo período juvenil (IGARASHI et al., 2002). Além disso, progênies contendo características desejadas de ambos os pais não são facilmente obtidas, uma vez que as frutíferas perenes são altamente heterozigotas. Portanto, a transformação genética parece ser uma ferramenta para melhorar estes tipos de plantas (IGARASHI et al., 2002). Sendo assim, a transferência de genes mediada por *Agrobacterium tumefaciens* proporciona um meio eficaz para a inserção e transferência de genes, especialmente para as plantas dicotiledôneas, e tem sido aplicada a muitas frutíferas, incluindo videira (BORNHOFF et al., 2005), morangueiro (ZHAO et al., 2004), cerejeira (STANIENÈ et al., 2007), pereira (TANG et al., 2007) e macieira (DAI et al., 2014; SEONG et al., 2005; IGARASHI et al., 2002). O sistema de transformação mediado por *A. tumefaciens*, facilita a integração precisa de um pequeno número de genes no genoma da planta e mostra maior grau de estabilidade do transgene (SHOU et al., 2004).

A inserção de genes que conferem resistência a patógenos na planta, está vinculada a ganhos expressivos na qualidade final dos produtos, maior velocidade na obtenção de novos genótipos apropriados, em virtude de maior homogeneidade, drástica redução do uso de agrotóxicos, aumento da produção e produtividade com redução de custos relativos (SARTORETTO et al., 2008). Entretanto, para que haja o estabelecimento de um eficiente sistema de transformação para qualquer espécie vegetal, são necessárias algumas etapas, tais como a disponibilidade de técnicas de cultura de tecidos que permitam a regeneração de brotações, a seleção de transformantes e a propagação das plantas transgênicas (ALDWINCKLE; MALNOY, 2009).

A transgenia tem sido usada com o propósito de integrar sequências gênicas de interesse com consequente alteração da expressão gênica. Contudo, a expressão desses transgene nem sempre pode ser predita. Desse modo, o estudo das consequências dessas transformações tem-se tornado relevante nos últimos anos (WATERHOUSE et al, 1998; VAUCHERET et al, 2001). Portanto, recentemente, estratégias de silenciamento gênico têm sido empregadas para a obtenção de plantas resistentes a vírus, devido à possibilidade de induzir resistência sem a produção de proteínas exógenas nas plantas transformadas, favorecendo a equivalência funcional entre culturas do tipo-selvagem e as geneticamente modificadas (PARROT et al., 2010). No entanto, poucos são os trabalhos de silenciamento realizados em plantas lenhosas e perenes em que a questão do transporte dos sinais de silenciamento através do ponto da enxertia são discutidos (PALAUQUI et al., 1997).

Resumidamente, o mecanismo do silenciamento gênico consiste de fragmentos de genes de interesse clonados em senso e antisenso separados por um intron, de tal forma que juntos formam uma estrutura de grampo (hairpin RNA, hpRNA) colocada sob controle de um forte promotor. Este tipo de RNA não é traduzível, mas digerido por uma enzima tipo RNase III chamada “dicer”, gerando pequenos fragmentos de RNA interferente de fita-dupla. Após conversão para RNA de fita simples esses fragmentos direcionam a degradação de RNA por um “complexo de silenciamento induzido por RNA” (RISC). A especificidade deste mecanismo foi confirmada pela identificação de pequenos fragmentos de RNA de 21-25 nanômetros de tamanho com homologia de sequência com o RNA alvo silenciado (HAMILTON; BAULCOMBE, 1999).

Considerando o exposto acima, o presente trabalho objetivou a obtenção de linhagens transgênicas do portaenxerto de macieira, Marubakaido (*Malus prunifolia*, Willd Borkh) via *Agrobacterium tumefaciens* visando à resistência a vírus latentes (ASGV e ACLSV) usando tecnologia de RNA interferente.

Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Botânica, do Instituto de Biologia, da Universidade Federal de Pelotas, RS. Foram realizados três protocolos utilizando plantas e brotações do portaenxerto de macieira, Marubakaido (*Malus prunifolia*, Willd, Borkh), mantidas *in vitro*, e fornecidas pela EMBRAPA UVA E VINHO, Bento Gonçalves, RS.

Material vegetal

O material vegetal constituiu de folhas cultivadas *in vitro* de macieira, cv. Marubakaido, as quais foram mantidas em meio de multiplicação com carvão ativado e de enraizamento. Na fase de multiplicação com carvão ativado utilizou-se meio contendo sais e vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com nitrato de amônio e nitrato de potássio reduzido a $\frac{3}{4}$, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 0,8 mg L⁻¹ de BAP, 7 g L⁻¹ de ágar; na fase de enraizamento MS foi reduzido a 50% dos sais com exceção de vitaminas e ferro, 20 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar e 0,5 mg L⁻¹ de AIB. Em todos os tratamentos o pH foi ajustado para 5,7 antes da adição do ágar. As brotações foram cultivadas durante 20 dias em câmara de crescimento, com temperatura de 23 ± 2°C, densidade de fluxo de fótons de 40 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

Construção do plasmídeo e clonagem dos genes virais asgv e aclsv em vetor de expressão em plantas

Este procedimento foi realizado na EMBRAPA UVA E VINHO, Bento Gonçalves, RS. O ASGV isolado UV01 foi coletado de plantas da cv. Royal Gala sobre Marubakaido em declínio num viveiro em Santa Catarina (SC). O isolado BR1 de ACLSV foi coletado em SC de uma cultivar não determinada. Os genes CP foram clonados e as sequências depositadas em base de dados (Genbank Access numbers AF438409 e EF138602). A CP de ASGV foi expressa em *Escherichia coli* e a proteína de fusão usada para produção de anticorpos policlonais (NICKEL et al.,

2004). Clones da cv. Marubakaido de uso regional (*Malus prunifolia*, Willd Borkh) foram utilizados para transformação.

Dos plasmídeos (pGEM T-Easy, Promega) contendo estes genes foram amplificados fragmentos de cerca de 400-500 pb, adicionando sítios de restrição aos iniciadores. Estes permitem a ligação e clonagem das sequências virais separadas por íntrons em posição senso e antisenso, formando estruturas de grampo no cassete de interferência do vetor pKannibal contendo o cassete de interferência 35SP-Intron-OCS-T (fornecido pelo Dr. Pesquisador Francisco J.L. Aragão, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) (Figura 1). O fragmento interferente foi subclonado no vetor binário da série pCAMBIA 1300 e empregado para transformação por choque térmico de cepas desarmadas de *Agrobacterium tumefaciens*.

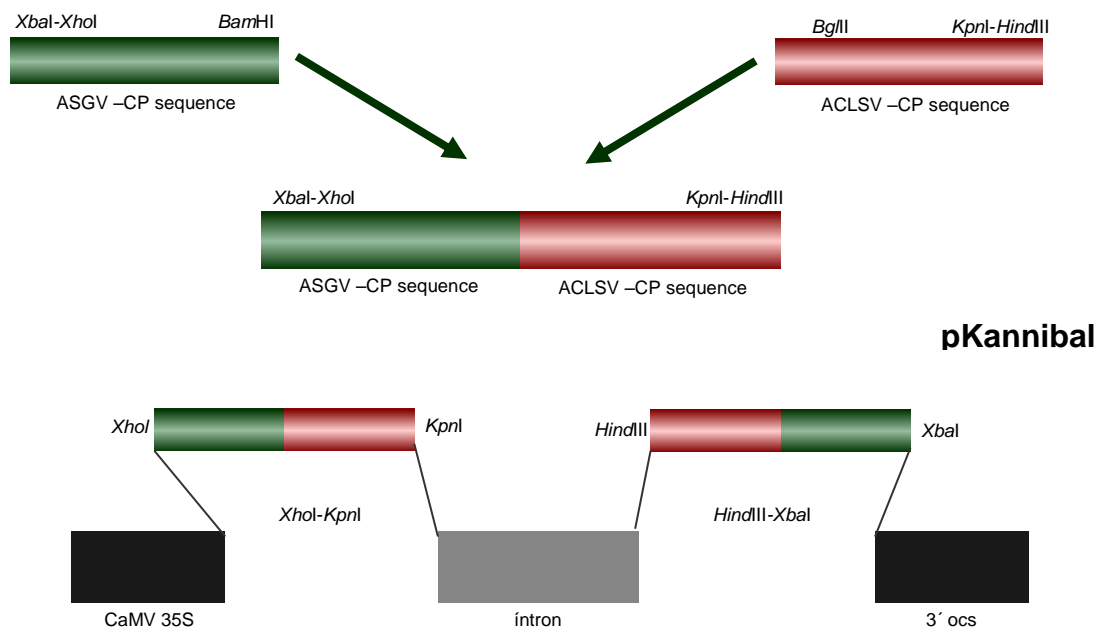


Figura 1- Plasmídeo pCambia1300 em orientação senso e antisenso utilizado para transformação genética do portaenxerto de macieira, Marubakaido.

Teste de resistência a higromicina

Previamente aos experimentos de transformação, os explantes foram submetidos a diferentes concentrações de higromicina, para a determinação da suscetibilidade dos tecidos a este antibiótico. Foram utilizadas concentrações de 0, 2,5, 5,0, 7,5, 10, 25, 50, 75 e 100mg/L no meio de regeneração. Foi determinada a concentração a partir da qual não se obtém regeneração do explante para selecionar

as células transformadas. Para cada concentração de higromicina foram utilizados 3 placas de Petri com 5 explantes em cada uma.

Transformação genética

Os explantes foliares retirados de brotações em multiplicação no carvão ativado e enraizamento foram preparados para as infecções com escarificações na nervura central. Foram adotados três procedimentos para a transformação, e em todos os eventos dos três protocolos testados, dez explantes foliares foram escarificados e dispostos em meio de regeneração sem antibióticos (controle positivo) e em meio de regeneração com antibióticos (controle negativo).

-Protocolo 1

Os explantes de plantas desenvolvidas em meio de enraizamento, foram divididos em três partes e empregados para o co-cultivo com *A. tumefaciens*. O cultivo fresco de *A. tumefaciens* da linhagem EHA105 carregando o vetor de transformação foi iniciado a partir de uma colônia isolada e cultivado por 24 horas, sob agitação de 150 rpm a 28°C, em meio LB (Tryptona 10 g L⁻¹, extrato de levedura 5 g L⁻¹ e NaCl 10 g L⁻¹), contendo 100 mg L⁻¹ de Canamicina e 100 mg L⁻¹ de Rifampicina. Foi realizado o ajuste da densidade óptica da suspensão bacteriana a 600 nm para 0,8 (DO₆₀₀=0,8).

Os explantes foliares escarificados permaneceram 15 min. em suspensão bacteriana sob agitação constante, em seguida, foram levemente secos em papel-filtro esterilizado e transferidos para placas de Petri contendo o meio de co-cultivo1 (Tabela 1), com a superfície abaxial em contato com o meio de cultura, por três dias, no escuro. Posteriormente os explantes foram lavados duas vezes com água destilada autoclavada com 500 mg L⁻¹ de cefotaxima, por 10 minutos, e uma vez somente com água destilada autoclavada. O material vegetal foi seco em papel filtro esterilizado e transferido para o meio de regeneração1 contendo 25 mg L⁻¹ do agente seletivo higromicina e 50 mg L⁻¹ de cefotaxima (Tabela 1), permanecendo em sala de crescimento, com temperatura de 23 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 40 μmol m⁻² s⁻¹. Os explantes foram transferidos para meio novo a cada 20 dias.

-Protocolo 2

Neste protocolo os explantes utilizados foram folhas inteiras escarificadas retiradas de brotações micropropagadas durante 20 dias em meio de multiplicação com carvão ativado. Estes explantes foram submetidos à pré-cultivo em meio de regeneração líquido (Tabela 1) por três dias antes da inoculação com *A. tumefaciens*. O cultivo fresco de *Agrobacterium tumefaciens* da linhagem EHA105 carregando o vetor de transformação foi iniciado como descrito no protocolo 1. Inicialmente foi realizado o ajuste da densidade óptica da suspensão bacteriana a 600 nm para 0,8 ($DO_{600}=0,8$), centrifugação das células bacterianas (7000xg por 2 min), sendo o sedimento suspenso em meio de inoculação suplementado com 100 μ M de acetosseringona (Tabela1). A esta solução foram adicionados os explantes foliares, onde permaneceram por 20 min. sob agitação constante, até a inoculação.

Posteriormente os explantes foram levemente secos em papel filtro esterilizado e transferidos para Erlenmeyers contendo 50 mL do meio de co-cultivo2 líquido (Tabela 1), mantido em Shaker a 80 rpm, 25°C por três dias, no escuro. Após, os explantes foliares foram lavados em água destilada autoclada sem antibiótico duas vezes e mais uma com 500 mg L⁻¹ de cefotaxima, todos por 10 minutos. Posteriormente, as folhas foram secas em papel filtro esterilizado e transferidas para o meio de regeneração2 com 10 mg L⁻¹ de Higromicina e 50 mg L⁻¹ de cefotaxima (Tabela1), por duas semanas, no escuro. Após este período o material foi transferido para luz (densidade de fluxo de fótons de 40 μ mol m⁻² s⁻¹), em sala de crescimento, com temperatura de 23 \pm 2°C, e fotoperíodo de 16 horas. Os explantes foram transferidos para meio novo a cada 20 dias.

-Protocolo 3

Foram utilizados como explantes folhas inteiras escarificadas retiradas de brotações micropropagadas por 20 dias em meio de multiplicação com carvão ativado. Estes explantes foram submetidos à pré-cultivo em meio de regeneração líquido (Tabela 1) por três dias antes da inoculação com *A. tumefaciens*. O cultivo fresco de *Agrobacterium tumefaciens* da linhagem EHA105 carregando o vetor de transformação foi iniciado como descrito no protocolo 1. Inicialmente foi realizado o ajuste da densidade óptica da suspensão bacteriana a 600 nm para 0,8 ($DO_{600}=0,8$), centrifugação das células bacterianas (7000xg por 2 min), sendo o sedimento suspenso em meio de inoculação suplementado com 100 μ M de acetosseringona

(Tabela1). A esta solução foram adicionados os explantes foliares, onde permaneceram por 20 min. sob agitação constante, até a inoculação.

Posteriormente os explantes foram levemente secos em papel filtro esterilizado e transferidos para Erlenmeyers contendo 50 mL do meio de co-cultivo² líquido (Tabela 1), os quais foram mantidos em Shaker a 80 rpm, 25°C por três dias, no escuro. Após, os explantes foram lavados em água destilada autoclada sem antibiótico duas vezes e mais uma com 500 mg L⁻¹ de cefotaxima, todos por 10 minutos. Posteriormente, as folhas foram secas em papel filtro esterilizado e transferidas para o meio de regeneração³ com 50 mg L⁻¹ de cefotaxima (Tabela1), por duas semanas, no escuro. Após este período o material foi transferido para luz (densidade de fluxo de fótons de 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), em sala de crescimento, com temperatura de 23 \pm 2°C, e fotoperíodo de 16 horas. Os explantes foram transferidos para meio novo a cada 20 dias, sendo que a concentração do agente seletivo higromicina foi aumentando (0, 5 e 10 mg L⁻¹) em cada transferência.

Desenvolvimento de gemas e brotos infectados

Os explantes regenerantes foram transferidos para o meio de cultura MS contendo 0,5 mg L⁻¹ de BAP; 0,2 mg L⁻¹ de ANA; e 0,1 mg L⁻¹ de GA₃ com 10 mg L⁻¹ de higromicina, para o desenvolvimento das gemas/brotações obtidas dos eventos de transformação.

Tabela 1 – Composição dos meios de co-cultivo e regeneração dos explantes foliares do portaenxerto de macieira, cultivar Marubakaido.

Reagentes	Co-Cultivo	Co-Cultivo2	Inoculação	Regeneração	Regeneração2	Regeneração3
BAP (mg L ⁻¹)	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
AIB (mg L ⁻¹)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Phytigel (g L ⁻¹)	2,0	-	-	2,0	2,0	2,0
Higromicina (mg L ⁻¹)	-	-	-	25	10	-
Cefotaxima (mg L ⁻¹)	-	-	-	50	50	50
Acetosseringona (µM)	-	-	100	-	-	-

Os sais minerais e os constituintes orgânicos utilizados foram os mesmos do MS e a estes foram acrescentados 30 g L⁻¹ de sorbitol e pHs ajustados para 5,7. Posteriormente foram autoclavados durante 20 minutos à temperatura de 121°C e 1,5 atm.

Resultados

Teste de resistência a higromicina

Os resultados evidenciaram que na presença de concentrações mais elevadas de higromicina (25, 50, 75 e 100 mg L⁻¹) os explantes logo se tornaram necrosados. Portanto, outro experimento foi montado com concentrações inferiores (2,5, 5,0, 7,5 e 10 mg L⁻¹) e neste, na concentração de 2,5 mg L⁻¹, apesar de não haver regeneração, os tecidos ainda permaneceram verdes. A partir de 5,0 mg L⁻¹ houve uma total morte dos tecidos vegetais (Figura 2).

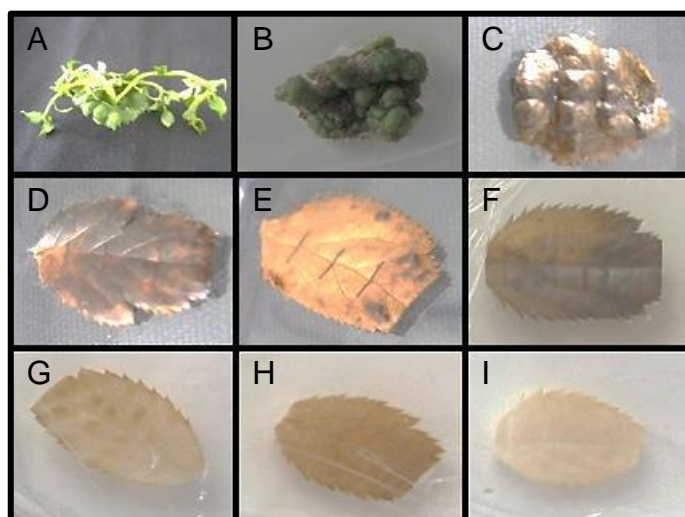


Figura 2- Teste de resistência a higromicina em explantes foliares do portaenxerto de macieira, Marubakaido. (A) Controle, 0 mg L⁻¹. (B) 2,5 mg L⁻¹. (C) 5,0 mg L⁻¹. (D) 7,5 mg L⁻¹. (E) 10 mg L⁻¹. (F) 25 mg L⁻¹. (G) 50 mg L⁻¹. (H) 75 mg L⁻¹. (I) 100 mg L⁻¹.

Transformação genética

Verificou-se que o protocolo 1 (Tabela 2) não foi eficiente, pois 10 dias após a transformação os explantes foliares já apresentavam início de necrose nas folhas infectadas, e aos 30 dias necrose total. Portanto, dos 1360 explantes utilizados na transformação neste protocolo, nenhum sobreviveu.

O protocolo 2 foi superior ao protocolo 1 e 3, com regeneração em dois eventos de transformação, obtendo-se 4 explantes regenerantes (Tabela 3). Considerando todos os eventos de transformação realizados no protocolo 2 a taxa de explantes regenerantes foi baixa, da ordem de 0,34% num total de 1160. Contudo, nenhum destes sobreviveu após a transferência para o meio de

multiplicação. Este protocolo se diferencia do protocolo 1 em alguns aspectos, como: os explantes foram submetidos a um meio de pré-cultivo (meio de regeneração líquido), o cultivo das bactérias foi centrifugado e ressuspenso em meio de regeneração líquido + acetoseringona, o meio de co-cultivo constituiu-se do meio de regeneração líquido, a concentração de higromicina foi diminuída para 10 mg L^{-1} e os explantes foram submetidos ao escuro logo após as lavagens, permanecendo por uma semana e depois dispostos em sala de crescimento. Este protocolo mostrou-se efetivo, diminuindo a necrose precoce dos explantes, aumentando assim a possibilidade de regeneração de gemas (Figura 3).

No protocolo 3 verificou-se que nenhum dos 941 explantes sobreviveram. Este protocolo se diferencia do protocolo 2 somente em um aspecto: após as lavagens, os explantes foram transferidos para meio de regeneração sem o antibiótico de seleção (higromicina), permanecendo por uma semana no escuro, logo após transferidos para meio com 5 mg L^{-1} de higromicina e dispostos em sala de crescimento, sendo que, após mais uma semana, aumentou-se a concentração de higromicina para 10 mg L^{-1} .

O antibiótico higromicina foi mantido nos meios de cultura durante o período de regeneração (com exceção de uma semana no protocolo 3) e desenvolvimento das gemas/brotações, inclusive quando as brotações foram transferidas para o meio de multiplicação.

Tabela 2- Eventos de transformação protocolo 1 com explantes regenerados e multiplicados de macieira, cultivar Marubakaido.

Eventos	Nº Explantes	Explantes	Explantes
Transformação		Regenerantes	Multiplicados
Transformação 1	280	0	0
Transformação 2	270	0	0
Transformação 3	250	0	0
Transformação 4	210	0	0
Transformação 5	350	0	0
Total	1360	0	0

Tabela 3- Eventos de transformação protocolo 2 com explantes regenerados e multiplicados de macieira, cultivar Marubakaido.

Eventos	Nº Explantes	Explantes	Explantes
Transformação		Regenerantes	Multiplicados
Transformação 1	200	3	0
Transformação 2	200	0	0
Transformação 3	204	0	0
Transformação 4	156	0	0
Transformação 5	204	1	0
Transformação 6	196	0	0
Total	1160	4	0

Tabela 4- Eventos de transformação protocolo 3 com explantes regenerados e multiplicados de macieira, cultivar Marubakaido.

Eventos	Nº Explantes	Explantes	Explantes
Transformação		Regenerantes	Multiplicados
Transformação 1	192	0	0
Transformação 2	127	0	0
Transformação 3	176	0	0
Transformação 4	169	0	0
Transformação 5	58	0	0
Transformação 6	219	0	0
Total	941	0	0

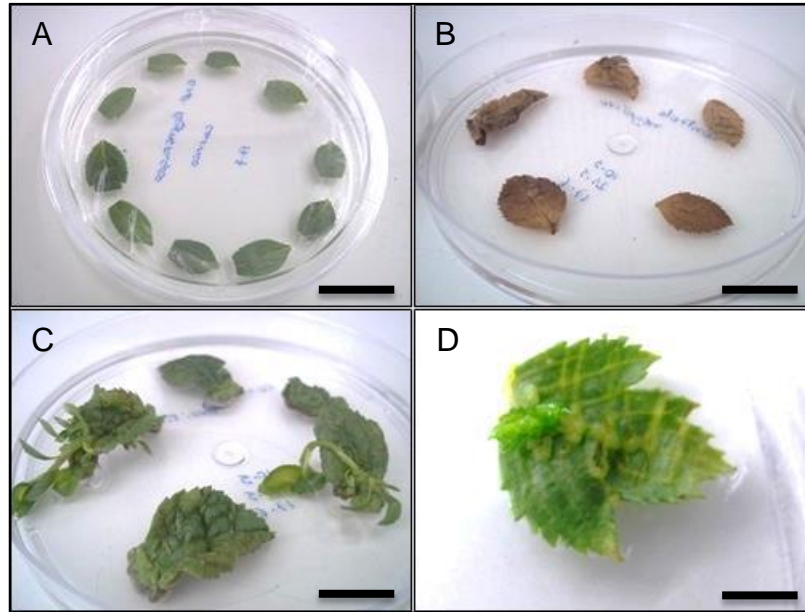


Figura 3- Explantes foliares e gemas do portaenxerto de macieira, Marubakaido, após a inoculação por *A. tumefaciens* (protocolo 2). (A) Explantes foliares após a infecção em meio de co-cultivo. (B) Controle negativo, com 10 mg L⁻¹ de higromicina. (C) Controle positivo, sem higromicina. (D) Gema infectada por *A. tumefaciens*.

Análise de reação em cadeia da polimerase

Devido ao insucesso dos três protocolos testados, foi realizada uma análise de PCR do plasmídeo 1300, que foi cedido pela EMBRAPA UVA E VINHO. O plasmídeo 1300 foi extraído a partir das *Agrobacterium tumefaciens* 1300 AS+S (dois clones) e o perfil do gel confirmou a ausência deste plasmídeo nas bactérias (Figura 4). Também foi testado o plasmídeo 3300 (EMBRAPA UVA E VINHO) (porém, este não faz parte deste trabalho). Contudo, como se pode visualizar na Figura 4, os dois clones da *Agrobacterium tumefaciens* 3300 AS+S, estão presentes.



Figura 4- Eletroforese em gel de agarose, visando à confirmação da ausência do plasmídeo 1300 na 1300 AS+S. Marcador molecular (M), 1300 AS+S (cedida pela EMBRAPA UVA E VINHO), 3300 AS+S (*Agrobacterium tumefaciens* cedida pela EMBRAPA UVA E VINHO, não faz parte deste trabalho), 3300 (plasmídeo), 1300 (plasmídeo).

Discussão

A higromicina é um antibiótico eficaz que inibe a síntese de proteína e é considerado como um agente de seleção eficaz na produção de plantas transgênicas (MARIASHIBU et al., 2013). Antes da transformação, uma concentração eficaz de higromicina para seleção dos transformantes foi determinada pela adição de diferentes concentrações de higromicina no meio de regeneração. No presente estudo 10 mg L^{-1} de higromicina inibiu completamente a regeneração dos explantes. Portanto, esta concentração foi designada como a concentração inibitória para a regeneração dos explantes, e foi usada para seleção de explantes transformados.

Contudo, o uso deste antibiótico causou fitotoxicidade. Pois, observaram-se visualmente necrose dos explantes e respectiva ausência de regeneração nas concentrações mais baixas testadas. Em trabalhos realizados com higromicina em folhas e segmentos foliares de *Malus*, utilizando a concentração de 5 mg L^{-1} não houve interferência no desenvolvimento, enquanto que na concentração de 10 mg L^{-1}

¹ os explantes tiveram a regeneração afetada (SUN et al., 2008; ZHANG et al., 2006). Na maioria dos trabalhos com *Malus*, a canamicina foi utilizada para a seleção dos transformantes, pois esta causa menor dano ao tecido de macieira (RADCHUCK; KORKHOVOY, 2005; SEDIRA et al., 2005; WILSON; JAMES, 2003; WELANDER et al., 1998; NORELLI et al., 1996).

O pré-cultivo de explantes antes da inoculação com *A. tumefaciens* tem mostrado eficiente na transformação (CURTIS et al., 1999; SANGWAN et al., 1991; MCHUGHEN et al., 1989). O efeito benéfico do tratamento de pré-cultivo é associado com o aumento da porosidade da parede celular, bem como a presença de reguladores de crescimento no meio; o aumento da porosidade pode ser um fator crítico para a passagem da molécula de T-DNA (CITOVSKY et al., 1989), enquanto que os reguladores de crescimento promovem a divisão celular, e células em divisão ativa são mais propensas à integração do T-DNA (SANGWAN et al., 1992; AN 1985). Além disso, o pré-cultivo pode também reduzir a interferência da bactéria ou do agente de seleção na diferenciação das células (MCHUGHEN et al., 1989). Sriskandarajah e Goodwin (1998) relataram que explantes de brotos de macieira cv. Delicious e Pink Lady, pré-cultivados por 4 dias e posterior infecção com *A. tumefaciens* apresentaram maior eficiência de transformação. Resultados semelhantes foram relatados em *Brassica oleracea* (TSUKAZI et al., 2002), *Lycium barbarum* (HU et al., 2006), citros (LI et al., 2003), trigo (WEIR et al., 2001), e ameixa (MANTE et al., 1991). No presente estudo, o pré-cultivo dos explante desempenhou papel crucial na eficiência de transformação, pois a infecção e co-cultivo de explantes foliares de macieira cv. Marubakaido sem pré-cultivo, não apresentou explantes regenerados, contudo, nenhum destes sobreviveu após a transferência para o meio de multiplicação.

O protocolo de transformação 2 demonstrou ser mais eficiente, em comparação com o protocolo 1 e 3, embora as gemas obtidas não tenham se desenvolvido, provavelmente por esses regenerantes serem “escapes”, já que a bactéria não possuía o plasmídeo. A eficiência da transformação é afetada por alguns fatores e, dentre eles, a presença do plasmídeo na *Agrobacterium tumefaciens* é um fator essencial, pois sem o plasmídeo não há infecção dos tecidos e, por conseguinte não há regeneração. A transformação é o resultado de um processo natural de transferência de genes entre a *Agrobacterium* e a célula vegetal: um fragmento de DNA, chamado T-DNA (que está presente em um plasmídeo), é

transferido para dentro da célula vegetal, integrado ao genoma nuclear e aí expresso de maneira estável (BRASILEIRO; DUSI, 1999). Este processo é controlado pela expressão coordenada da região vir, localizada no T-DNA, que codifica para uma proteína de membrana que percebe a presença dos metabólitos do tecido injuriado (VAN SLUYS, 1999). Dessa forma, a ausência de um plasmídeo impossibilita a transformação de qualquer tecido vegetal.

Portanto, os resultados obtidos no presente estudo mostraram que o pré-cultivo dos explantes foliares por 3 dias, a permanência destes no escuro por uma semana após as lavagens, bem como a redução da concentração de higromicina para 10 mg L^{-1} , apresentaram um efeito benéfico na eficiência da transformação. Contudo, não havendo plasmídeo na bactéria os explantes regenerantes provavelmente foram “escapes”, e desse modo, não se desenvolveram.

Conclusões

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

-O pré-cultivo dos explantes foliares afetam a sobrevivência dos mesmos após o processo de transformação;

-Os explantes utilizados apresentam alta sensibilidade à higromicina, antibiótico escolhido para seleção de células infectadas;

-A exposição a um período de escuro após o processo de transformação melhora a resposta dos explantes;

-A ausência do plasmídeo na *Agrobacterium tumefaciens* foi o fator determinante para o insucesso dos três protocolos testados.

Referências bibliográficas

AN, G. High efficiency transformation of cultured tobacco cells. **Plant Physiology**, Rockville, v.79, n.2, p.568-570, 1985.

ALDWINCKLE, H.; MALNOY, M. Plant regeneration and transformation in the rosaceae. **Transgenic Plant Journal** 3, (Special Issue 1), 2009. p.1-39.

BRASILEIRO, A. C. M.; DUSI, D. M. A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1999. p.679-736.

BORNHOFF, B. A.; HARST, M.; ZYPRIAN, E.; TOPFER, R. Transgenic plants of *Vitis vinifera* cv Seyval blanc. **Plant Cell Reports**, New York, v.24, n.7, p.433-438, sep. 2005.

CANDRESSE, T.; LANNEAU, M.; REVERS, F.; GRASSEAU, N.; MACQUAIRE, G.; GERMAN, S.; MALINOWSKI, T.; DUNEZ, J. An immuno-capture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of the Apple chlorotic leaf spot virus. **Acta Horticulturae**, v.386, p.136-147, 1995.

CITOVSKY, V.; WONG, M. L.; ZAMBRYSKI, P. Cooperative interaction of *Agrobacterium* Vir E2 protein with single-stranded DNA: implications for the DNA transfer process. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v.86, n.4, p.1193-1197, feb. 1989.

CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 41., 2008. Belo Horizonte. **Genetic engineering applied to the development of plants resistant to viruses and fugi**. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2008. 75 p.

CURTIS, I. S.; POWER, J. B.; HEDDEN, P.; WARD, D. A.; PHILLIPS, A.; LOWER, K. C.; DAVEY, M. R. A stable transformation system for the ornamental plant, *Datura meteloides* (D.C.). **Plant Cell Reports**, v.18, n.7-8, p.554-560, mar. 1999.

DAI, H.; LI, W.; MAO, W.; ZHANG, L.; HAN, G.; ZHAO, K.; LIU, Y.; ZHANG, Z. Development of an efficient regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation system in crab apple (*Malus micromalus*) using cotyledons as explants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, New York, v.50, n.1, p.1-8, mar. 2014.

HAMILTON, A. J.; BAULCOMBE, D. C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. **Science**, Washington, v.286, n.5441, p.950-952, oct. 1999.

HU, Z.; WU, Y. R.; LI, W.; GAO, H. H. Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of *Lycium barbarum* L. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Oxon, v.42, n.5, p.461-466, sep/oct. 2006.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola 2013**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Online. Acesso em 30 jan. 2014.

IGARASHI, M.; OGASAWARA, H.; HATSUYAMA, Y.; SAITO, A.; SUZUKI, M. Introduction of *rolC* into Marubakaidou (*Malus prunifolia* Borkh. var. *ringo* Asami Mo 84-A) apple rootstock via *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Science**, Clare, v.163, n.3, p.463-473, sep. 2002.

LI, D. D.; SHI, W.; DENG, X. X. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated embryogenic callus transformation of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) containing the *pTA29-barnase* gene. **Tree Physiology**, Victoria, v.23, n.17, p.1209-1215, dec. 2003.

MAGOME, H.; YOSHIKAWA, N.; TAKAHASHI, T.; ITO, T.; MIYAKAWA, T. Molecular variability of the genomes of capilloviruses from apple, Japanese pear, European pear, and citrus trees. **Phytopathology**, St Paul, v.87, n.4, p.389-396, apr. 1997.

MANTE, S.; MORGENS, P. H.; SCORZA, R.; CORTS, J. M.; CALLAHAN, A. M. *Agrobacterium*-mediated transformation of plum (*Prunus domenstica* L.) hypocotyls slices and regeneration of transgenic plant. **Nature Biotechnology**, v.9, p.853-857, sep. 1991.

MARIASHIBU, T. S.; SUBRAMANYAM, K.; ARUN, M.; MAYAVAN, S.; RAJESH, M.; THEBORAL, J.; MANICKAVASAGAM, M.; GANAPATHI, A. Vacuum infiltration enhances the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in Indian soybean cultivars. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v.35, n.1, p. 41-54, jan. 2013.

MCHUGHEN, A.; JORDAN, M.; FEIST, G. A pre-culture period prior to *Agrobacterium* inoculation increases production of transgenic plants. **Journal of Plant Physiology**, v.135, n.2, p.245-248, oct. 1989.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-479, jul. 1962.

NICKEL, O.; JELKMANN, W.; KUHN, G. B. Occurrence of *Apple stem grooving capillovirus* in Santa Catarina, Brazil, detected by RT-PCR. **Fitopatologia Brasileira**, Lavras, v.24, n.3, p.444-446, 1999.

NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M.; JELKMANN, W.; KUHN, G. B. Sequence analysis of the capsid protein gene of an isolate of *Apple stem grooving virus*, and its survey in southern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Lavras, v.26, n.3, p.655-659, sep. 2001.

NICKEL, O.; FAJARDO, T. V.; TARGON, M. L. N. P.; MACHADO, M. A.; TRIVILIN, A. P. Production and use of polyclonal antibodies to the coat protein of Apple stem grooving virus expressed in *Escherichia coli*. **Proceedings of the Xixth International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops: Fruit Tree Diseases**, n.657, p.35-40, 2004.

NORELLI, J. L.; MILLS, J.; ALDWINCKLE, H. S. Leaf wounding increases efficiency of *Agrobacterium* mediated transformation of apple. **HortScience**, Alexandria, v.31, n.6, p.1026-1027, oct. 1996.

PALAUQUI, J. C.; ELMAYAN, T.; POLLIEN, J. M.; VAUCHERET, H. Systemic acquired silencing: Transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. **EMBO Journal**, Oxford, v.16, n.15, p.4738-4745, aug. 1997.

PARROTT, W.; CHASSY, B.; LIGON, J.; MEYER, L.; PETRICK, J.; ZHOU, J.; HERMAN, R.; DELANEY, B.; LEVINE, M. Application of food and feed safety assessment principles to evaluate transgenic approaches to gene modulation in crops. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.48, n.7, p.1773-1790, jul. 2010.

RADCHUCK, V. V.; KORKHOVOY, V. I. The *rolB* gene promoters rooting *in vitro* and increases fresh root weight *in vitro* of transformed apple scion cultivar 'Florina'. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.81, n.2, p.203-212, may. 2005.

SANGWAN, R. S.; BOURGEOIS, Y.; SANGWAN-NORREEL, B. S. Genetic transformation of *Arabidopsis thaliana* zygotic embryos and identification of critical parameters influencing transformation efficiency. **Molecular Genetics and Genomics**, New York, v.230, n.3, p.475-485, dec. 1991.

SANGWAN, R. S.; BOURGEOIS, Y.; BROWN, S.; VASSEUR, G.; SANGWAN-NORREEL, B. Characterisation of competent cells and early events of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, New York, v.188, n.3, p.439-456, oct. 1992.

SARTORETTO, L. M.; SALDANHA, C. W.; PIMENTEL, M.; CORDER, M. Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.3, p.861-871, 2008.

SEDIRA, M.; BUTLER, E.; GALLAGHER, T.; WELANDER, M. Verification of auxin induced gene expression during adventitious rooting in *rolB* transformed and untransformed apple Jork 9. **Plant Science**, Clare, v.168, n.5, p.1193-1198, may. 2005.

SEONG, E. S.; SONG, K. J.; JEONG, S.; YU, C. Y.; CHUNG, I. M. Silver nitrate and aminoethoxyvinylglycine affect *Agrobacterium*-mediated apple transformation. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.45, n.1, p.75-82, jan. 2005.

SHOU, H.; FRAME, B. R.; WHITHAM, S. A.; WANG, K. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. **Molecular Breed**, Netherlands, v.13, p.201-208, 2004.

SILVA, F. N. da. **Detecção e caracterização biológica e molecular de vírus em acessos antigos de macieira e strawberry mild yellow edge virus em morangueiro**. 2007. 84 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2007.

SRISKANDARAJAH, S.; GOODWIN, P. Conditioning promotes regeneration and transformation in apple leaf explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.53, n.1, p.1-11, 1998.

STANIENÈ, G.; RUGIENIUS, R.; GELVONAUSKIENÈ, D.; STANYS, V. Effect of *rolB* transgene on *Prunus cerasus* x *P. canescens* and *Cydonia oblonga* microshoot rhizogenesis. **Biologija**, v.18, n.1, p.23-26, 2007.

SUN, C. Y.; WANG, Y.; XU, X. F.; SUN, Y.; ZHU, L. H.; HAN, Z. H. Regeneration from leaf segments of *in vitro*-grown shoots of *Malus baccata*. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, New Zealand, v.36, n.4, p.233-238, dec. 2008.

TANG, S.; SUN, M.; LIAO, Z.; ZHOU, Q.; LI, D. Obtainment of transgenic 'Xueqing' pear plants with a synthetic *Cry1Ac* gene mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Acta Horticulturae Sinica**, v.34, n.1, p.59-62, 2007.

TSUKAZI, H.; KUGINUKI, Y.; AIDA, R.; SUZUKI, T. *Agrobacterium*-mediated transformation of a double haploid line of cabbage. **Plant Cell Reports**, New York, v.21, n.3, p.257-262, 2002.

VAN SLUYS, M. A. *Agrobacterium*: um vetor genético natural para transformação em plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1999. p.737-760.

VAUCHERET, H.; BÉCLIN, C.; FAGARD, M. Post-transcriptional gene silencing in plants. **Journal of Cell Science**, v.114, n.17, p.3083-3091, 2001.

WATERHOUSE, P. M.; GRAHAM, M. W.; WANG, M. B. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. **Proceedings of National Academy of Science of the United States of America**, v. 95, n.23, p.13959-13964, 1998.

WEIR, B.; GU, X.; WANG, M.; UPADHYAYA, N.; ELLION, A.; BRETTELL, R. I. S. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of wheat using suspension cells as a mode system and green fluorescent protein as a viral marker. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, p.307-318, 2001.

WELANDER, M.; PAWLICKI, N.; HOLEFORS, A.; WILSON, F. Genetic transformation of apple rootstock M26 with *rolB* gene and its influence on rooting. **Journal of Plant Physiology**, Germany, v.53, n.3-4, p.371-380, oct. 1998.

WILSON, F. M.; JAMES, D. J. Regeneration and transformation of the premier UK apple (*Malus x pumila* Mill.) cultivar Queen Cox. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Kent, v.78, n.5, p.656-662, sep. 2003.

ZHANG, Z.; SUN, A.; CONG, Y.; SHENG, B.; YAO, Q.; CHENG, Z. *Agrobacterium*-mediated transformation of the apple rootstock *Malus micromalus* Makino with the *RoIC* gene. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Oxon, v.42, n.6, p.491-497, nov/dec. 2006.

ZHAO, Y.; LIU, Q.; DAVIS, R. E. Transgene expression in strawberries driven by a heterologous phloem-specific promoter. **Plant Cell Reports**, New York, v.23, n.4, p.224-230, oct. 2004.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente muitos experimentos têm sido realizados a fim de aperfeiçoar os meios de produção, sanando as dificuldades e enfatizando a relação custo/benefício. No decorrer das pesquisas realizadas, foi possível verificar que os explantes foliares respondem diferentemente as variáveis experimentais. Entretanto, constatou-se que o carvão ativado e o enraizamento *in vitro* foram bastante influentes nos resultados positivos, principalmente quando os explantes foram incubados no escuro, onde se observa brotações de melhor qualidade.

No entanto, o insucesso na transformação dos explantes foliares, denota a necessidade do aprimoramento das técnicas, em especial no que refere ao protocolo 2, haja visto que esse protocolo pode permitir que os explantes cheguem ao fim do processo com maior vigor, aumentando assim, a chance de regeneração dos mesmo. Diante do exposto, a continuidade nos teste é de suma importância para o aprimoramento das técnicas e maior entendimento dos processos fisiológicos que medeiam a possibilidade de maior sucesso nos objetivos.