

**FERNANDA DE CARVALHO MICHELUZZI**

**Estudo da organogênese *in vitro* de explantes foliares  
de macieira (*Malus domestica* Borkh) Cv. Galaxy**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

**Orientação: Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva**

**FLORIANÓPOLIS – SC**

**2007**

**“Leva tempo para alguém ser bem sucedido  
porque o êxito não é mais do que a recompensa natural pelo tempo  
gasto em fazer algo direito”.**

(Joseph Ross)

**Aos meus pais Hélio Micheluzzi e  
Isabel Patrícia de Carvalho Micheluzzi,  
DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por sempre iluminar meu caminho proporcionando a realização de mais esta etapa em minha vida.

À minha família, em especial aos meus pais, exemplos de dedicação ao trabalho, pelo apoio e incentivo não só nesta etapa, mas no decorrer de toda minha vida.

Ao professor Dr. Aparecido da Silva Lima, pela orientação, pela confiança, paciência e conhecimentos transmitidos.

À professora Dra. Marisa Santos, por disponibilizar o Laboratório de Anatomia Vegetal, pela colaboração, por toda a atenção, dedicação, apoio e conhecimentos transmitidos.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais e do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Catarina pela convivência e transmissão de conhecimentos.

À Luisa pela disponibilidade, atenção e auxílio prestados sempre que precisei.

À Bernadete, secretária do Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, pela paciência, ajuda e serviços prestados.

À equipe do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, André, Carol, Daniela, Fábio, Luciano, Luiz Pacheco, Pópo, Priscila, Shirley, Taiza, Voltolini, pelo auxílio, amizade e convivência.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em RGV, Samantha, Adriana, Rafael, Ricardo, André, Walter, Juliana, Cristiane, Cristina, Volmir pela convivência, companhia e amizade conquistada.

Às colegas e amigas do Programa de pós-graduação em Biologia Vegetal, Gislaine e Carol, pela ajuda, paciência, convívio, ensinamentos e pela amizade conquistada.

Especialmente, às amigas e companheiras de mestrado Mariane e Sandra que estiveram presentes em vários momentos no decorrer do curso, momentos de alegrias, de tristezas, de comemorações, de divertimento, estes que ficarão guardados com muito carinho no coração.

À minha amiga, irmã de coração, companheira de moradia, Carla Gianne, pela paciência, compreensão, apoio, incentivo, atenção, convivência, por sempre me ouvir, me aconselhar em momentos de alegrias, tristeza, pelas festas, pelos

momentos agradáveis e pelos de dificuldades que já passamos juntas, mas principalmente pela amizade incondicional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de pesquisa concedida.

E a todos que, direta e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## ÍNDICE

<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	vii
<b>Lista de Tabelas</b> .....	viii
<b>Lista de Figuras</b> .....	ix
<b>Resumo</b> .....	xii
<b>Abstract</b> .....	xiii
<b>1. Introdução</b> .....	14
<b>2. Revisão Bibliográfica</b> .....	17
2.1. Produção e importância da cultura da macieira ( <i>Malus domestica</i> Borkh.)....	17
2.2. Cultura <i>in vitro</i> .....	18
2.3. Morfogênese <i>in vitro</i> .....	20
2.4. Organogênese <i>in vitro</i> e melhoramento genético.....	21
2.5. Organogênese direta <i>in vitro</i> .....	23
2.6. Análise histológica em espécies cultivadas <i>in vitro</i> .....	25
<b>3. Objetivos</b> .....	28
3.1. Objetivo geral.....	28
3.2. Objetivos específicos.....	28
<b>4. Material e Métodos</b> .....	29
4.1. Material Vegetal.....	29
4.2. Estabelecimento <i>in vitro</i> .....	29
4.3. Multiplicação <i>in vitro</i> .....	30
4.4. Organogênese <i>in vitro</i> .....	30
4.4.1. Experimento 01.....	30
4.4.2. Experimento 02.....	31
4.4.3. Experimento 03.....	32
4.5. Condições de cultura <i>in vitro</i> .....	33
4.6. Análise histológica.....	33
4.7. Análises estatísticas.....	34
<b>5. Resultados e Discussão</b> .....	35
5.1. Estabelecimento <i>in vitro</i> .....	35
5.2. Multiplicação <i>in vitro</i> .....	39
5.3. Organogênese direta <i>in vitro</i> .....	43
5.3.1. Experimento 01: explantes “folhas seccionadas”.....	43
5.3.2. Experimento 02: explantes “folhas inteiras”.....	47
5.3.3. Experimento 03: explantes “discos foliares”.....	51
5.4. Análise histológica.....	56
<b>6 . Conclusões e Considerações Finais</b> .....	61
<b>7. Referências Bibliográficas</b> .....	62
<b>8. Anexo</b> .....	77

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**AIA** – Ácido indolacético

**ANA** – Ácido naftalenoacético

**BAP** – 6-Benzilaminopurina

**CCA** – Centro de Ciências Agrárias

**cm** – Centímetro

**g** – Grama

**°C** – Graus Celsius

**GA3** – Ácido giberileico

**LMBV** – Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal

**mg** – Miligrama

**mL** – Mililitros

**mm** – Milímetro

**MS** – Meio de cultura de Murashige e Skoog (1962)

**$\mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$**  – Micromol de fótons por metro quadrado por segundo

**$\mu\text{M}$**  – Micromol

**l** – Litro

**pH** – Potencial hidrogeniônico

**s** – Segundo

**TDZ** – Thidiazuron

**UFSC** – Universidade Federal de Santa Catarina

**LISTA DE TABELAS**

	Página
Tabela 01. Tratamentos aplicados no primeiro experimento para regeneração dos explantes de macieira, cultivar Galaxy.....	31
Tabela 02. Tratamentos aplicados no segundo experimento para regeneração dos explantes de macieira, cultivar Galaxy.....	32
Tabela 03. Tratamentos aplicados no terceiro experimento para regeneração dos explantes de macieira, cultivar Galaxy.....	32
Tabela 04. Número médio de regeneração de brotos obtidos em explantes foliares de macieira <i>Malus domestica</i> Borkh. cv. "Galaxy", aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> , em relação as diferentes concentrações de TDZ testadas.....	45

## LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 01. Percentuais de contaminação dos segmentos nodais de *Malus domestica* Borkh, "Galaxy" referentes aos tratamentos T1 (10' em hipoclorito de sódio (2,5%) e 1' em etanol (70%)), T2 (15' em hipoclorito de sódio (2,5%) e 1' em etanol (70%)) e T3 (20' em hipoclorito de sódio (2,5%) e 1' em etanol (70%)) em meio de cultura MS suplementados com 2,22 $\mu$  M de BAP e 2,7  $\mu$  M de ANA, e 3g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, após 15 dias de cultura *in vitro* (N=20). Médias não seguidas pela mesma letra, diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.....37

Figura 02. Percentuais do tipo de contaminação dos segmentos nodais e de oxidação dos explantes de *Malus domestica* Borkh, referentes aos tratamentos T1 (10' em hipoclorito de sódio (2,5%) e 1' em etanol (70%)), T2 (15' em hipoclorito de sódio (2,5%) e 1' em etanol (70%)) e T3 (20' em hipoclorito de sódio (2,5%) e 1' em etanol (70%)) em meio de cultura MS suplementados com 2,22 $\mu$  M de BAP e 2,7  $\mu$  M de ANA, e 3g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado após 15 dias de cultivo *in vitro* (N=20). Médias não seguidas pela mesma letra minúscula para tratamentos diferentes e maiúscula entre os mesmos tratamentos, diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.....37

Figura 03. Número médio de brotos de *Malus domestica* Borkh."Galaxy" emitidos por explante inicial referentes aos 45 dias de cultura *in vitro* em meio de cultura MS: T1(isento de fitorregulador); T2(MS + 4,44 $\mu$ Mol/L de BAP); T3(MS + 8,88 $\mu$ Mol/L de BAP); T4(MS + 13,31 $\mu$ Mol/L de BAP); T5(MS + 17,75 $\mu$ Mol/L de BAP) (N=45). Médias não seguidas pela mesma letra, diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.....41

Figura 04. Altura média dos brotos de *Malus domestica* Borkh . emitidos por explante inicial referentes aos 45 dias de cultura *in vitro* em meio de cultura MS: T1(isento de fitorregulador); T2(MS + 4,44 $\mu$ Mol/L de BAP); T3(MS + 8,88 $\mu$ Mol/L de BAP); T4(MS + 13,31 $\mu$ Mol/L de BAP); T5(MS + 17,75 $\mu$ Mol/L de BAP) (N=45). Médias não seguidas pela mesma letra, diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.....41

Figura 05. Número médio de brotos de *Malus domestica* Borkh. com altura igual ou maior a 2 cm, emitidos por explante inicial referentes aos 45 dias de cultura *in vitro* em meio de cultura MS: T1(isento de fitorregulador); T2(MS + 4,44 $\mu$ Mol/L de BAP); T3(MS + 8,88 $\mu$ Mol/L de BAP); T4(MS + 13,31 $\mu$ Mol/L de BAP); T5(MS + 17,75 $\mu$ Mol/L de BAP) (N=45). Médias não seguidas pela mesma letra, diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.....42

Figura 06. Percentuais de regeneração dos explantes de *Malus domestica* Borkh aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*, referentes aos tratamentos 5 (9,1 $\mu$ M de TDZ + 0,54 $\mu$ M de ANA - APICAL), tratamento 6 (9,1 $\mu$ M de TDZ + 0,54 $\mu$ M de ANA - BASAL) e tratamento 7 (18,16 $\mu$ M de TDZ + 0,54 $\mu$ M de ANA - APICAL) (N=10). Médias não seguidas pela mesma letra, diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.....45

Figura 07. Regeneração e crescimento de brotações de macieira *Malus domestica* Borkh cv. “Galaxy” a partir de organogênese foliar, inoculadas em meio de cultura MS suplementado com 9,1 $\mu$ M de TDZ e 0,54 $\mu$ M de ANA cultivadas *in vitro* após 25 dias (A), 28 dias (B), 35 dias (C), 45 dias (D), 51 dias (E) e 60 dias (F) da inoculação.....46

Figura 08. Taxa de regeneração dos explantes foliares de *Malus domestica* Borkh, cv. “Galaxy” referentes aos tratamentos T1 (4,54  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA), T2 (9,1  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA), T3 (13,62  $\mu$ M TDZ+ 0,54  $\mu$ M ANA) e T4 (18,16  $\mu$ M TDZ + 0,54 ANA) após 24, 38, 45 e 60 dias de cultura *in vitro* (N=12). Médias não seguidas pela mesma letra, diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.....50

Figura 09. Índices percentuais de crescimento de massa celular nos explantes foliares de *Malus domestica* Borkh, cv. “Galaxy” referentes aos tratamentos T1 (4,54  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA), T2 (9,1  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA), T3 (13,62  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA) e T4 (18,16  $\mu$ M TDZ + 0,54 ANA) após 24 dias de cultura *in vitro* (N=12). Barras verticais correspondem aos desvios padrões das médias.....50

Figura 10. Taxa de regeneração dos explantes foliares de *Malus domestica* Borkh, “Galaxy” referentes aos tratamentos T1 (4,54  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA), T2 (9,1  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA), T3 (13,62  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA) e T4 (18,16  $\mu$ M TDZ + 0,54 ANA) após 30 dias de cultura *in vitro* (N=60). Médias não seguidas pela mesma letra, diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.....52

Figura 11. Taxa de crescimento de massa celular nos explantes foliares de *Malus domestica* Borkh, “Galaxy” referentes aos tratamentos T1 (4,54  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA), T2 (9,1  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA), T3 (13,62  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA) e T4 (18,16  $\mu$ M TDZ + 0,54 ANA) após 30 dias de cultivo *in vitro* (N=60). Barras verticais correspondem aos desvios padrões das médias.....52

Figura 12. Taxa de regeneração dos explantes foliares de *Malus domestica* Borkh, “Galaxy” referentes aos tratamentos T1 (4,54  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA), T2 (9,1  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA), T3 (13,62  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA) e T4 (18,16  $\mu$ M TDZ + 0,54 ANA) após 90 dias de cultura *in vitro* (N=60). Barras verticais correspondem aos desvios padrões das médias. Médias não seguidas pela mesma letra, diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.....54

Figura 13. Número médio de brotos regenerados por explante foliar de *Malus domestica* Borkh, “Galaxy” referentes aos tratamentos T1 (4,54  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA), T2 (9,1  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA), T3 (13,62  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA) e T4 (18,16  $\mu$ M TDZ + 0,54 ANA) após 90 dias de cultura *in vitro* (N=60). Médias não seguidas pela mesma letra, diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.....54

Figura 14. Altura média dos brotos regenerados por explante foliar de *Malus domestica* Borkh, “Galaxy” referentes aos tratamentos T1 (4,54  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA), T2 (9,1  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA), T3 (13,62  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA) e T4 (18,16  $\mu$ M TDZ + 0,54 ANA) após 90 dias de cultivo *in vitro* (N=60).

Médias não seguidas pela mesma letra, diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.....55

Figura 15 A-D. Secções transversais de explantes foliares de *Malus domestica* Borkh. cultivados *in vitro*. 15A .Intensa proliferação celular. Note formato desigual das células. Barra=50µM. 15B. Desorganização do sistema vascular (Seta). Barra=100 µM. 15C. Divisões periclinais, anticlinais e oblíquas no tecido parenquimático esponjoso (Seta). Barra=50 µM. 15D. Células do parênquima esponjoso formando grupamentos alongados e direcionados aos estômatos. e=estômato. Note divisões periclinais (Seta). Barra=50 µM.....59

Figura 16 A-D. Secções de explantes foliares de *Malus domestica* Borkh. cultivados *in vitro*. 16<sup>a</sup> . Gema adventícia no início do desenvolvimento (Seta). Barra=25 µM. 16B. Região de conexão entre parênquima esponjoso do explante e a gema adventícia (Seta). Pe=parênquima esponjoso. Barra=50 µM. 16C. Gema adventícia com evidentes primórdios foliares. Pf=primórdios foliares. Pc=procâmbio. Barra=50 µM. 16D. Detalhe do procâmbio da gema adventícia (Seta). Barra= 50 µM.....60

## RESUMO

A fruticultura de clima temperado é uma atividade de grande importância sócio-econômica no Brasil, sendo que a maior área de produção está localizada na Região Sul do país, e o Estado de Santa Catarina é responsável por cerca de 50% da oferta nacional. O consumo da maçã vem aumentando e com o rápido aumento da área de cultivo da macieira, houve um acréscimo de problemas fitossanitários. Para manter a cultura da macieira em nível de produtividade desejada, a utilização de técnicas biotecnológicas para obtenção de mudas de qualidade genética-sanitária comprovada, das novas variedades, a produção de plantas matrizes básicas de melhor qualidade e produtividade, são algumas das condições importantes para a macieira. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver protocolos de regeneração *in vitro* para macieira (*Malus domestica* Borkh) cv. Galaxy, via organogênese direta, para estudos de propagação *in vitro* e melhoramento genético. Para isto foram usados como explantes segmentos nodais contendo gemas, apicais e laterais, e folhas os quais foram introduzidos em meio de cultura MS suplementado com BAP, TDZ e ANA. No estabelecimento *in vitro*, os tratamentos de assepsia aplicados foram pouco eficientes, apresentando índices de contaminação que variaram entre 5 a 40%. No processo de multiplicação *in vitro*, a concentração de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP foi a mais efetiva para multiplicação e produção de brotos com altura igual ou superior a 20 mm. A respeito da organogênese, a partir de explante foliar, pôde-se observar que o tipo de explante, isto é, o limbo seccionado foi favorável ao processo de regeneração de brotações. Entretanto, o explante folha inteira apresentou os melhores resultados, onde obteve-se um maior número de explantes regenerados. A concentração de 9,1  $\mu\text{M}$  de TDZ adicionada ao meio de cultura, foi a concentração que apresentou os resultados favoráveis a regeneração de brotações. No entanto, para os discos foliares, a concentração que apresentou resultados superiores foi 13,62  $\mu\text{M}$  de TDZ. Os resultados das análises histológicas permitem inferir que a organogênese das brotações teve origem direta de células do mesofilo, ou seja, células do parênquima. Porém não podemos afirmar que todas as brotações adventícias originaram-se deste tecido, pois observou-se a presença de calos nos explantes no decorrer dos experimentos.

## ABSTRACT

The fruticultura of tempering climate is an activity of great partner-economic importance in Brazil, being that the biggest area of production is located in the South Region of the country, and the State of Santa Catarina is responsible for about 50% of offers national. The consumption of the apple comes increasing and with the fast increase of the area of culture of the apple tree, it had an addition of resistant to biotic and abiotic stresses. To keep the culture of the apple tree in level of desired productivity, the use of biotechnological techniques for attainment of dumbs of proven genetics-sanitary quality, of the new varieties, the production of basic first plants of better quality and productivity, they are some of the important conditions for the apple tree. The objective of this work was to develop regeneration protocols *in vitro* for apple tree (*Malus domestica* Borkh) cv. Galaxy, of organogenesis direct, for propagation studies *in vitro* and genetic improvement. For used as internodal explants and leaves where they had been introduced in cultured MS medium, with BAP, TDZ and ANA. In the establishment *in vitro* the applied treatments of asepsis had been little efficient, presented contamination indices that had varied between 5-40%. In the multiplication process the concentration of 4,44  $\mu\text{M}$  of BAP was most effective for multiplication and production of shoots. Regarding organogenesis from leave explant, it could be observed that the type of explant, that is, the cut of the limb was favorable to the process of regeneration of shoots. However, the explant entire leaf presented the best ones resulted, where a bigger number of regenerated explants was gotten. The concentration of 9,1  $\mu\text{M}$  of TDZ added to the medium of culture, was the concentration that presented the favorable results the regeneration of shoots. However, for folial disks, the concentration that presented resulted superior was 13,62  $\mu\text{M}$  of TDZ. The results of the histological analyses allow to infer that organogenesis of the shoots, had direct origin of cells of mesophyll, or either, cells of parenchyma, however we cannot affirm that all the adventitious buds had originated, therefore observed it presence of callus in the explants in elapsing of the experiments.

## 1. INTRODUÇÃO

A fruticultura de clima temperado é uma atividade de grande importância sócio-econômica e representa uma importante fração da produção de frutas no Brasil, estando a maior área localizada na Região Sul do país (Zanetti, 2002).

A maçã é a fruta de clima temperado mais comercializada *in natura* tanto no contexto internacional quanto brasileiro. A cultura da macieira é recente no Brasil e estabeleceu-se por meio de grandes empresas a partir da década de 1970 atraídas por incentivos de políticas públicas (Mello, 2004). Há 30 anos, a produção brasileira era de apenas 14 mil toneladas/ano, atualmente, o Brasil produz cerca de 864 mil toneladas/ano (ICEPA, 2007). Não há outro país no mundo onde a produção tenha crescido tanto em tão pouco tempo (Boneti *et al.*, 1999).

A produção de maçãs no Brasil é continuamente crescente, bem como as exportações e a importância econômica-social. O Brasil, que antigamente era um país importador de maçãs, hoje exporta frutas para diversos países, algo em torno de 97 mil toneladas/ano, principalmente para os membros da União Européia (IBRAF, 2005).

Atualmente, a maçã apresenta grande importância no mercado nacional, sendo o terceiro maior consumo *per capita* do país, visto que, a banana e a laranja, ocupam o primeiro e segundo lugar, respectivamente, em termos de maior consumo. De acordo com Borges Jr. (1999), de 1975 até os dias atuais, o consumo *per capita* cresceu de 1,3 kg para 5,0 kg/habitante/ano.

Em Santa Catarina a produção de maçã encontra-se principalmente centrada na Região Meio-Oeste e Serrana, onde os municípios de Fraiburgo e São Joaquim detêm a maior produção; no Rio Grande do Sul, destaca-se Vacaria, Bom Jesus, Caxias do Sul (Boneti *et al.*, 2002). No Estado de Santa Catarina, a produção passou de 1.528 toneladas, colhidas na safra 1973/74, para 583.623 t na safra 2003/04, destacando-se como o maior produtor de maçãs do Brasil, totalizando 60% da produção nacional (ABPM, 2004).

Juntamente com o consumo da maçã e o rápido aumento da área de cultivo da macieira, apresentado uma área de quase 30 mil hectares no ano de 2000, houve um acréscimo de problemas fitossanitários (Katsurayama *et al.*,

2004). O controle de doenças e o custo do mesmo são fatores limitantes da cultura na atualidade, sendo que os fungicidas correspondem cerca de 20% do custo total (Boneti *et al.*, 2002). Além do aumento dos custos estes agrotóxicos utilizados para controlar pragas e doenças afetam as populações de inimigos naturais e levam a problemas de resistência aos produtos, além da contaminação ambiental e da presença de resíduos (Kovaleski *et al.*, 2000).

Para manter a cultura da macieira em nível de produtividade desejada, a utilização de técnicas biotecnológicas para obtenção de mudas de qualidade genética-sanitária comprovada, das novas variedades, a produção de plantas matrizes básicas de melhor qualidade e produtividade, são algumas das condições importantes para a macieira.

Assim, a cultura *in vitro* da macieira pode possibilitar avanços no conhecimento científico nas áreas da fisiologia, bioquímica e melhoramento genético, em relação aos patógenos, à resistência e à introdução de genes que determinam a produtividade e a qualidade dos frutos, podendo sanar ou reduzir os problemas atuais apresentados por esta cultura.

As espécies frutíferas, em geral, são perenes, de longo ciclo vegetativo, de porte relativamente grande e com alto nível de heterozigosidade, características estas que dificultam e aumentam o tempo necessário para um programa de melhoramento genético por meio do método convencional de hibridização. A biotecnologia, através da cultura de tecidos, da biologia molecular e das técnicas de transferência de genes, além de reduzir o tempo do processo de melhoramento genético de plantas, também possibilita que problemas agrônômicos e ambientais de difícil solução sejam superados. Várias características já foram introduzidas estavelmente em plantas através da transformação genética, incluindo a resistência a herbicidas, fungos, bactérias, vírus e insetos, e também melhorias na qualidade do produto (Mansur & Margis-Pinheiro, 1995)

A organogênese direta é o sistema biotecnológico mais apropriado para se obter a regeneração de células transformadas, pois evita a formação de escapes e diminui a possibilidade de ocorrer variação somaclonal, porém é mais difícil de se obter *in vitro* (Tzifira *et al.*, 1997).

Em macieira, o melhoramento genético através de metodologias de transgênese ainda se apresenta muito reduzido ou limitado, principalmente

pela dificuldade de regeneração de seus explantes e pela baixa eficiência na transformação.

Cultivares de macieira (*Malus domestica* Borkh.), como a mutação colorida da 'Gala', a 'Galaxy', atualmente difundida no mundo, também pode ser melhorada via transformação genética (Schuch, 2000). Um grupo de pesquisadores na França tem transformado geneticamente esta cultivar, porém existe a dificuldade de micropropagar plântulas modificadas geneticamente.

O pré-requisito para se obter sucesso na transformação genética de plantas, e também para a multiplicação rápida do genótipo modificado pela micropropagação, é um protocolo de regeneração eficiente (Nhut *et al.*, 2003), em que, além de fatores como o balanço entre auxinas e citocininas no meio de cultura, outros também são importantes em muitas espécies (Handro & Floh, 1990), como a cultivar e o tipo de explante utilizado (Rao *et al.*, 1996).

Neste sentido, este trabalho buscou estabelecer, multiplicar e desenvolver metodologias de organogênese direta *in vitro* de macieira cv. Galaxy, visando estabelecer um protocolo eficiente de regeneração de macieira, como fase inicial para a transgênese.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Produção e importância da cultura da macieira (*Malus domestica* Borkh.)

A macieira é uma espécie frutífera lenhosa, de clima temperado que é muito adaptável a diferentes ecossistemas, crescendo desde os trópicos até altas latitudes. Pertence à família das Rosaceae que abrange, cerca de 100 gêneros e mais de 2.000 espécies espalhadas por todo mundo (Iuchi, 2002).

A produção mundial de maçã tem oscilado, nos últimos anos, entre 57 e 60 milhões de toneladas anuais (USDA, 2005). A oferta está concentrada principalmente nos continentes asiático e europeu, os quais, no conjunto dos países, respondem por mais de 80% da produção. A China destaca-se com 35% do total da maçã produzida mundialmente. No continente americano, destacam-se as produções dos Estados Unidos (entre 4,8 e 5,0 milhões de toneladas anuais), Argentina e Chile (ao redor de 1,0 milhão de toneladas/ano) e Brasil (USDA, 2005).

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas com uma produção superior aos 34 milhões de toneladas, superado apenas pela China e Índia. A base agrícola da cadeia produtiva das frutas abrange 2,2 milhões de hectares, gera 4 milhões de empregos diretos e um PIB agrícola de US\$ 11 bilhões (IBRAF, 2005).

A produção de maçãs, no Brasil, está localizada basicamente na região Sul, compreendendo os Estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná, que têm respondido por mais de 98% da oferta nacional. Embora se constitua numa atividade relativamente recente no Brasil, apesar de alguns percalços relacionados ao comportamento climático em determinados períodos e a falta de material genético ideal para as regiões produtoras, ela tem apresentado resultados positivos nos últimos 30 anos (Abreu, 2006).

O Brasil na década de 1960 importava toda a maçã consumida no país, principalmente da Argentina. A produção comercial começou a aparecer nas estatísticas internacionais na década de 1980. A partir daí os plantios foram aumentando até chegar à condição de auto-suficiência e exportação de 76.181 toneladas em 1999 (Boneti *et al.*, 2002).

Em 2003, a fatia de mercado da maçã importada no mercado interno ficou em torno de 5%. Neste mesmo ano o Brasil teve um saldo positivo no comércio internacional de maçã de U\$ 22.069.944, portanto passou de um país tradicional importador de maçã para exportador (Mello, 2004).

Nos últimos cinco anos a atividade, de maneira geral, registrou um crescimento de oferta, com a produção de 864 mil toneladas de maçãs em 2006 (ICEPA, 2007).

As principais variedades de macieira cultivadas no Sul do Brasil são a Gala (46%) e a Fuji (45%) (Tsuchiya, 2001). Grande parte dos novos plantios está sendo feita com cultivares mutantes de Gala e Fuji, devido principalmente ao mercado que exige um produto sempre de melhor coloração e qualidade (Stainer *et al.*, 2001).

A busca por mutações somáticas da Gala visa principalmente a obtenção de frutos mais uniformes quanto à coloração (Camilo & Denardi, 2002). Existe um número relativamente grande de mutantes coloridas de Gala (Walsh & Volz, 1990), sendo a Galaxy uma das cultivares difundidas derivadas de mutações.

## **2.2. Cultura *in vitro***

Com a evolução das ciências biológicas, através da biotecnologia, muitas dificuldades, em relação à propagação da macieira e produção de mudas de qualidade, estão sendo superadas utilizando-se métodos de micropropagação através de ápices caulinares, gemas laterais, microestacas e cultivo de meristemas, obtendo-se plantas de macieira regeneradas *in vitro* (Nunes *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 2000; Schuch & Peters, 2002; Erig & Schuch, 2002; Teixeira, 2004; Abreu, 2006).

A utilização da biotecnologia na produção de plantas *in vitro* é conhecida por várias denominações como micropropagação, clonagem, cultura de tecidos, multiplicação por meristema e vem sendo desenvolvida há mais de 50 anos. Desde então, sua aplicação vem ocorrendo em todo o mundo, especialmente nos Estados Unidos, Europa e Ásia, com utilização massiva na área de produção de plantas ornamentais, frutíferas, silvicultura e certos produtos agrícolas (Zornig, 1996).

Através de cultura de tecidos vegetais pode-se acompanhar, observar processos que vão desde dados sobre a bioquímica e morfologia da diferenciação celular até um desenvolvimento de tecnologias e métodos para a produção clonal e melhoramento genético de vegetais (Villalobos & Thorpe, 1991; Rocha & Quoirin, 2004).

Ao longo desses anos até a atualidade, os estudos de cultura de tecidos têm proporcionado a regeneração de plantas para todos os sistemas de cultura *in vitro*, tais como a cultura de calos (Caboni, *et al.*, 2000; Rocha & Quoirin, 2004; Martins *et al.* 2001; Camargo *et al.* 1999), cultura de células em suspensão (Cabasson *et al.*, 1995; Assani *et al.*, 2002; Abreu, 2006), indução da embriogênese somática (Kunitake *et al.*, 1991; Ricci, 2002), indução da organogênese (Caboni, 2000; Schuch & Petters, 2002, Abreu & Pedrotti, 2003; Ribeiro, 2006) e o isolamento e cultivo de protoplastos (Benedito *et al.*, 2000; Mendes-da-Glória *et al.*, 2000; Costa, 2001, Abreu, 2006).

A cultura *in vitro* foi utilizada com êxito em espécies hortícolas desde a década de 1960 (Murashige e Skoog, 1962) e recentemente em espécies lenhosas, tal como a maceira (Nunes *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 2000; Schuch & Peters, 2002; Erig & Schuch, 2002, Erig & Schuch, 2003; Abreu, 2006). Esta metodologia apresenta mais vantagens que os sistemas de propagação convencionais. Segundo Villalobos & Thorpe (1991), as vantagens mais importantes são: incremento acelerado do número de plantas derivadas por genótipo, redução do tempo de multiplicação, possibilidade de multiplicar uma grande quantidade de plantas em uma superfície reduzida, a baixos custos e tempo economicamente reduzido, maior controle fitossanitário do material propagado, facilidade para transportar material *in vitro* de um país para outro e, possibilidade de multiplicar rapidamente uma variedade da qual existem poucos indivíduos.

A cultura *in vitro* ocorre em uma seqüência de estágios, cada qual apresentando necessidades específicas em termos de composição dos meios de cultura, tipo e balanço dos reguladores de crescimento e condições físicas como luz, temperatura e fotoperíodo. Em condições laboratoriais cada estágio deve ser identificado e as condições ótimas devem ser estabelecidas.

### 2.3. Morfogênese *in vitro*

A cultura de tecidos é uma das técnicas que possibilita a produção em massa de genótipos superiores livres de pragas e doenças (Zimmermann & Fordham, 1985). Por meio dela, alguns protocolos regenerativos foram estabelecidos para vários porta-enxertos de macieira (Bolar *et al.*, 1998; Harbage *et al.*, 1998; Camargo *et al.*, 1999; Abreu & Pedrotti, 2003).

Desta forma, células, tecidos ou órgãos com intensidade variada de determinação, podem adquirir novas competências através da ação de determinados sinais químicos que podem ser reguladores de crescimento, pois estes ativam seletivamente determinados genes (epigênese). A resposta final é a expressão morfogênética em dois níveis básicos. Sequências organogênicas em sistemas experimentais *in vitro* podem ocorrer através de modelos diretos ou indiretos (Guerra, 2006).

Portanto, o processo morfogênético é resultante da divisão e diferenciação celular organizada, que depende, basicamente, da atividade e expressão de determinados genes. Segundo Ramalho & Santos (1990), a cultura de tecidos tem contribuído significativamente para o estudo da morfogênese. Entretanto, a principal dificuldade é identificar qual o meio de cultura mais adequado para que ocorra a divisão e a diferenciação celular, seguida da obtenção de plantas idênticas aquela de onde a célula ou o conjunto de células foi retirado.

O processo de diferenciação celular reflete, em última análise, o efeito de pelo menos três fatores. O primeiro é o fator genético, que incorpora o estoque de potencialidades que pode ser expresso durante o desenvolvimento; o segundo fator está representado pelas características originadas durante a ontogênese; e, por último, existem as características cuja expressão depende apenas do ambiente (Kerbaudy, 1999).

Atualmente, sabe-se que as células cultivadas *in vitro* podem manifestar sua totipotência, seguindo duas rotas alternativas: a) organogênese, que conduz a diferenciação celular e a formação de meristemas caulinares e/ou radiculares, originando caules ou raízes, respectivamente; b) embriogênese somática, que conduz à formação de embriões somáticos, seguindo as fases do embrião zigótico, embora, obviamente, sem fecundação (Segura, 1993).

Uma das respostas mais comuns de tecido cultivado *in vitro* é a formação de calo, que depende dos seguintes estádios: desdiferenciação, competência, indução, determinação e diferenciação em um órgão (Kerbaudy, 1999). Entretanto, em certos casos, a cultura *in vitro* não promove a formação de calos, mas apenas uma proliferação celular restrita às regiões seccionadas, epidérmicas e subepidérmicas dos explantes, com formação de tecido de cicatrização e zonas de intensa atividade meristemática (Floh & Handro, 1985).

Segundo Kuneida & Kerbaudy (1986), a partir da zona meristemática ou do calo o padrão de diferenciação pode conduzir a um grau de organização morfo-anatômico peculiar, refletindo na formação de um órgão, constituindo-se no processo denominado organogênese. Quando a formação do órgão é decorrente de tecido do explante, ou de proliferação do mesmo, denomina-se organogênese direta. Quando ocorre a partir de células do calo, denomina-se organogênese indireta.

A embriogênese somática é um caso particular de morfogênese, na qual a partir de tecidos do explante ou do calo, organizam-se estruturas semelhantes aos embriões zigóticos, denominando-se embriogênese direta ou indireta, respectivamente (Floh & Handro, 1985).

Entretanto, apesar do conhecimento atual da morfogênese *in vitro*, diversos trabalhos com cultura de tecidos citam as regenerações de plantas por organogênese ou embriogênese, sem contudo, realizarem uma análise criteriosa, como a histológica, para a constatação de tal evento. Para Kerbaudy (1999), antes de qualquer análise das respostas dos tecidos cultivados *in vitro*, deve-se considerar algumas peculiaridades relativas à sua natureza: os explantes podem apresentar diferentes tipos de células e graus de diferenciação ou serem histologicamente mais homogêneos. Essas peculiaridades podem ser responsáveis por diferentes respostas morfogenéticas, quando o explante é colocado em cultura *in vitro*.

#### **2.4. Organogênese *in vitro* e melhoramento genético**

O processo de organogênese *in vitro* é complexo, com atuação de múltiplos fatores externos e internos envolvendo interação entre fonte de

explante, meio de cultura e fatores do ambiente (George, 1993). O processo de organogênese depende, também, da ação de reguladores de crescimento exógenos, em particular auxinas e citocininas, e da habilidade das células em responder a essas mudanças hormonais durante o período de cultivo.

As culturas de espécies frutíferas têm sido bastante estudadas no referente ao desenvolvimento de protocolos de cultura de tecidos.

Em geral, as espécies frutíferas são perenes, de longo ciclo vegetativo, de porte relativamente grande e com alto nível de heterozigosidade, o que dificulta e aumenta o tempo necessário para um programa de melhoramento genético através da hibridização, com as quais os programas podem durar anos até que se produza uma cultivar geneticamente estável (Caboni *et al.*, 2000). A transformação genética proporciona a introdução de gene correspondente a alguma característica benéfica dentro do genoma de uma cultivar comercial estabelecida, proporcionando, desta forma, a aceleração do processo de melhoramento (Schuch & Petters, 2002).

Para a aplicação das técnicas de transformação de plantas, é necessário que as células ou os tecidos transformados sejam regenerados em plantas que expressem o gene introduzido (Rao *et al.*, 1996). A maior dificuldade para a obtenção de plantas transgênicas é o estabelecimento prévio de um sistema de regeneração eficiente (Brasileiro & Dusi, 1999).

Desta forma, a eficiência do sistema de cultura de tecidos *in vitro* é indispensável quando se quer fazer melhoramento de plantas pela transformação genética. A eficiência na cultura dos tecidos depende do controle da morfogênese, a qual é influenciada por vários fatores como espécie, cultivar, tipo de explante, componentes nutricionais do meio, reguladores de crescimento e ambiente de cultura (Rao *et al.*, 1996).

Atenção tem sido dada ao tipo, à concentração e ao período de tempo em que os reguladores de crescimento são mantidos na cultura (Ammirato, 1989). Segundo Leblay *et al.* (1991), o processo de regeneração pode ser subdividido em duas fases, indução e expressão, tornando-se importante conhecer a duração destas duas fases e as suas exigências em reguladores de crescimento.

Na regeneração de plantas lenhosas, geralmente os explantes mais utilizados são folhas e entrenós, como mostram os trabalhos de Semeria *et al.*

(1996) e Pellegrineschi & Mariani (1996). Estes precisam ser seccionados, para que haja uma proliferação celular com formação de tecidos de cicatrização e zonas de intensa atividade meristemática (Yao *et al.*, 1995)

Uma outra possibilidade é a utilização direta de tecidos meristemáticos, especialmente ápices caulinares e radiculares (Kunieda & Kerbauy, 1986), nos quais ocorre grande homogeneidade e as células estão sempre num processo ativo de divisão, o que facilita a indução dos processos organogênicos (Handro & Floh, 1990).

Em macieira, a utilização da transformação genética é limitada pela dificuldade de regeneração de seus explantes e pela baixa eficiência na transformação, porém o sistema mais indicado para a regeneração das células transformadas é através da organogênese direta.

## **2.5. Organogênese direta *in vitro***

A organogênese *in vitro* tem sido descrita para diversas espécies. A necessidade de maximizar o número de plantas regeneradas com a manutenção da fidelidade genética contribuiu para uma ampla diversificação das condições de cultura *in vitro*. Assim, diferentes tipos de explantes, meios de cultura e condições ambientais são reportados.

A regeneração de plantas, através de organogênese *in vitro*, tem sido descrita a partir de diferentes explantes, tais como: segmentos de raízes (Bhat *et al.*, 1992; Carvalho & Biasi, 2004), segmentos de folhas (Martins *et al.*, 2001; Schuch & Peters, 2002; Alves *et al.*, 2004; Erig & Schuch, 2005), segmento internodal (Camargo *et al.*, 1999; Morales *et al.*, 1999), segmentos de embrião somático (Cristofani, 1991) e segmentos de epicótilo (Ghorbel *et al.*, 1998; Bordón *et al.*, 2000). Todavia, a proporção de explantes responsivos tem sido, muito baixa e o processo morfogenético tem sido completamente caracterizado em poucos trabalhos.

Camargo *et al.* (1999), trabalhando com porta-enxerto de macieira, cv. Marubakaido, relatam que a regeneração de plantas a partir de células somáticas pode ser uma boa alternativa na indução de variações somaclonais e na manipulação genética. Estes autores testaram internódios: seccionado e não seccionado, diferentes níveis de luz (0; 1; 2; 3 e 4 semanas) em meio de

cultura MS, acrescido de BAP ( $5,0\text{mg.L}^{-1}$ ) e 2,4-D ( $0,1\text{mg.L}^{-1}$ ). Os resultados demonstraram que o período de ausência de luz não influencia na percentagem e intensidade de formação de calos e que o internódio não seccionado é a melhor fonte de explante para a calogênese.

A organogênese de macieira (*Malus* sp.) do porta-enxerto M7, foi também estudada por Martins *et al.* (2001). Estes autores utilizaram folhas como explante, com ou sem escarificação, com a superfície abaxial e adaxial em contato com o meio de cultura MS associados a  $5\mu\text{M}$  de Benzilaminopurina (BAP) e Forchlorfenuron (CPPU), além de  $0,5\mu\text{M}$  de Ácido Naftalenoacético (ANA). Os explantes permaneceram por três semanas no escuro, o que propiciou 100% de formação de calos, posteriormente foram submetidas a um fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de  $20\ \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Os resultados demonstraram que os explantes escarificados e com a superfície abaxial em contato com o meio proporcionaram maior intensidade de calo, independentemente do meio conter BAP ou CPPU. Além disso, o uso da escarificação, associada ao CPPU, promoveu uma maior proliferação de calo, independentemente da superfície do disco foliar.

Schuch & Peters (2002) desenvolveram um protocolo de regeneração de brotações em explantes de macieira (*Malus domestica*, Borkh.) cv. Gala. Para a regeneração das brotações, os autores utilizaram diferentes fontes de explante (folhas escarificadas, segmento foliar e entrenós), nas quais foram cultivadas em meio de cultura MS com suplementação das citocininas BAP e TDZ nas concentrações de 0; 3,0; 4,0 e  $5,0\ \text{mg.L}^{-1}$ . Os autores concluíram que folhas escarificadas e segmentos foliares apresentaram melhor potencial regenerativo em relação aos entrenós. As concentrações de 4,0 a  $5,0\ \text{mg.L}^{-1}$  de BAP induziram maior regeneração de brotações e as altas concentrações de TDZ (4,0 e  $5,0\ \text{mg.L}^{-1}$ ) induziram a vitrificação.

O pré-requisito para se obter sucesso na transformação genética, e também para a multiplicação rápida do genótipo modificado, é ter um protocolo de regeneração eficiente (Erig & Schuch, 2005). Assim estes autores, avaliaram as cultivares de macieira Galaxy, Maxigala e Mastergala, a partir de dois tipos de explantes (folhas seccionadas transversal e longitudinalmente), e seis concentrações de thidiazuron (TDZ) (0; 4,54; 9,08; 13,62; 18,16 e  $22,7\ \mu\text{M}$ ) em meio MS adicionado de  $1,6\ \mu\text{M}$  ácido naftalenoacético (ANA). Os resultados

monstraram que o potencial morfogenético de folhas seccionadas no sentido transversal é superior ao longitudinal. O meio de cultura contendo 4,54  $\mu\text{M}$  de TDZ, propiciou, simultaneamente, elevada porcentagem de regeneração, maior número de brotos e menor intensidade de calo.

Estudos sobre a regeneração de brotações *in vitro* a partir de explantes de pereira (*Pyrus communis* L.) cultivar Carrick, visando programas de transformação genética, foi realizado por Erig & Schuch (2003). Para tanto, estes autores utilizaram três tipos de explantes (ápice caulinar, folha e entrenó) que permaneceram 0, 10, 20, 30 e 40 dias em meio de indução, posteriormente, foram transferidos para meio de proliferação com 8,9 ou 13,3 $\mu\text{M}$  de thidiazuron (TDZ). Os autores observaram que o explante ápice caulinar apresentou maior regeneração de brotações, quando comparado ao entrenó, enquanto a folha não mostrou capacidade de regenerar brotações. Os autores relatam que o estágio fisiológico da folha pode ser um fator determinante para a regeneração dos brotos.

## **2.6. Análise histológica em espécies cultivadas *in vitro***

Com relação à organogênese *in vitro*, a mesma tem sido caracterizada em diversos trabalhos por meio de análise histológica. A organogênese da parte aérea *in vitro* também pode ser unicelular ou multicelular. Embora existam mais relatos sobre a origem multicelular, a formação de gemas adventícias a partir de células corticais únicas vem sendo descritas em algumas espécies (Creemers-Molenaar *et al.*, 1994; Arai *et al.*, 1997). A organogênese *in vitro* pode ocorrer diretamente a partir do explante original ou, indiretamente, via formação de calos (Hicks, 1980). Portanto, as duas vias de regeneração *in vitro* podem ser identificadas apenas através das diferenças morfológicas entre as gemas apicais e os embriões somáticos. Enquanto a gema é uma estrutura monopolar que desenvolve ampla conexão vascular com o tecido do explante, os embriões somáticos são estruturas bipolares e não conectadas ao explante através da vascularização (Haccius, 1978).

Detrez *et al.* (1988) estudaram anatomicamente a organogênese *in vitro* de *Beta vulgaris* L. e confirmaram a formação de gemas adventícias diretamente de explantes peciolares. Mohamed *et al.* (1992) também

caracterizaram a organogênese *in vitro* de *Phaseolus vulgaris* L. e *Vicia faba* L., a partir de nós cotiledonares e nós primários de plântulas com 14 dias, respectivamente. Estes autores constataram que as gemas adventícias formaram-se diretamente dos explantes, sem prévia formação de calos, e originaram-se de meristemóides formados em células subepidérmicas. Pereira *et al.* (2000) também confirmaram que a organogênese *in vitro* de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. ocorreu com a formação de gemas caulinares adventícias diretamente dos explantes foliares.

Mondal *et al.* (1994) identificaram, por estudos histológicos, que a formação de gemas adventícias em segmentos de raízes de *Carica papaya* L., ocorreu a partir da diferenciação de células na periferia do calo. Roussy *et al.* (1996), também estudando histologicamente a organogênese em explantes foliares de *Beta vulgaris* L., constataram a formação indireta de gemas caulinares em áreas meristemáticas situadas na superfície do calo. Kelkar *et al.* (1996) também verificaram que, em explantes foliares de *Piper colubrinum* Link, a formação das gemas adventícias iniciou-se em agregados meristemáticos espalhados no calo, que formados por células pequenas, com citoplasma denso e núcleos evidentes.

Em estudos histológicos da organogênese *in vitro* de três espécies de leguminosas, Apezato-da-Glória (1998) constatou em nós cotiledonares, sem gemas axilares, de *Glycine max* (L.) Merrill que a organogênese foi direta e a formação das gemas adventícias ocorreu em meristemóides de origem epidérmica e subepidérmica, situados nas porções inter e intracotiledonares. Em segmentos de hipocótilo e explantes cotiledonares de *Bauhinia forficata* Link e *Stylosantes guianensis* Aubl., respectivamente, verificou que a organogênese ocorreu indiretamente, nas quais os meristemóides foram constituídos de células pequenas com citoplasma denso, núcleo evidente e espalhados na superfície do calo.

Estudo anatômico da organogênese *in vitro* de *Passiflora edulis* Sims f. flavicarpa Deg. foi realizado por Apezato-da-Glória *et al.* (1999). Estes autores, utilizaram discos de folha como explante e estudaram o efeito da luminosidade nas condições de cultura e do BAP adicionado ao meio de cultura MS. Verificaram que a cultura diretamente na luz e na presença de BAP foi fundamental para a formação de gemas adventícias. Estas formaram-se a

partir de meristemóides originados de divisões celulares na camada subepidérmica, caracterizando uma organogênese direta.

Monteiro-Hara (2000) também estudou a cultura *in vitro* de três espécies do gênero *Passiflora*, a partir de segmentos cotiledonares e discos de folhas. Constatou, através de análise histológica, a formação de gemas adventícias e embriões somáticos no mesmo explante, quando tratados com BAP ou TDZ, para *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* e *P. alata* Ait. Entretanto, em ambas as espécies, não houve conversão dos embriões em plantas. A formação das gemas ocorreu a partir de proliferação de calos nas bordas dos explantes ou diretamente a partir do explante em ambas as espécies, sendo que as gemas de *P. alata* não cresceram devido à ausência de meristema apical. Em *P. suberosa* L. a organogênese foi apenas indireta, formando-se a partir do calo e com baixo número de plantas obtidas.

Análise histológica para a caracterização da morfogênese em segmentos de epicótilo de citrange 'Troyer' foi realizada por Garcia-Luiz *et al.* (1999). Estes autores constataram que em função da orientação do explante no meio de cultura, a resposta morfogenética pode seguir percursos distintos. Assim, quando o explante foi introduzido verticalmente no meio, seguindo a polaridade do segmento, a formação de gemas na extremidade apical ocorria por organogênese direta a partir de zonas meristemáticas oriundas da divisão periclinal de células do câmbio vascular. Já na extremidade basal, em contato com o meio de cultura, a origem das gemas ocorria em zonas meristemáticas formadas na superfície do calo, que se originou por sucessivas divisões de células cambiais, caracterizando uma organogênese indireta. Quando segmentos de epicótilo foram cultivados horizontalmente no meio de cultura, verificaram maior número de gemas formadas em ambas as extremidades e a origem das mesmas ocorreu em zonas meristemáticas distribuídas na superfície do calo, o qual originou-se a partir do câmbio vascular, caracterizando uma organogênese indireta.

Diante do exposto, fica evidente que os estudos histológicos são importantes não apenas para a confirmação da via de regeneração *in vitro*, mas também para a determinação dos tipos celulares a partir dos quais surgem os embriões somáticos ou gemas caulinares. Estas informações são de grande interesse, especialmente em sistemas de transferência de genes.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Desenvolver protocolos de regeneração *in vitro* para macieira (*Malus domestica* Borkh) cv. Galaxy, via organogênese direta, para estudos de propagação *in vitro* e melhoramento genético.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Definir um método eficiente de assepsia para os explantes no estabelecimento *in vitro* para macieira cv. “Galaxy”;
- Estabelecer as melhores combinações de reguladores de crescimento na composição do meio de cultura para os processos de multiplicação dos explantes *in vitro*;
- Definir os explantes para a regeneração *in vitro* e desenvolvimento de brotações múltiplas da macieira cv. “Galaxy”, através de organogênese direta;
- Estabelecer as melhores combinações de reguladores de crescimento na composição do meio de cultura para a regeneração da macieira cv. “Galaxy”, através de organogênese direta.
- Caracterizar histologicamente a regeneração via organogênese para a macieira cv. “Galaxy”.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material Vegetal

O material vegetal utilizado foram plantas matrizes de macieira (*Malus domestica* Borkh) cultivar Galaxy, mantidas com ferti-irrigação e controle sanitário em casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias, UFSC.

### 4.2. Estabelecimento *in vitro*

Das plantas matrizes foram coletados ramos em crescimento ativo e seccionados em segmentos nodais, com aproximadamente 2,0 cm de comprimento, contendo 1 gema lateral, os quais foram submetidos ao seguinte processo de desinfestação: lavagem em água e detergente (2 gotas.L<sup>-1</sup>-Tween 20), durante 10 minutos. Posteriormente, foram imersos, sob agitação, de acordo com os seguintes tratamentos: em hipoclorito de sódio (2,5%), por 10, 15 e 20 minutos e 1 minuto em etanol (70%). Em seguida, foram realizadas três lavagens em água destilada/deionizada/esterilizada em câmara de fluxo laminar.

Os segmentos nodais foram inoculados em tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 2,22 µM de BAP (6-benzilaminopurina) e 2,7 µM de ANA (Ácido naftaleno-acético), com a adição 3g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado.

As culturas foram mantidas na ausência de luz em sala de crescimento, a 25 ± 2°C por um período de quatro dias, visando diminuir a oxidação fenólica. Após este período foram mantidas em sala de crescimento com 16 horas de fotoperíodo, temperatura de 25 ± 2°C e densidade de fluxo de fótons de 42µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. A avaliação foi realizada após 15 dias de cultura *in vitro*, onde foram analisados o percentual de contaminação, de oxidação e do tipo de contaminação.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, contendo 4 repetições, representada por 5 tubos de ensaio com 1 explante cada.

### 4.3. Multiplicação *in vitro*

Para esta etapa, foram testados cinco tratamentos com uso do BAP (0,0; 4,44; 8,88; 13,31; 17,75)  $\mu\text{M}$  em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962). Os explantes constaram de segmentos nodais com aproximadamente 2 cm de altura, provindos do material vegetal da primeira etapa. Foram introduzidos em frascos de vidro de 300 mL, contendo 40 mL de meio de cultura.

A avaliação foi realizada após 45 dias de cultura *in vitro* e foram analisados: número médio de brotos por explante, altura média das brotações (mm) e número médio de brotos maiores que 20mm por explante.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, contendo 3 repetições, representada por 5 frascos com 3 explantes cada, perfazendo 45 explantes por tratamento.

### 4.4. Organogênese *in vitro*

O material vegetal constou de folhas jovens provenientes das brotações obtidas da etapa anterior. Testou-se o TDZ e o ANA suplementados ao meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962). Foram realizados 3 experimentos.

#### 4.4.1. Experimento 01

Os tratamentos testados compreenderam combinações entre os dois reguladores de crescimento nas seguintes concentrações: TDZ (0,0; 4,54; 9,1 e 18,16  $\mu\text{M}$ ) e ANA (0,54  $\mu\text{M}$ ). As folhas inteiras foram seccionadas transversalmente, onde os explantes foram divididos em dois tipos: 1) a parte da folha em que se encontrava o ápice, denominou-se explante apical, e 2) a parte em que se encontrava a base foliar, denominou-se explante basal (**Anexo 01**), conforme descrito na **Tabela 01**. Os dois tipos de explantes foram introduzidos com a face abaxial em contato com o meio de cultura, em frascos de vidro de 300 mL, contendo 40 mL de meio de cultura.

**Tabela 01.** Tratamentos aplicados no primeiro experimento para regeneração dos explantes de macieira, cultivar Galaxy.

Tratamentos	Tipo de Explante Foliar	Reguladores de Crescimento	
		TDZ ( $\mu\text{Mol}$ )	ANA ( $\mu\text{Mol}$ )
1	Apical	0	0,54
2	Basal	0	0,54
3	Apical	4,54	0,54
4	Basal	4,54	0,54
5	Apical	9,1	0,54
6	Basal	9,1	0,54
7	Apical	18,16	0,54
8	Basal	18,16	0,54

Os frascos com os explantes permaneceram uma semana em sala de crescimento, com temperatura de  $25\pm 2^\circ\text{C}$  e ausência completa de luz. Posteriormente, foram transferidos para fotoperíodo de 16 horas e intensidade de fluxo de fótons de  $42 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Os explantes foram avaliados aos 30 e 60 dias após a inoculação em relação ao percentual de regeneração, número de brotações por explante e proliferação celular.

As brotações formadas após o período de 60 dias foram repicadas e inoculadas em meio de multiplicação MS, suplementado com  $2,22\mu\text{M}$  de BAP.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, contendo 3 repetições, com 3 explantes cada, perfazendo 9 explantes por tratamento.

#### 4.4.2. Experimento 02

Neste experimento foram testados 4 tratamentos que compreenderam combinações entre os mesmos reguladores de crescimento do primeiro experimento, TDZ e ANA. Neste experimento as folhas permaneceram inteiras na cultura *in vitro*, onde foram feitas escarificações transversais na nervura mediana (**Anexo 01**). Os explantes foram introduzidos com a face abaxial em contato com o meio de cultura, em frascos de vidro de 300 mL, contendo 40 mL de meio de cultura MS. Os tratamentos aplicados neste experimento encontram-se descritos em seguida na **Tabela 02**.

**Tabela 02.** Tratamentos aplicados no segundo experimento para regeneração dos explantes de macieira, cultivar Galaxy.

Tratamentos	Tipo de Explante	Reguladores de Crescimento	
		TDZ ( $\mu\text{Mol}$ )	ANA ( $\mu\text{Mol}$ )
1	Folha Inteira	4,54	0,54
2	Folha Inteira	9,1	0,54
3	Folha Inteira	13,62	0,54
4	Folha Inteira	18,16	0,54

Os frascos com os explantes permaneceram em sala de crescimento, com temperatura de  $25\pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e intensidade de fluxo de fótons de  $42 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Os explantes foram avaliados aos 10, 24, 38, 45 e 60 dias após a inoculação, onde analisou-se a percentagem de oxidação e contaminação, percentagem de regeneração e proliferação celular.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, contendo 3 repetições, com 6 explantes cada, perfazendo 18 explantes por tratamento.

#### 4.4.3. Experimento 03

Neste experimento utilizaram-se discos foliares com 60 mm provenientes de folhas jovens da etapa 4.3 (**Anexo 01**). Os explantes foram introduzidos com a face abaxial em contato com o meio de cultura, em frascos de vidro de 300 mL, contendo 40 mL de meio de cultura. Para este experimento foram utilizados 4 tratamentos, onde também foram utilizados os reguladores de crescimento, TDZ e ANA, conforme a **Tabela 03**.

**Tabela 03.** Tratamentos aplicados no terceiro experimento para regeneração dos explantes de macieira, cultivar Galaxy.

Tratamentos	Tipo de Explante	Reguladores de Crescimento	
		TDZ ( $\mu\text{Mol}$ )	ANA ( $\mu\text{Mol}$ )
1	Disco foliar	4,54	0,54
2	Disco foliar	9,1	0,54
3	Disco foliar	13,62	0,54
4	Disco foliar	18,16	0,54

Os frascos com os explantes permaneceram uma semana em sala de crescimento, com temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  e ausência completa de luz. Posteriormente, foram transferidos para fotoperíodo de 16 horas e intensidade de fluxo de fótons do período de  $42\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Os explantes foram avaliados aos 30 dias em relação a percentagem de oxidação, percentagem de regeneração e proliferação da massa celular. Para a variável proliferação celular utilizou-se uma escala de 1 a 4, onde 1=ausência de proliferação celular, 2=pouca proliferação celular, 3=média proliferação celular e 4=muita proliferação celular. Estes foram avaliados também aos 90 dias após a inoculação, onde sendo analisados a percentagem de regeneração, o número médio de brotos por explante regenerado e a altura média dos brotos por explante.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, contendo 3 repetições, com 20 explantes cada, perfazendo 60 explantes por tratamento.

#### **4.5. Condições de cultura *in vitro***

Para as diferentes etapas da cultura *in vitro*, o pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 e todos os componentes do meio foram adicionados antes da autoclavagem à  $121^{\circ}\text{C}$ , durante 15 minutos.

#### **4.6. Análise histológica**

Gemas adventícias e proliferação celular obtidas na cultura *in vitro*, através dos meios de cultura de indução à organogênese das etapas 4.4., foram analisadas mediante a uma coleta de amostras em vários estádios de desenvolvimento, aos 30 dias após a inoculação.

O material foi fixado através da imersão, por 2 horas, em solução de glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 7,2. Em seguida, o material foi lavado, por 3 vezes, na mesma solução tampão. A desidratação foi realizada em série alcoólica-etílica gradual até  $70^{\circ}\text{GL}$ , em série de 30 minutos para cada concentração, conforme metodologia proposta por Ruzin (1999).

Para a montagem dos blocos de hidroxietilmetacrilato (*Jung's Historesin* – marca Leica), das amostras, o material fixado e conservado em etanol  $70^{\circ}\text{GL}$  foi desidratado lentamente em etanol 80, 90 e  $96^{\circ}\text{GL}$  em série de 30 minutos, mantido por pelo menos 12 horas em solução de pré-infiltração e 3

horas em solução de infiltração, para posteriormente serem montados blocos utilizando a solução endurecedora, conforme instruções do fabricante (*Jung's Histo-resin* – marca Leica). Os blocos, contendo o material, foram seccionados com 8  $\mu\text{m}$  de espessura, em micrótomo de rotação Leica — RM 2125 RT. As secções foram distendidas sobre lâminas contendo água, em chapa aquecedora (40°C). Após a secagem das lâminas, o material foi corado com azul de toluidina 0,25% aquoso (Ruzin, 1999) e analisado em microscópio óptico, marca Zeiss-Jena, modelo Loboal 4 e as fotomicrografias foram obtidas em microscópio óptico Leica MPS 30 DMLS, no Laboratório de Anatomia Vegetal da UFSC.

#### **4.7. Análises estatísticas**

Os dados referentes às fases de estabelecimento, multiplicação e organogênese *in vitro* da macieira foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e ao teste de separação de médias Tukey (nível de 5%), conforme recomendações de Sokal & Rohlf (1995).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Estabelecimento *in vitro*

Em relação aos tratamentos de assepsia empregados, observaram-se respostas diferenciadas para os explantes, variando conforme o tempo de imersão destes nas soluções assépticas de hipoclorito de sódio (2,5%) e etanol (70%). Os resultados são apresentados nas **Figuras 01 e 02**.

Após 15 dias de cultivo *in vitro*, verificamos que o percentual de contaminação no Tratamento 1 apresentou valores percentuais superiores aos demais tratamentos, com 40% dos explantes contaminados, em relação ao Tratamento 2, que apresentou 30%. O Tratamento 3 apresentou somente 5% de contaminação dos explantes (**Figura 01**).

O principal agente contaminante observado aos 15 dias de cultura *in vitro* foi bactérias, apresentando um percentual de 40% de contaminação no Tratamento 1. Este mesmo tratamento apresentou somente 5% de contaminação por fungos (**Figura 02**). O tratamento 2 apresentou 20 e 30% dos explantes contaminados por bactéria e fungos, respectivamente. O tratamento 3 não apresentou contaminação por bactérias, porém 5% dos explantes foram contaminados por fungos (**Figura 02**). Estes resultados conferem com os de Abreu & Pedrotti (2003) cujos autores observaram para o porta-enxerto de macieira 'M-9' um percentual de contaminação com fungos e bactérias acima de 30%. No entanto, Erig & Schuch (2003) trabalhando com as cultivares de maçã Galaxy, Maxigala e Mastergala, observaram que a contaminação fúngica foi praticamente nula, com média de 1,4% de contaminação, porém a contaminação bacteriana para a cv. Galaxy foi elevada, atingindo 56%.

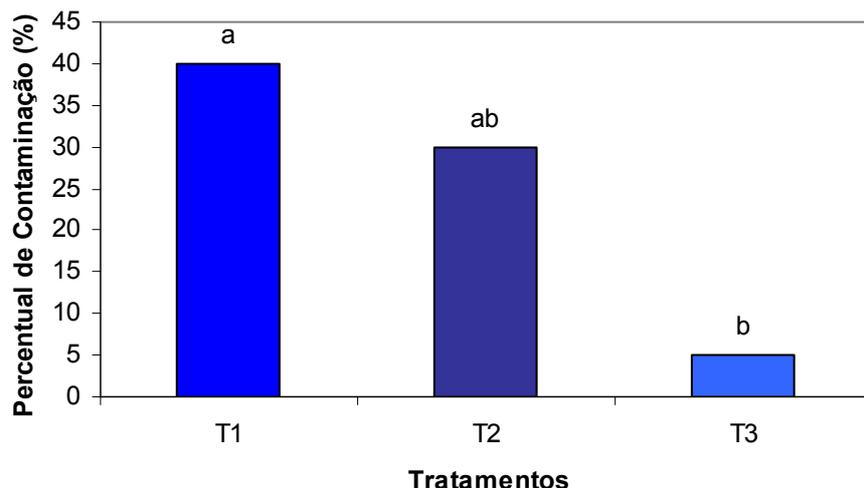
Com relação a oxidação dos explantes, definido como o principal problema para o estabelecimento *in vitro* de macieira, os resultados observados foram de 5% de explantes oxidados para o tratamento 1, de 10% para o tratamento 2, e para o tratamento 3 o percentual de oxidação foi de 15%, no 15º dia de cultivo *in vitro* (**Figura 02**).

Os resultados de oxidação verificados neste trabalho são considerados baixos, visto que Erig & Schuch (2003), observaram altos percentuais de

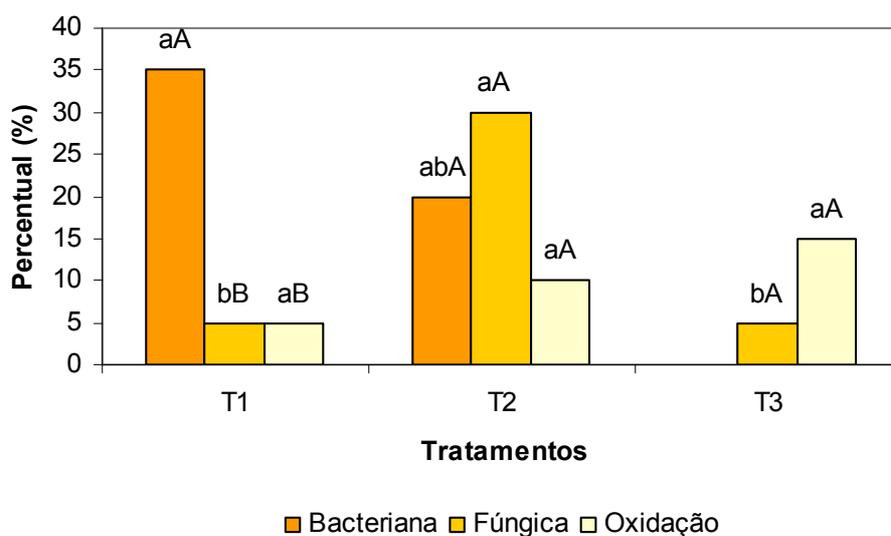
oxidação nos experimentos realizados, com valores de 98% de oxidação aos 15 dias de cultura *in vitro*. Abreu & Pedrotti (2003) obtiveram um percentual de 50% de oxidação nas gemas axilares introduzidas *in vitro*. Modgil *et al.* (1999) também verificaram altas taxas de oxidação (34,25%) no estabelecimento *in vitro* de macieira cv. Tydeman's Early Worcester utilizando ápices caulinares e segmentos nodais como explantes.

A oxidação dos explantes ocorre através da liberação de compostos fenólicos, a qual é indicada através do escurecimento das superfícies seccionadas dos explantes e pela modificação da coloração, ou seja o escurecimento do meio de cultura. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), a oxidação é um sério problema no isolamento de explantes de espécies lenhosas, cujos tecidos são mais ricos em compostos fenólicos, que são os precursores da síntese de lignina.

Para a redução da oxidação fenólica nos explantes, Erig & Schuch (2003) recomendam a lavagem em água corrente durante 10 minutos. Porém, estes autores alertam que apesar de reduzir a oxidação, esta lavagem aumenta a taxa de contaminação bacteriana nos mesmos. Este procedimento foi adotado neste trabalho e ocorreu a confirmação do alto percentual de contaminação por bactérias no tratamento 1, no qual 40% dos explantes apresentaram contaminação bacteriana.



**Figura 01.** Percentuais de contaminação dos segmentos nodais de *Malus domestica* Borkh, “Galaxy” referentes aos tratamentos T1 (10’ em hipoclorito de sódio (2,5%) e 1’ em etanol (70%), T2 (15’ em hipoclorito de sódio (2,5%) e 1’ em etanol (70%) e T3 (20’ em hipoclorito de sódio (2,5%) e 1’ em etanol (70%) em meio de cultura MS suplementados com 2,22  $\mu$  M de BAP e 2,7  $\mu$  M de ANA, e 3g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, após 15 dias de cultura *in vitro* (N=20). Médias não seguidas pela mesma letra, diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.



**Figura 02.** Percentuais do tipo de contaminação dos segmentos nodais e de oxidação dos explantes de *Malus domestica* Borkh, referentes aos tratamentos T1 (10’ em hipoclorito de sódio (2,5%) e 1’ em etanol (70%), T2 (15’ em hipoclorito de sódio (2,5%) e 1’ em etanol (70%) e T3 (20’ em hipoclorito de sódio (2,5%) e 1’ em etanol (70%) em meio de cultura MS suplementados com 2,22  $\mu$  M de BAP e 2,7  $\mu$  M de ANA, e 3g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado após 15 dias de cultivo *in vitro* (N=20). Médias não seguidas pela mesma letra minúscula para tratamentos diferentes e maiúscula entre os mesmos tratamentos, diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

Para o estabelecimento *in vitro* de macieira “galaxy” verificou-se que os tratamentos de assepsia aplicados nos explantes, apresentaram uma eficiência reduzida, possibilitando baixas taxas de sobrevivência dos mesmos no meio de cultura. A adição de carvão ativado no meio de cultura foi eficiente no controle

da oxidação dos explantes, apresentando percentuais relativamente baixos de explantes oxidados.

## 5.2. Multiplicação *in vitro*

O material vegetal de multiplicação *in vitro* foi monitorado semanalmente. Aos 45 dias os explantes foram avaliados em relação ao número médio de brotações, altura média das brotações e número médio de brotações com altura igual ou maior a 20 mm. Os explantes submetidos ao tratamento T2 (4,44  $\mu\text{M}$  BAP) apresentaram valores superiores para quase todos os parâmetros avaliados. No entanto, para o número médio de brotações, apesar da superioridade aos demais tratamentos não apresentou diferença significativa com relação ao tratamento T4 (13,31  $\mu\text{M}$  BAP)

Os efeitos dos tratamentos sobre a taxa proliferativa média dos explantes e altura média dos brotos, após 45 dias, são apresentados nas **Figuras 03 e 04**.

Aos 45 dias o T2 (4,44  $\mu\text{M}$  BAP) induziu uma média de 5,68 brotos emitidos por explante, permitindo que as brotações atingisse altura média de 3,23 cm. Além disso, apresentou uma média de brotações, com igual altura ou superior a 20mm, superior aos demais tratamentos, com o valor de 4,82 brotações/explante (**Figura 05**).

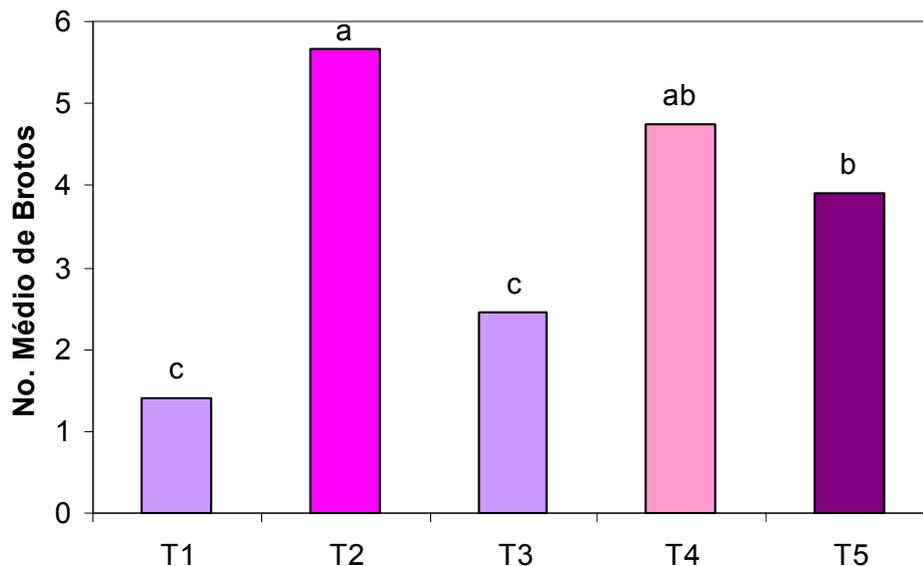
Os resultados obtidos conferem com os de Modgil *et al.* (1999), os quais obtiveram a maior taxa de multiplicação de brotações da cultivar Tydeman's Early Worcester adicionando ao meio de cultura 4,4  $\mu\text{M}$  de BAP e 5,0  $\mu\text{M}$  de KIN. Nunes *et al.* (1999), trabalhando com o porta-enxerto Marubakaido, utilizaram concentrações de BAP entre 1,11 e 4,4  $\mu\text{M}$ , porém os resultados obtidos por estes autores diferem dos resultados obtidos neste trabalho, os quais relatam que a adição de concentrações de 1,11 e 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP apresentaram valores superiores em relação ao número de brotações, possibilitando a formação de 3,93 e 4,73 brotos por explante, enquanto que a adição de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP resultou na formação de somente 1,73 novos brotos por explante.

Morales *et al.* (1999) utilizando a concentração de 5  $\mu\text{M}$  de BAP combinado com as auxinas ANA, AIA e AIB, obtiveram valores de 2,1 brotos nos internódios de macieira Gala RW1. Erig & Schuch (2002), trabalhando com o porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido (*Malus prunifolia* Willd, Borkh),

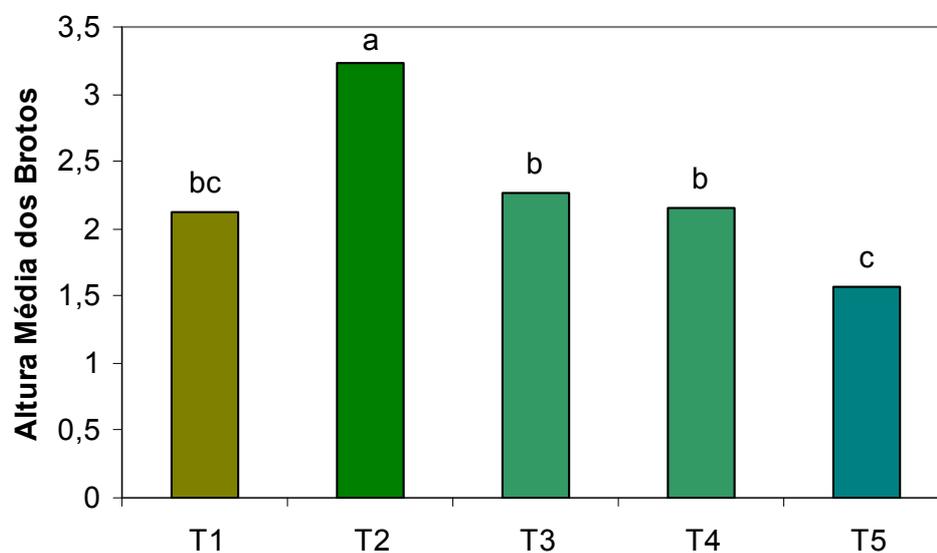
adicionaram ao meio de cultura MS a concentração de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP e obtiveram 3,78 brotações por explante.

Observou-se ainda que nas concentrações mais elevadas de BAP (13,31 e 17,75  $\mu\text{M}$ ) ocorreu o fenômeno de vitrificação das brotações. Provavelmente isso tenha ocorrido, devido a algum efeito fitotóxico da elevada concentração de BAP no meio de cultura. Para Nunes *et al.* (1999), os meios de cultura contendo MS + 2,22  $\mu\text{M}$  de BAP e MS + 1,11  $\mu\text{M}$  de BAP possibilitaram a produção de plantas com maior número de brotos não-vitrificados, evidenciando que as maiores concentrações de BAP podem ser um dos fatores envolvidos no descontrole do potencial de água nas células, aumentando a vitrificação das plantas.

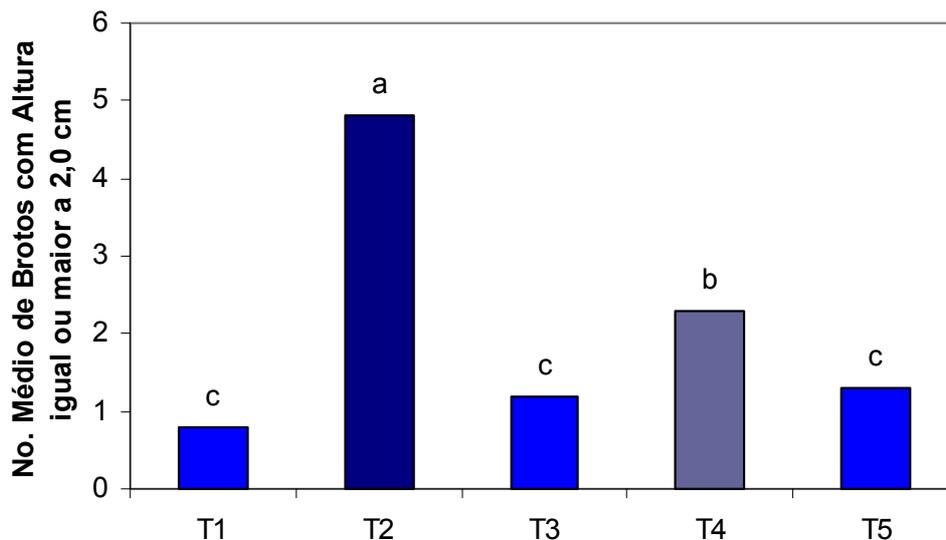
Os resultados referentes à altura das brotações corroboram com os obtidos por Abreu & Pedrotti (2003), os quais, trabalhando com *Malus platycarpa* e utilizando concentrações de BAP (0,00; 1,11; 2,22 e 4,44  $\mu\text{M}$ ) no meio de cultura MS, observaram valores que variaram entre 2,3 a 2,9 cm de altura, sendo que a concentração que foi capaz de formar o maior crescimento das brotações foi a de 4,44  $\mu\text{M}$  suplementado ao meio de cultura, conferindo com o resultado obtido neste trabalho, onde a adição de 4,44  $\mu\text{M}$  (T2) possibilitou uma média de 3,23 cm de altura. No entanto, Schartz *et al.* (2000), obtiveram menor altura das brotações do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido com a adição de 5,30  $\mu\text{M}$  de BAP, cujas brotações apresentaram média de 1,89 cm. Para Nunes *et al.* (1999), o meio contendo 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP também apresentou resultados inferiores em relação a altura das brotações de *Malus prunifolia*, possibilitando a produção de mudas com altura média inferior a 1 cm.



**Figura 03.** Número médio de brotos de *Malus domestica* Borkh. "Galaxy" emitidos por explante inicial referentes aos 45 dias de cultura *in vitro* em meio de cultura MS: T1(isento de fitorregulador); T2(MS + 4,44 $\mu$ Mol/L de BAP); T3(MS + 8,88 $\mu$ Mol/L de BAP); T4(MS + 13,31 $\mu$ Mol/L de BAP); T5(MS + 17,75 $\mu$ Mol/L de BAP) (N=45). Médias não seguidas pela mesma letra, diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.



**Figura 04.** Altura média dos brotos de *Malus domestica* Borkh. emitidos por explante inicial referentes aos 45 dias de cultura *in vitro* em meio de cultura MS: T1(isento de fitorregulador); T2(MS + 4,44 $\mu$ Mol/L de BAP); T3(MS + 8,88 $\mu$ Mol/L de BAP); T4(MS + 13,31 $\mu$ Mol/L de BAP); T5(MS + 17,75 $\mu$ Mol/L de BAP) (N=45). Médias não seguidas pela mesma letra, diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.



**Figura 05.** Número médio de brotos de *Malus domestica* Borkh. com altura igual ou maior a 2 cm, emitidos por explante inicial referentes aos 45 dias de cultura *in vitro* em meio de cultura MS: T1(isento de fitorregulador); T2(MS + 4,44 $\mu$ Mol/L de BAP); T3(MS + 8,88 $\mu$ Mol/L de BAP); T4(MS + 13,31 $\mu$ Mol/L de BAP); T5(MS + 17,75 $\mu$ Mol/L de BAP) (N=45). Médias não seguidas pela mesma letra, diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

As altas concentrações da BAP podem ter influenciado nos resultados, em relação ao menor número de brotações e altura dos mesmos. Nunes *et al.* (1999) relataram que altas concentrações de BAP podem diminuir as taxas de divisão celular, como ocorre nas células dos centros quiescentes dos ápices radiculares, e provocar um menor desempenho em todos os parâmetros estudados.

A respeito do processo de multiplicação *in vitro* da maceira cv. “Galaxy” pode-se concluir que a concentração de 4,44  $\mu$ M de BAP foi a mais efetiva para o número médio de brotações emitidas e o número médio de brotações com altura igual ou superior a 20 mm. A adição de elevadas doses da citocinina BAP no meio de cultura, pode afetar negativamente as brotações, proporcionando um menor crescimento e maior taxa de vitrificação das mesmas.

### 5.3. Organogênese direta *in vitro*

#### 5.3.1. Experimento 01: explantes “folhas seccionadas”

O material vegetal introduzido para obtenção de organogênese *in vitro* foi monitorado semanalmente. Observou-se que os tratamentos que regeneraram brotos não foram estatisticamente diferentes aos 30 dias de cultura *in vitro*, porém aos 60 dias ocorreu diferenças entre os tratamentos (**Figura 06**). Para todas as épocas de avaliação o tratamento contendo 9,1  $\mu\text{M}$  de TDZ e 0,54  $\mu\text{M}$  de ANA (T5), ao meio de cultura MS, foi superior emitindo proliferação celular a partir de 15 dias de cultura *in vitro*.

Após 30 dias de cultura *in vitro*, os explantes foram avaliados em relação ao percentual de regeneração e número de brotações por explante. Verificou-se que somente a combinação das concentrações de 9,1  $\mu\text{M}$  de TDZ e 0,54  $\mu\text{M}$  de ANA apresentou resultados positivos para os dois tipos de explantes utilizados. Nos demais tratamentos não foram observados a regeneração de brotos, observou-se somente proliferação celular, com maior tendência para os tratamentos T3, T4 e T8.

O percentual de regeneração aos 30 dias, foi verificado somente em dois tratamentos, no tratamento T5 (9,1 $\mu\text{M}$  de TDZ + 0,54 $\mu\text{M}$  de ANA - APICAL) com 50% dos explantes regenerados e no tratamento T6 (9,1 $\mu\text{M}$  de TDZ e 0,54 $\mu\text{M}$  de ANA – BASAL) com percentual de 40% de regeneração (**Figura 06**).

Aos 60 dias de cultivo *in vitro*, observou-se que os tratamentos T5 e T6 continuaram regenerando novas brotações, com 60% e 50% de regeneração de brotos, respectivamente. Estes tratamentos foram estatisticamente superiores ao tratamento T7 (18,16 $\mu\text{M}$  de TDZ e 0,54 $\mu\text{M}$  de ANA - APICAL), apresentou 10% de explantes regenerados (**Figura 06**).

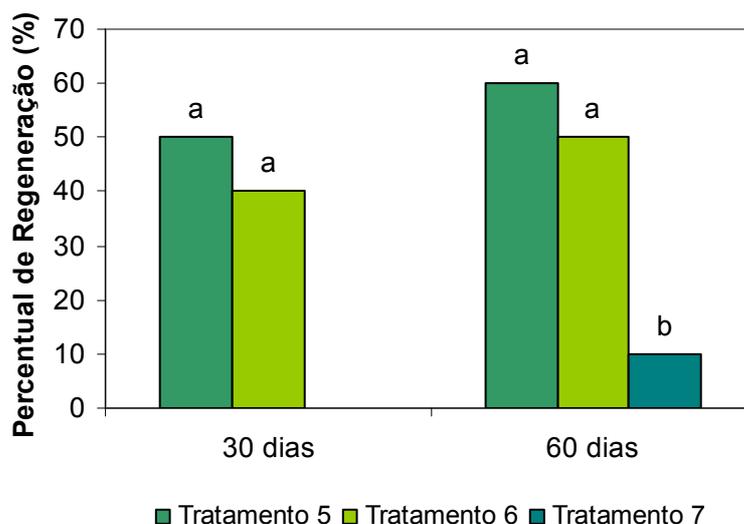
Em relação ao número médio de brotações emitidas, aos 30 dias de cultura *in vitro*, os tratamentos T5 e T6 apresentaram médias de 1,1 e 0,7 brotações por explante. Aos 60 dias de cultura *in vitro*, as médias aumentaram para 3,2 e 2,0 brotos por explante, respectivamente. Indicando que a permanência por tempo mais longo em meio de indução, é favorável ao

crescimento das brotações (**Tabela 04**). Observou-se que os locais na folha onde ocorreu um maior número de brotações regeneradas, foram àqueles pontos seccionados em áreas de nervura central da folha (**Figura 07**).

Estes resultados corroboram com os de Erig & Schuch (2005) que, trabalhando com macieira (*Malus domestica* Borkh.), seccionaram a folha transversalmente e longitudinalmente e observaram que os explantes oriundos de folhas seccionadas transversal, onde havia a presença de uma porção da nervura central da folha (tecido vascular) apresentou maior capacidade regenerativa. Estes autores obtiveram aos 45 dias de cultura *in vitro* uma percentual de regeneração de 81,66%.

Para folhas de macieira das cvs. McIntosh, Macspur e Wijeik cortadas em três segmentos: parte basal, mediana e apical, Sarwar & Skirvin (1997) verificaram que os segmentos diferiram em sua capacidade regenerativa, sendo que em todos os casos, a parte mediana apresentou maior regeneração, seguida pela parte basal, e por último, pela parte apical. Resultados contrários foram observados no presente trabalho onde o segmento apical também apresentou um maior percentual regenerado.

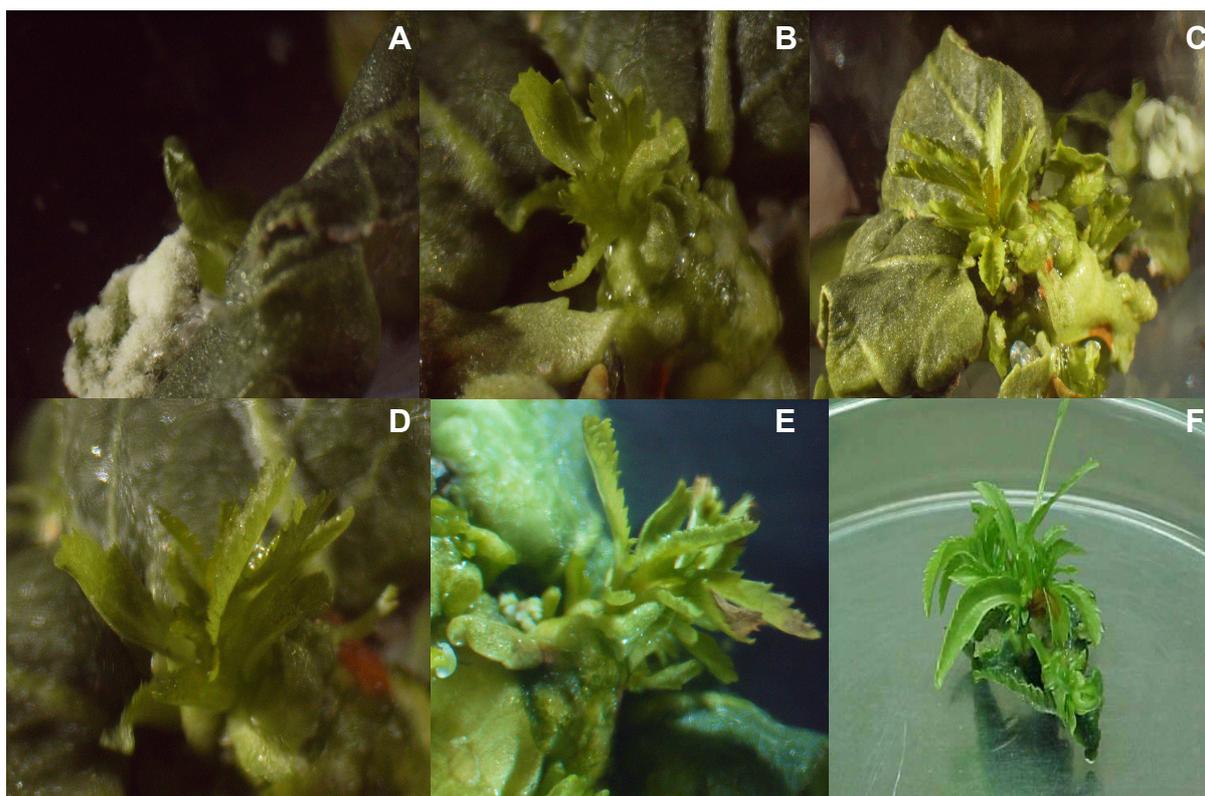
De acordo com Tange *et al.* (2002), quando um órgão completo da planta é seccionado em partes, os vários segmentos diferem na sua capacidade morfogenética. Segundo estes autores, a capacidade regenerativa aumenta substancialmente da secção distal para a secção proximal da folha, e isto poderia relacionar-se à presença de um gradiente de fitorreguladores endógenos ou à interação e balanço entre os fitorreguladores endógenos e os reguladores de crescimento exógenos, o que poderia ser responsável pela diferente regeneração dos distintos segmentos da folha.



**Figura 06.** Percentuais de regeneração dos explantes de *Malus domestica* Borkh. aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*, referentes aos tratamentos 5 (9,1µM de TDZ + 0,54µM de ANA - APICAL), tratamento 6 (9,1µM de TDZ + 0,54µM de ANA - BASAL) e tratamento 7 (18,16µM de TDZ + 0,54µM de ANA - APICAL) (N=10). Médias não seguidas pela mesma letra, diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

**Tabela 04.** Número médio de regeneração de brotos obtidos em explantes foliares de macieira *Malus domestica* Borkh. Cv. "Galaxy", aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em relação as diferentes concentrações de TDZ testadas.

Tipo de Explante Foliar	Média de Brotações			
	TDZ (µM) + ANA (µM)			
	0 + 0,54	4,54 + 0,54	9,1 + 0,54	18,16 + 0,54
Apical	0	0	3,2	0,5
Basal	0	0	2	0



**Figura 07.** Regeneração e crescimento de brotações de macieira *Malus domestica* Borkh cv. “Galaxy” a partir de organogênese foliar, inoculadas em meio de cultura MS suplementado com  $9,1\mu\text{M}$  de TDZ e  $0,54\mu\text{M}$  de ANA cultivadas *in vitro* após 25 dias (A), 28 dias (B), 35 dias (C), 45 dias (D), 51 dias (E) e 60 dias (F) da inoculação.

### 5.3.2. Experimento 02: explantes "folhas inteiras"

Após 10 dias de cultura *in vitro*, que os explantes apresentavam-se encurvados e sem proliferação celular.

O percentual de regeneração foi avaliado aos 24, 38, 45 e 60 dias após introdução *in vitro*, na qual se verificou que a combinação das concentrações de 9,1 $\mu$ M de TDZ e 0,54 $\mu$ M de ANA (T2), suplementada ao meio de cultura MS, apresentou taxas superiores de regeneração de brotos para todas épocas de avaliação (**Figura 08**).

Aos 24 dias verificou-se que o tratamento T2 foi superior aos demais, atingindo um percentual de 72,22% de regeneração dos explantes introduzidos. No entanto, verificou-se que este tratamento não diferiu estatisticamente dos tratamentos T3 (13,62  $\mu$ M TDZ+ 0,54  $\mu$ M ANA) e T4 (18,16  $\mu$ M TDZ + 0,54 ANA). As avaliações aos 38, 45, e 60 dias em cultura *in vitro*, verificou-se que os resultados apresentaram o mesmo comportamento da avaliação anterior. Além disso, observou-se uma contínua formação de novas brotações em todos os tratamentos, atingindo a um percentual de 100% de explantes com brotos no tratamento T2 a partir do 38<sup>o</sup> dia de cultura *in vitro* (**Figura 08**). Assim, verificou-se que todos os tratamentos apresentaram resultados positivos, apresentando taxas de regeneração de brotos variando de 20 a 60%, conforme mostra a **Figura 08**.

Com relação a proliferação celular, observou-se que o tratamento T2 apresentou resultados superiores (**Figura 09**). Avaliação aos 24 dias, após introdução *in vitro*, mostrou que todos os tratamentos apresentaram presença de calos nos explantes.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os de Schuch & Peters (2002) cujos autores utilizaram explantes, folhas inteiras escarificadas na nervura central, obtendo percentual de 85,57% de regeneração com 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ ao meio de cultura MS. Estes autores, sugeriram que a suplementação ao meio de cultura da citocinina (BAP), apresentou um efeito positivo mostrando um comportamento linear crescente para a regeneração dos explantes, conforme o aumento das concentrações de BAP. No entanto, Erig & Schuch (2003) trabalhando com folhas de pereira (*Pyrus communis* L.) não obtiveram a regeneração de brotações com o uso de TDZ nas

concentrações de 8,9 ou 13,3  $\mu\text{M}$ , independentemente do tempo de permanência em meio de cultura.

Para Erig & Schuch (2005) a porcentagem que permitem a regeneração dos brotos por explantes de macieira não apresentou diferença significativa com relação a uso de TDZ, no meio de cultura, nas seguintes concentrações: 4,54; 9,08; 13,62; 18,16 ou 22,7  $\mu\text{M}$  de TDZ. Para estes autores, a menor concentração de TDZ (4,54  $\mu\text{M}$ ) apresentou o mesmo resultado das concentrações mais elevadas. Pode-se verificar as observações destes autores que são similares aos resultados encontrados a este trabalho, sendo estes resultados satisfatórios no que diz respeito a regeneração de brotações para a concentração de 4,54  $\mu\text{M}$  de TDZ (T1), sendo que 40% dos explantes apresentaram regeneração aos 60 dias de cultura *in vitro*, utilizando como explante a folha inteira. Segundo Handro & Floh (1990), a organogênese é controlada pela concentração de fitorreguladores e pelo balanço citocinina/auxina presentes no meio de cultura.

Observou-se no presente trabalho, a proliferação celular e formação de calos nos explantes a partir do 10º dia de cultura *in vitro*, apresentando esta formação principalmente na local da excisão. A proliferação celular foi aumentando com o número de dias de cultura, contudo foi observado que, possivelmente, as brotações originaram-se diretamente a partir de tecidos do explante, os tratamentos T2 e T3, foram os que apresentaram maior proliferação celular de nível médio (nota=3). Erig & Schuch (2005) obtiveram maior intensidade de proliferação celular e formação de calos com o uso de 15,26  $\mu\text{M}$  de TDZ ao meio de cultura, diferindo dos resultados obtidos no presente trabalho.

O TDZ é uma potente substância com efeito de citocinina para estimular a formação de calos em plantas lenhosas, especialmente quando usado em concentração igual ou superior a 1  $\mu\text{M}$  (Huetteman & Preece, 1993).

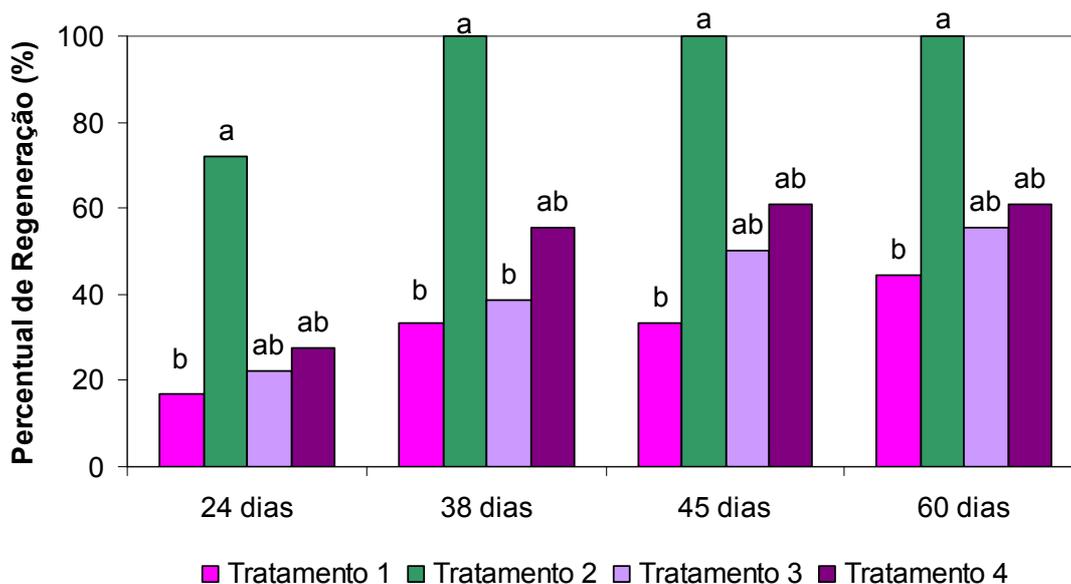
Segundo Chevreau *et al.* (1989), o TDZ pode ser utilizado com sucesso na regeneração de plantas lenhosas. De Bondt *et al.* (1996) obtiveram um melhor resultado com 5mg/L de TDZ no meio de cultura, para a regeneração de explantes foliares de macieira, cultivar Jonagold.

Embora a ação bioquímica do TDZ não seja completamente conhecida, acredita-se que atue na regulação do metabolismo das citocininas ou atue

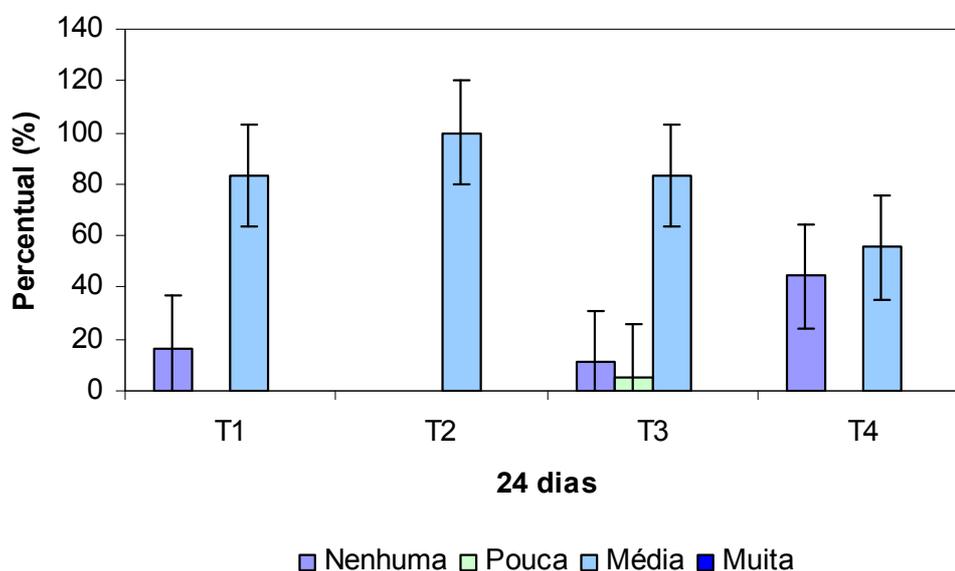
diretamente como citocinina ou em um conjunto com as citocininas (Bhagwat *et al.*, 1996). Segundo Eapan *et al.* (1998), o TDZ inibe não a competitividade a atividade da citocinina oxidase, aumentando a disponibilidade de citocinina endógena. O TDZ tem sido utilizado para a formação de brotações em várias plantas, especialmente nas lenhosas, mostrando-se mais eficiente que outros tipos de citocinina, como o BAP e Kn (Nayak *et al.* 1997)

Observou-se que a proliferação celular nos explantes mantidos em meio de cultura sem TDZ (0  $\mu$ M) foi nula, indicando que a proliferação celular nesta cultivar de macieira é dependente do balanço de citocinina e auxina.

Handro & Floh (1990) relataram que, em certos casos, pode ocorrer apenas uma proliferação celular restrita às regiões seccionadas do explante, com formação de tecidos de cicatrização e zonas de intensa atividade meristemática.



**Figura 08.** Percentual de regeneração dos explantes foliares de *Malus domestica* Borkh, cv. "Galaxy" referentes aos tratamentos T1 (4,54  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA), T2 (9,1  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA), T3 (13,62  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA) e T4 (18,16  $\mu$ M TDZ + 0,54 ANA) após 24, 38, 45 e 60 dias de cultura *in vitro* (N=12). Médias não seguidas pela mesma letra, diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.



**Figura 09.** Índices percentuais de crescimento de massa celular nos explantes foliares de *Malus domestica* Borkh, cv. "Galaxy" referentes aos tratamentos T1 (4,54  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA), T2 (9,1  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA), T3 (13,62  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA) e T4 (18,16  $\mu$ M TDZ + 0,54 ANA) após 24 dias de cultura *in vitro* (N=12). Barras verticais correspondem aos desvios padrões das médias.

### 5.3.3. Experimento 03: explantes “discos foliares”

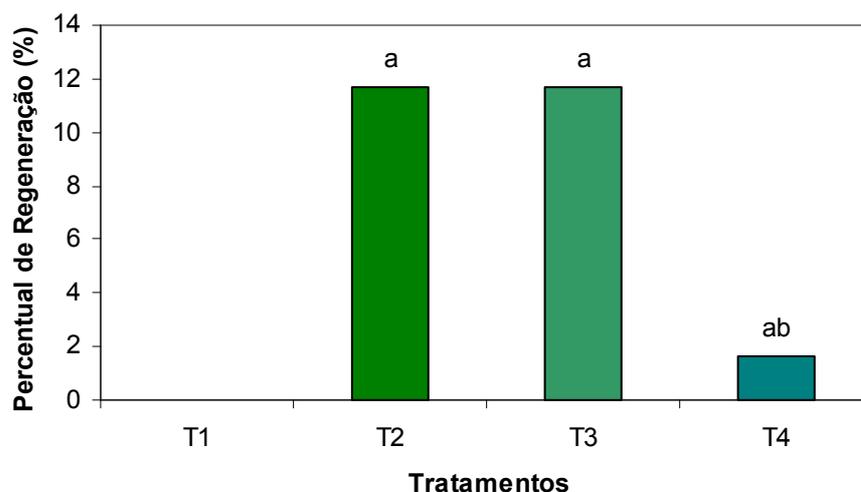
Os resultados mostraram que os tratamentos T2 (9,1 $\mu$ M de TDZ + 0,54 $\mu$ M de ANA) e T3 (13,62  $\mu$ M de TDZ + 0,54  $\mu$ M de ANA) apresentaram resultados superiores, com relação a regeneração de brotos, no entanto não foram estatisticamente diferentes dos demais tratamentos.

Após 30 dias de introdução *in vitro* os tratamentos foram avaliados em relação ao percentual de oxidação. Observou-se que o tratamento T2 (9,1 $\mu$ M TDZ + 0,54 $\mu$ M ANA) apresentou uma maior taxa de oxidação, com percentual de 38,33% de explantes oxidados (dados não apresentados). Verificou-se também que os tratamentos T2 (9,1 $\mu$ M TDZ + 0,54 $\mu$ M ANA) e T3 (13,62  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA) foram os tratamentos que induziram um maior percentual de regeneração dos explantes com índices de 11,66% de explantes regenerados (**Figura 10**).

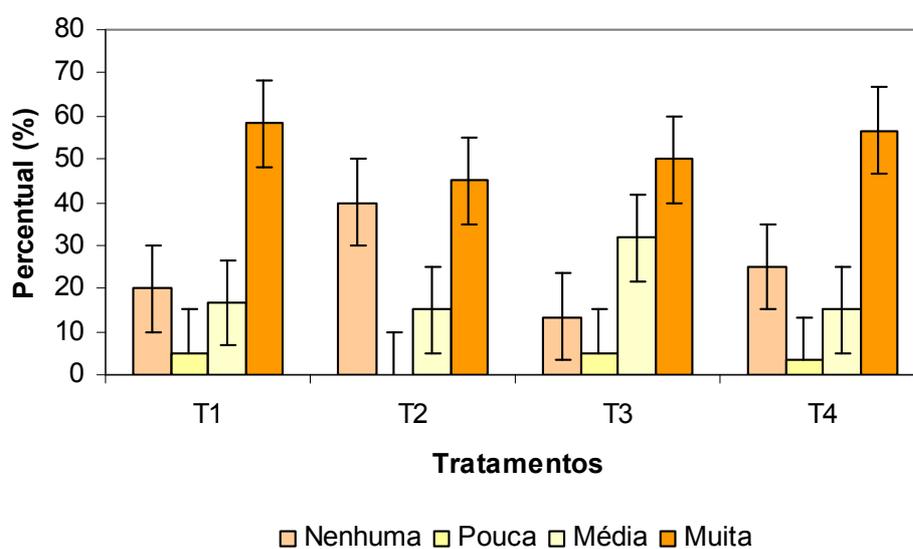
Com relação a proliferação celular, verificou-se que todos os tratamentos apresentaram a formação de calos nos explantes (**Figura 11**). O tratamento T1 (4,54  $\mu$ M TDZ + 0,54 ANA) apresentou valor percentual superior com 58,33% dos explantes com presença de calos.

Os resultados da avaliação, aos 90 dias de cultura *in vitro*, para o percentual de regeneração, número médio de brotações e altura de explantes regenerados são apresentados nas **Figuras 12, 13 e 14**.

Observou-se que o tratamento T3 (13,62  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA), induziu a uma maior taxa de regeneração de brotações, com um percentual de 16,66% de explantes regenerados (**Figura 12**), mas não diferiu estatisticamente dos tratamentos T2 e T4. Este mesmo tratamento promoveu número médio de brotações regeneradas por explante superior aos demais tratamentos, com média de 0,5 brotos por explante regenerado (**Figura 13**). Em relação à altura dos explantes, todos os tratamentos apresentaram valores semelhantes. Verificou-se que o tratamento T2 (9,1  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA) apresentou, valores superiores aos demais tratamentos, com média 0,23 cm de altura por explante regenerado (**Figura 14**).



**Figura 10.** Percentual de regeneração dos explantes foliares de *Malus domestica* Borkh, cv. “Galaxy” referentes aos tratamentos T1 (4,54  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA), T2 (9,1  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA), T3 (13,62  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA) e T4 (18,16  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA) após 30 dias de cultura *in vitro* (N=60). Médias não seguidas pela mesma letra, diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

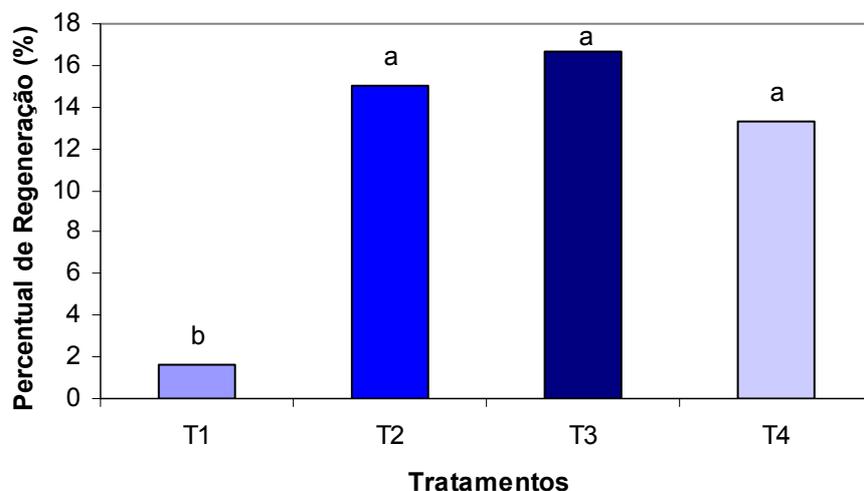


**Figura 11.** Percentual de crescimento de massa celular nos explantes foliares de *Malus domestica* Borkh, cv. “Galaxy” referentes aos tratamentos T1 (4,54  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA), T2 (9,1  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA), T3 (13,62  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA) e T4 (18,16  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA) após 30 dias de cultivo *in vitro* (N=60). Barras verticais correspondem aos desvios padrões das médias.

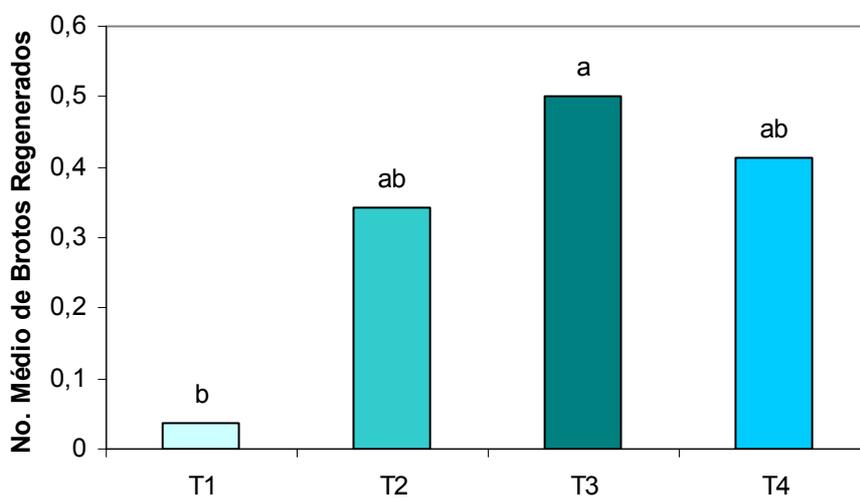
Para organogênese de macieira, Schuch (2000) utilizou como explantes, folhas inteiras escarificadas e segmentos de folhas de aproximadamente 5mm de largura. Para “segmentos de folhas” obteve um percentual de 77,11% de regeneração, utilizando a concentração de 4,0mg/L de TDZ, observando uma maior capacidade regenerativa em explantes de folha inteira escarificada, corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho. Visto que os explantes de “discos foliares” foram extremamente inferiores aos de “folhas inteiras” em relação ao percentual de regeneração de brotações. Estes resultados estão de acordo com Jihyae *et al.* (1996), que trabalhando com várias cultivares de macieira concluíram que folhas possuem uma maior capacidade de regenerar brotações que pecíolos e entrenós. Fortes & Teixeira (1992) também obtiveram melhores resultados na organogênese de explantes foliares de macieira.

O disco foliar utilizado como explante apresentou uma capacidade regenerativa menor do que a folha inteira escarificada. Segundo Bergmann & Moon (1997), a mesma área de tecido foliar quando segmentada, resulta em uma maior produção de brotações adventícias. Isso provavelmente seja devido a uma maior proliferação celular nas áreas seccionadas, com formação de tecidos de cicatrização e zonas de intensa atividade meristemática. Sarwar & Skirvin (1997) conseguiram uma maior regeneração em cultivares de macieira com a utilização de segmentos foliares, pois a formação de brotações adventícias aconteceu tanto na área seccionada, quanto na superfície da folha.

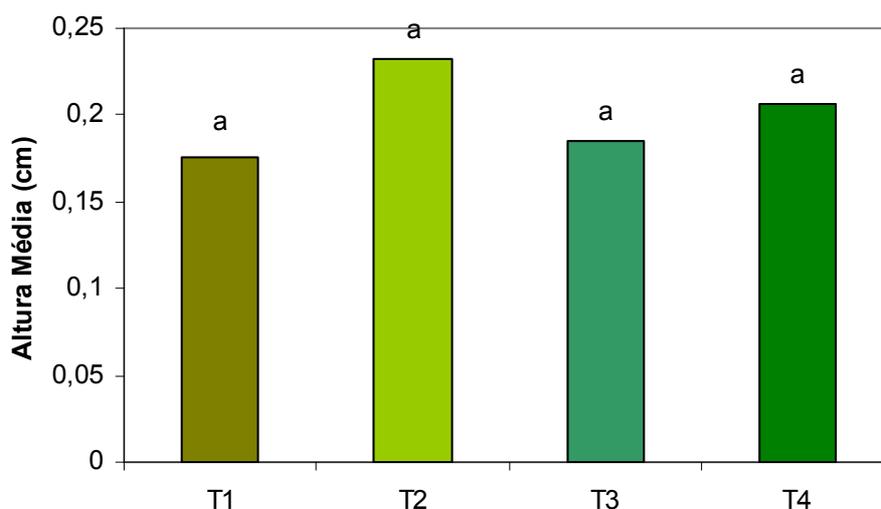
No presente trabalho, a superioridade do explante “folha inteira escarificada” provavelmente possa estar relacionada com uma maior área foliar aliada a partes seccionadas em contato com o meio de cultura, estimulando desta forma a regeneração de brotos.



**Figura 12.** Percentual de regeneração dos explantes foliares de *Malus domestica* Borkh, cv. “Galaxy” referentes aos tratamentos T1 (4,54  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA), T2 (9,1  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA), T3 (13,62  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA) e T4 (18,16  $\mu$ M TDZ + 0,54 ANA) após 90 dias de cultura *in vitro* (N=60). Barras verticais correspondem aos desvios padrões das médias. Médias não seguidas pela mesma letra, diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.



**Figura 13.** Número médio de brotos regenerados por explante foliar de *Malus domestica* Borkh, cv. “Galaxy” referentes aos tratamentos T1 (4,54  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA), T2 (9,1  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA), T3 (13,62  $\mu$ M TDZ + 0,54  $\mu$ M ANA) e T4 (18,16  $\mu$ M TDZ + 0,54 ANA) após 90 dias de cultura *in vitro* (N=60). Médias não seguidas pela mesma letra, diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.



**Figura 14.** Altura média dos brotos regenerados por explante foliar de *Malus domestica* Borkh, cv. “Galaxy” referentes aos tratamentos T1 (4,54 µM TDZ + 0,54 µM ANA), T2 (9,1 µM TDZ + 0,54 µM ANA), T3 (13,62 µM TDZ + 0,54 µM ANA) e T4 (18,16 µM TDZ + 0,54 ANA) após 90 dias de cultivo *in vitro* (N=60). Médias não seguidas pela mesma letra, diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

A respeito da organogênese, a partir de explante foliar, o tipo de explante foliar, isto é, o seccionamento do limbo foi favorável ao processo de regeneração de brotações. Entretanto o explante adotado no segundo experimento (folha inteira) apresentou os melhores resultados, onde obtivemos um maior número de explantes regenerados. A concentração de 9,1 µM de TDZ adicionada ao meio de cultura, permitiu a formação e a regeneração de brotações. No entanto, para os explantes discos foliares, a concentração que apresentou resultados superiores foi 13,62 µM de TDZ. Acredita-se que esta diferença nos resultados, possivelmente, deve-se a área foliar que esteve em contato com o meio de cultura, pois o disco foliar de apenas 6 mm de diâmetro possui uma reduzida área de contato em relação a folha inteira, logo o balanço hormonal de citocinina entre meio de cultura é maior nos explantes de folha inteira, necessitando uma concentração mais elevada de citocinina a ser adicionada ao meio de cultura, pois a superfície de contato do explante com o meio de cultura é menor.

#### 5.4. Análise histológica

Nas secções realizadas observou-se que a folha *in vitro* possui uma epiderme uniestratificada desprovida de tricomas, camadas trisseriadas de parênquima paliçádico justapostas e parênquima esponjoso com aproximadamente três camadas frouxamente arranjadas. O feixe vascular é colateral.

Nas condições de cultura *in vitro*, onde houve a suplementação da citocinina TDZ ao meio de cultura, os explantes apresentaram alterações em toda a extensão foliar. Visíveis mudanças foram observadas nos explantes, tornando-o mais espesso, especialmente nas regiões dos cortes e das escarificações, onde ocorreu intensa proliferação de células. Nestas regiões de intensa proliferação celular, as secções realizadas mostraram um grande volume de células de formato desigual (**Figura 15A**). As secções realizadas mostraram uma desorganização nos tecidos de condução (**Figura 15B**) e divisões principalmente no plano anticlinal no tecido epidérmico. Além das divisões periclinais no tecido epidérmico, foram observadas também divisões periclinais, anticlinais e oblíquas no tecido parenquimático esponjoso (**Figura 15C**). As análises sugerem que através da divisão das células parenquimáticas pode ter ocorrido a iniciação de um processo organogênico direto.

As divisões no tecido parenquimático ocorreram próximas à epiderme e nas regiões onde foram excisadas, possibilitando uma maior proliferação celular, conduzindo à ruptura ou desintegração da epiderme nestes locais. Verificou-se que uma grande quantidade divisões celulares ocorreram próximo a regiões onde encontravam-se os estômatos, pois estas células estomáticas permitem a emergência facilitada das gemas adventícias (**Figura 15D**). Observou-se ainda que uma grande quantidade de brotações emergiu da face abaxial da folha. Isto ocorreu, provavelmente, porque esta face encontrava-se em contato com o meio de cultura.

A formação de gemas adventícias pôde ser observada macroscopicamente, aos 20 dias de cultura *in vitro*. Conforme as observações histológicas, estas brotações têm origem direta de células parenquimáticas do mesofilo, as quais dividem-se sequencialmente dando origem a meristemóides e em seguida a meristemas (**Figura 16A, B e C**). Observou-se ainda que as

gemas adventícias apresentaram ligação com o tecido do explante e estabeleceram uma conexão vascular com o mesmo (**Figura 16B**).

Para Pihakashi-Maunsbach *et al.* (1993), explantes de camadas finas de células, constituídas de células parenquimáticas subepidérmicas, têm permitido estudos das alterações celulares que ocorrem quando a organogênese direta é induzida a ocorrer nestes tecidos. Em *Brassica napus*, estes autores, observaram, nos primeiros 15 dias de cultura *in vitro*, um aumento no tamanho das células do explante. Segundo os autores, este aumento implica, indubitavelmente, no alongamento celular. Este alongamento celular também foi observado em algumas células que se encontravam em processo de divisão no presente trabalho.

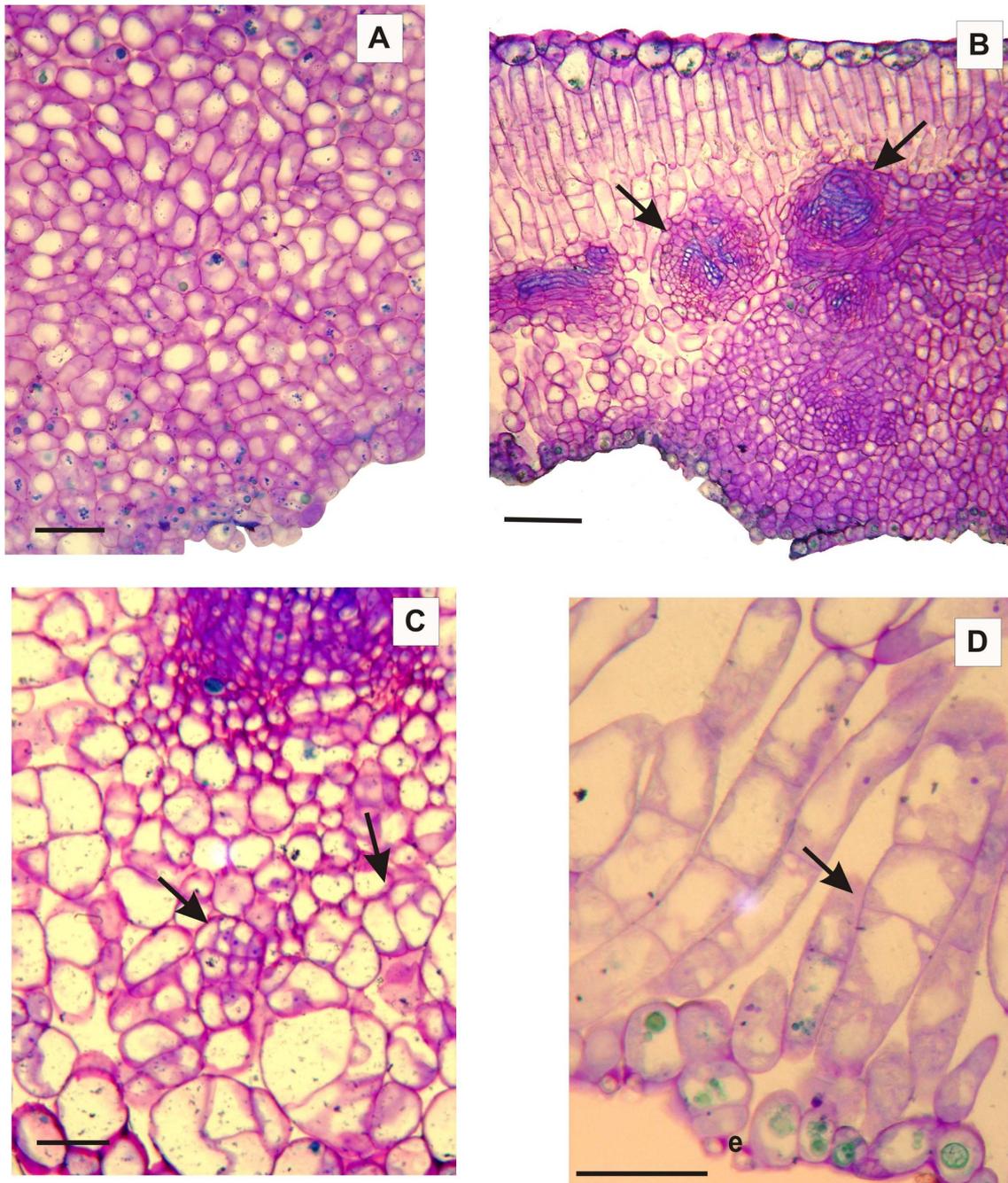
A organogênese é comumente relatada como sendo um processo de origem multicelular. Entretanto, Creemers-Molenaar *et al.* (1994) e Arai *et al.* (1997) demonstraram que também pode ser de origem unicelular.

O estudo anatômico da organogênese *in vitro* de maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.), realizado por Apezato-da-Glória *et al.* (1999), constatou que as gemas adventícias surgiram a partir de meristemóides originados de divisões celulares na camada sub-epidérmica, caracterizando uma organogênese direta.

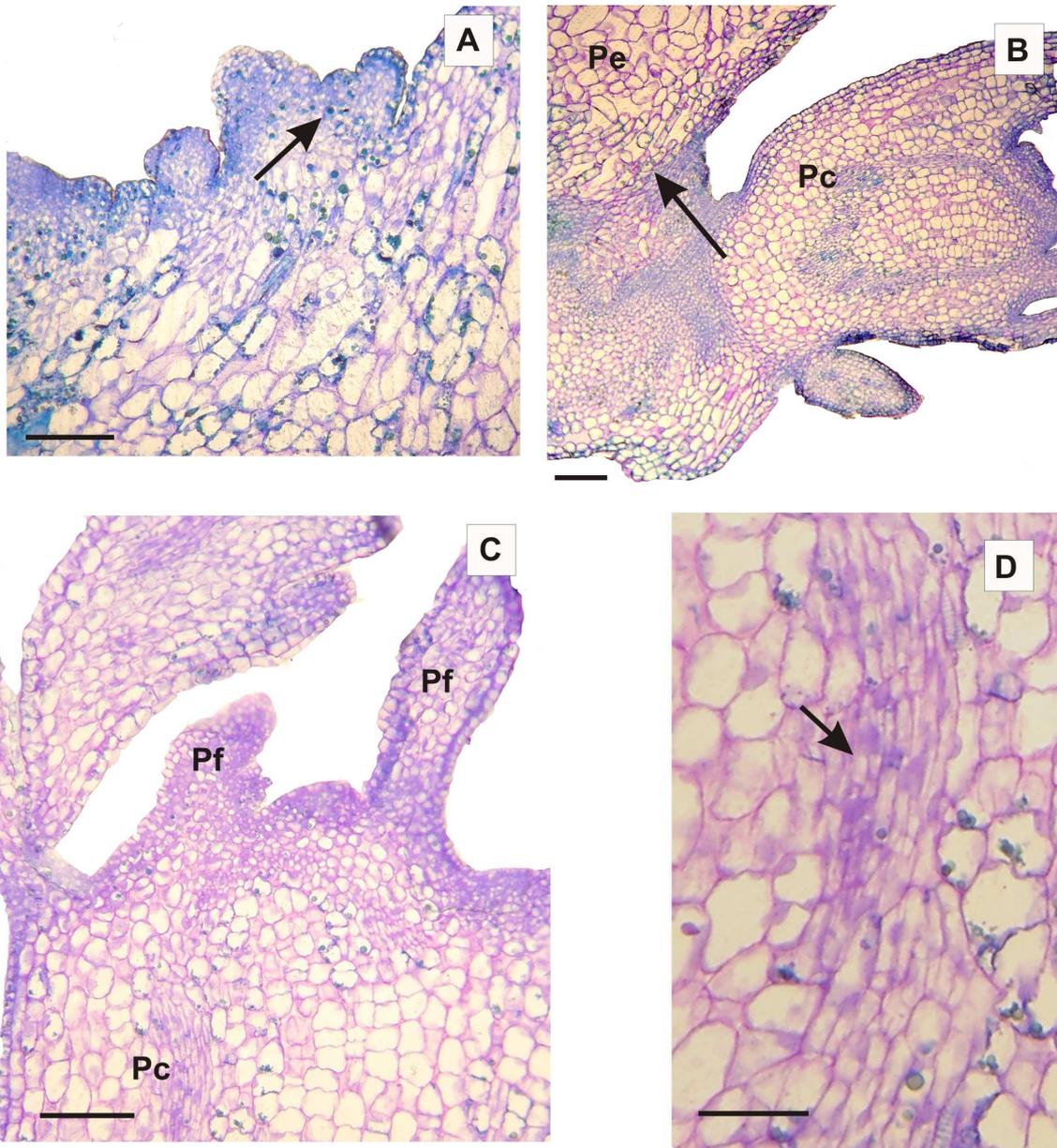
Estudos histológicos realizados por Detrez *et al.* (1988) confirmaram a origem sub-epidérmica de gemas caulinares formadas diretamente a partir de explantes peciolares excisados de plântulas de *Beta vulgaris*. Mais recentemente Roussy *et al.*, (1996), observaram através de análises histológicas a formação indireta de gemas caulinares a partir de áreas meristemáticas situadas na superfície de calos induzidos em explantes foliares cultivados em meio de regeneração contendo  $0,1\text{mg.L}^{-1}$  de BAP.

Trabalhando com a *Petunia inflata*, Handro *et al.* (1973 *apud* Apezato-da-Glória 1998), verificaram que a morfogênese da parte aérea era sempre precedida pelo estabelecimento de um meristema nas camadas periféricas do calo. Os calos eram constituídos de células arranjadas compactamente e, conforme o crescimento progredia, numerosas faixas marginais de tecido meristemático discernível eram organizadas ao longo da periferia da massa de calos nas quais elementos traqueais eram diferenciados.

Assim, apesar do trabalho mostrar evidências sobre a origem direta da organogênese das gemas adventícias da macieira cv. “Galaxy”, a possibilidade de formação indireta não pode ser descartada, pois observou-se a formação de calos nos explantes os quais também podem ter originado brotações. Conforme observações de Garcia-Luiz *et al.* (1999), trabalhando com análise histológica para a caracterização da morfogênese em segmentos de epicótilo de citrange ‘Troyer’, constataram a formação de organogênese direta e indireta. Monteiro-Hara (2000), trabalhando com discos foliares e segmentos cotiledonares de *Passiflora*, também observou na espécie *P. edulis* Sims f. *flavicarpa*, que a formação das gemas adventícias ocorreu a partir de proliferação de calos nas bordas dos explantes ou diretamente a partir do explante.



**15A-D.** Secções transversais de explantes foliares de *Malus domestica* Borkh. cultivados *in vitro*. **15A.** Intensa proliferação celular. Note formato desigual das células. Barra=50µm. **15B.** Desorganização do sistema vascular (Seta). Barra=100µm. **15C.** Divisões periclinais, anticlinais e oblíquas no tecido parenquimático esponjoso (Seta). Barra=50µm. **15D.** Células do parênquima esponjoso formando grupamentos alongados e direcionados aos estômatos. e=estômato. Note divisões periclinais (Seta). Barra=50µm



**16A-D.** Secções de explantes foliares de *Malus domestica* Borkh. cultivados *in vitro*. **16A.** Gema adventícia no início de desenvolvimento (Seta). Barra=25 $\mu$ m. **16B.** Região de conexão entre o parênquima esponjoso do explante e a gema adventícia (Seta). **Pe**=Parênquima esponjoso. Barra=50 $\mu$ m. **16C.** Gema adventícia com evidentes primórdios foliares. **Pf**=Primórdios foliares. **Pc**=Procâmbio. Barra=50 $\mu$ m. **16D.** Detalhe do procâmbio da gema adventícia (Seta). Barra=25 $\mu$ m.

## 6 . CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para o estabelecimento *in vitro* de macieira cv. "Galaxy" verificou-se que os tratamentos de assepsia, permitiram a introdução *in vitro*. No entanto, a metodologia foi pouco eficiente, possibilitando baixas taxas de sobrevivência dos mesmos no meio de cultura.

No processo de multiplicação *in vitro* da maceira cv. "Galaxy" a concentração de 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP foi a mais efetiva para multiplicação e produção de brotos com altura igual ou superior a 20 mm. Doses elevadas da citocinina BAP no meio de cultura, afetaram negativamente as brotações, proporcionando um menor crescimento e maior taxa de vitrificação das mesmas.

A respeito da organogênese a partir de explante foliar, pôde-se observar que o tipo de explante, isto é, o seccionamento do limbo foi favorável ao processo de regeneração de brotações. Entretanto, o explante folha inteira apresentou os melhores resultados, em relação as taxas regenerativas. A concentração de 9,1  $\mu\text{M}$  de TDZ adicionada ao meio de cultura, foi a concentração que apresentou os resultados favoráveis a regeneração de brotações. No entanto, para os discos foliares, a concentração que apresentou resultados superiores foi 13,62  $\mu\text{M}$  de TDZ.

Análises histológicas permitem inferir que a organogênese das brotações, teve origem direta de células do mesofilo, ou seja, células do parênquima. Porém não é possível afirmar que todas as brotações adventícias originaram-se deste tecido, pois observou-se a presença de calos nos explantes no decorrer dos experimentos.

Recomenda-se para estudos posteriores a utilização de outras metodologias para a assepsia dos explantes na fase de estabelecimento *in vitro* desta cultivar, pois a metodologia adotada teve pouco sucesso. Para os estudos de organogênese, existe a necessidade de novas pesquisas com diferentes reguladores de crescimento, bem como suas combinações e concentrações. Outro fator a ser recomendado aos novos experimentos para a obtenção de organogênese direta é a utilização de outros tipos de explantes, orientação dos mesmos e avaliar diferentes períodos de total ausência de radiação luminosa.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M. F. **Calogênese, isolamento e cultivo de protoplastos dos porta-enxertos de macieira M9 (*Malus pumila*) e marubakaido (*Malus prunifolia*).** Florianópolis, 2006. 94p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

ABREU, M.F.; PEDROTTI, E.L. Micropropagação de macieira. **Revista de Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento.** n.31, julho/dezembro, 2003.

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, maio 2004.

AMMIRATO, P.V. Recent progress in somatic embryogenesis. **News International Associate of Plant Tissue Culture**, Calgary, v.57, p.2–16, 1989.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. **Aspectos histológicos e ultra-estruturais da organogênese somática *in vitro* de três espécies de leguminosas.** Piracicaba, 1998. 74p. Tese (Livre-Docência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; VIEIRA, M.L.C.; DORNELAS, M.C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira.**, Brasília, v.34, n.11, p.2007-2013, nov. 1999.

ARAI, M.; SAITO, T.; KANEKO, Y.; MATSUSHIMA, H. Cellular origin and ultrastructural changes of regenerating shoots from tobacco (*Nicotiana tabacum*) internodes cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v.99, p.523-528, 1997.

ASSANI A.; HAICOUR, R.; WENZEL, G.; FOROUGH-WEHR, B. BAKRY, F.; COTE, F.X.; DUCREUX, G.; AMBROISE, A.; GRAPIN, A. Influence of donor material and genotype on protoplast regeneration in banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). **Plant Science**, v.162, p.355-362, 2002

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE MAÇÃ. **Associados**. Disponível em: <<http://www.abpm.org.br/index.htm>> Acesso em 06/04/2005.

BARLASS, M.; SKENE, K.G.M. *In vitro* plant formation from citrus species and hybrids. **Scientia Horticulturae**, v.17, n.3, p.333-341, 1992.

BENEDITO, V.A.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. Calogênese, embriogênese somática e isolamento de protoplastos em variedades de laranja doce. **Scientia Agraria**, v.57, p.33-38, 2000.

BERGMANN, B.A.; MOON, H.K. *In vitro* adventitious shoot production in *Paulownia*. **Plant Cell Reports**, v. 16, p.315-319, 1997.

BHAGWAT, B.; VIEIRA, L.G.E.; ERICKSON, L.R. Stimulation of *in vitro* shoot proliferation from nodal explants of cassava by thidiazuron, benzyladenine and gibberellic acid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 46, p.1-7, 1996.

BOLAR, J.P.; NORELLI, J.L.; ALDWINCKLE, H.S. An efficient method for rooting and acclimation of micropropagated apple cultivars. **HortScience**, New York, v.33, n.7, p.1251-1252, 1998.

DE BONDT, F.; FERRADINI, N.; STAFFOLANI, P.; STANDARDI, A. Effect of leaf excision, time and age, BA concentration and dark treatments on "*in vitro*" shoot regeneration of M-26 apple rootstock. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v.69, n.4, p. 679-685, 1994.

BONETI, J.I.; CESA, J.D.; PETRI, J.L.; BLEICHER, J. Evolução da cultura da macieira. **A cultura da macieira**. Florianópolis: Epagri, p. 37-57, 2002.

BONETI, J.I.S., CESA, J. D., PETRI, J. L., HENTSCHE, R. **Cadeias produtivas do estado de Santa Catarina: Maçã**. Boletim técnico N°105, Epagri, Florianópolis, SC, 94p., 1999.

BORDÓN, Y.; GUARDIOLA, J.L.; GARCIA-LUIS, A. Genotype affects the morphogenic response in vitro of epicotyl segments of *Citrus* rootstocks. **Annals of Botany**, v.86, p.159-166, 2000.

BORGES JÚNIOR, L. Mercado atual e perspectivas para maçã. *In* Reunião sobre o Sistema de Produção Integrada de Macieira no Brasil, 1999. Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, p. 3-5, 1998.

BRACKMANN, A. Produção etileno, CO<sub>2</sub> e aroma de cultivares de maçã. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.14, n.1, p.103-108, 1992.

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 : SPI / Embrapa - CNPH, 1999. V.2, p.679–735.

BURGER,D.W.;HACKETT, W.P. Gradient of adventitious bud formation on excised epicotyl and root sections of citrus. **Plant Science**, v.43, p.229-232, 1986.

CABASSON, C.; OLLITRAULT, P.; CÔTE, F-X.;FERRIERE, N-M.; DAMBIER, D.; DALNIC, R.;TEISSON, C. Characteristics of citrus cell cultures during undifferentiated growth on sucrose and somatic embryogenesis on galactose. **Plant Physiology**, v.93, p.464-470, 1995.

CABONI, E.; LAURI, P.; D'ANGELI, S. In vitro plant regeneration from callus of shoot apices in apple shoot culture. **Plant Cell Reports**, New York, v.19, p.755–760, 2000.

CAMARGO, J.T.; FORTES, G.R. de; SILVA, J.B.; FLORES, R.; CENTELLAS, A.Q.; OLIVEIRA, M.F.; MULLER, N.G.; ANDRADE, L.B. Efeito do escuro e do seccionamento de internódios do porta-enxerto de macieira, cv. Marubakaido, na calogênese *in vitro*. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.5 no 2, 81-83. mai-ago,1999.

CAMILO, A. P. & DENARDI, F. **Cultivares: Descrição e comportamento no sul do Brasil**. In EPAGRI. A cultura da macieira. Florianópolis: Epagri, 2002. p. 113-168.

CARVALHO, D.C.; BIASI, L. A. Organogênese do caquizeiro a partir de segmentos radiculares. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, p.1401-1406, set-out, 2004.

CHEVREAU, E.; SKIRVIN, R. M.; ABU-QAOUD, H.A.; KORBAN, S.S.; SULLIVAN, J.G. Adventitious shoot regeneration from leaf tissue of three pear (*Pyrus* sp.) cultivars *in vitro*. **Plant Cell Reports**, v.7, p.688-691, 1989.

COSTA, C.M. e AYUB, R. A. Fluxo radiante na organogênese do maracujazeiro amarelo. **Scientia Agricola.**, v.3, n.1-2, p.103-106, 2002.

COSTA, M.G.C. **Hibridação somática em citros com ênfase ao melhoramento de porta-enxertos**. Piracicaba, 2001. 124p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, Universidade de São Paulo.

CREEMERS-MOLENAAR, J.; HAKKERT, J.C.; VAN STAVEREN, M.J.; GILISSEN, L.J.W. Histology of the morphogenic response in thin cell layer explants from vegetative tobacco explants. **Annals of Botany**, v.73, p.547-555, 1994.

CRISTOFANI, M. **Adaptação de metodologias de cultura de tecidos visando o melhoramento através de indução de mutações em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Pêra**. Piracicaba, 1991. 185p. Dissertação

(Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

DETREZ, C.; TETU, T.; SANGWAN, R.S.; SANGWAN-NORREEL, B.S. Direct organogenesis from petiole and thin cell layer explants in sugar beet cultured *in vitro*. **Journaul of Experimental Botany**, v.39, p.917-926, 1988.

DURAN-VILA, N.; GORGOCENA, Y.; ORTEGA, V.; ORTIZ, J.; NAVARRO, L. Morphogenesis and tissue culture of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osb.): effect of temperature and photossyntetic radiation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.29, p.11-18, 1992.

DURAN-VILA, N.; ORTEGA, V.; NAVARRO, L. Morphogenesis and tissue cultures of three citrus species. **Plant Cell, Tissue and Organ. Culture**, v.16, p.123-133, 1989.

EAPEN, S.; TIVAREKAR, S.; GEORGE, L. Thidiazuron-induced shoot regeneration in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.53, p.217-220, 1998.

EDRISS, M.H.; BURGER, D.W. *In vitro* propagation of ‘Troyer’ citrange from epicotyl segments. **Scientia Horticulturae**, v.23, p.159-162, 1984.

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, maio/jun., 2005.

ERIG, A.C. e SCHUCH, M.W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.9, n.3, p.221-227, 2003.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Regeneração *in vitro* de brotações de Pereira (*Pyrus communis* L.) cultivar Carrick. **Ciência Rural**, v. 33, n. 3, mai-jun, 2003.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido: efeito da orientação do explante no meio de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, vol.24, no.2, p.293-295, ago. 2002.

FORTES, G.R.L.; TEIXEIRA, S.L. Calogênese e organogênese de material somático de macieira (*Malus domestica* Borkh.). In: Congresso Ibero Americano, 1, Congresso Latinoamericano, 5, Congresso Nacional de Horticultura, 4, Montevideu, p.21, 1992

FLOH, E.I.S.; HANDRO, W. Variation of histological patterns in tobacco callus during successive subcultures. **Canadian Journal of Botany**, v.63, p.1794-1800, 1985.

GARCIA-LUIS, A.; BORDÓN, Y.; MOREIRA-DIAS, J.M.; MOLINA, R.V.; GUARDIOLA, J.L. Explant orientation and polarity determine the morphogenic response of epicotyl segments of Troyer citrange. **Annals of Botany**, v.84, p.715-723, 1999.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Edington: Exegetics, 1993. pt.1: The technology, 574p.

GHORBEL, B.R.; NAVARRO, L.; DURAN-VILA, N. Morphogenesis and regeneration of whole plants of grapefruit (*Citrus paradise*), sour orange (*C. aurantium*) and alemow (*C. macrphylla*). **Jornaul of Horticulturae Science and Biotecnology**, v.73, p.323-327, 1998.

GLORIA, B. A. DA; VIEIRA, M. L. C; DORNELAS, M. C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leafderived explant of passionfruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 11, p. 2007-2013, 1999.

GOH, C.J.; SIM, G.E.; MORALES, C.L.; LOH, C.S. Plantlet regeneration through different morphogenic pathways in pummelo tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.43, p.301-303, 1995.

GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO M. A. Micropropagação, Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas. **Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília - DF, p.100-169, 1990.

GUERRA, M. P. Controle da Morfogênese *in vitro* e suas Aplicações. **Resumo das Palestras apresentadas ao Seminário de Biotecnologia como Meio de Aumentar a Produção de Alimentos**. Porto Alegre, 1993.

GUERRA, P.M.; NODARI, R.O.; DIOLA, V. **Material didático de apoio da disciplina de Biotecnologia**. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Disponível em: <http://www.cca.ufsc.br/lfdgv/Apostila%20cultura%20de%20tecidos.htm>.

Acesso em: 10 de agosto de 2006.

HACCIUS, B. Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. **Phytomorphology**, v.28, p.74-81, 1978.

HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (eds). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília : ABCTP / Embrapa – CNPH, p.203–212, 1990.

HARBAGE, J. F. ; STIMART, D. P.; AUER, C. pH affects 1h-indole-3-butyric acid uptake but not metabolism during the initiation phase of adventitious root induction in apple microcuttings. **Journal of America Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.123, n.1, p. 6-10, 1998.

HICKS, G.S. Patterns of organ development in tissue culture: the problem of organ determination. **The Botanical Review**, v.46, p1-23, 1980.

HUETTMAN, C.A.; PREECE, J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for wood plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.33, n.2, p.105-119, 1993.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. **Comparativo das exportações brasileiras de frutas frescas fev 2004/2005**. Disponível em: <[http://www.ibraf.org.br/x-es/pdf/t-esta\\_CEBFFfev20042005.pdf](http://www.ibraf.org.br/x-es/pdf/t-esta_CEBFFfev20042005.pdf)> Acesso em 08/04/2005.

INSTITUTO DE PLANEJAMENTO E ECONOMIA AGRÍCOLA DE SANTA CATARINA (ICEPA). Disponível em: <<http://www.icepa.com.br>>. Acesso em: 15 de janeiro de 2007.

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

JIHYAE, J.; BYEONGWOO, Y.; MIHEE, Y.; JUNGWAN, H.; YOUNGUK, S.; JEAEBOK, JUN, J.H.; YAE, B.W.; YANG, M.H.; HWANG, J.H.; SHING, Y.U.; PARK, J.B. Influence of cultivar, light condition and pre-treatment on adventitious shoot regeneration from leaves, internodes and petioles of *Malus domestica in vitro*. **Journal of the Korean Society for Horticultural Science**, Korea Republic, v.37, n.5, 1996.

JONES, J. B. & MURASHIGE, T. Tissue propagation of *Aechma fasciata* and other Bromeliads. **Proceedings Int Plant Propagators Society**, 24:117 – 126. 1974.

KELKAR, S.M.; DEBOO, G.B.; KRISHNAMURTHY, K.V. *In vitro* regeneration from leaf callus in *Piper colubrinum* Link. **Plant Cell Reports**, v.16, p.215-218, 1996.

KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.E.; BUSSO, J.A. (Ed.).

**Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa, SPI; Embrapa, CNPH, 1999. v.2, p.519-531.

KOVALESKI, A. et al., AGAPOMI – Jornal da Associação Gaúcha dos Produtores de Maçã e Pêra. Vacaria – RS. Abril de 2000. Edição 113. p8.

KUNIEDA, M.K.; KERBAUY, G.B. Formação de gemas em raízes adventícias de couve-flor cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, n.9, p.231–238, 1986.

KUNITAKE, H.; KAGAMI, H.; MII, M. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplast of ‘Satsuma’ mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) **Scientia Horticulturae**, v.47, p.27-33, 1991.

LEBLAY, C.; CHEVREAU, E.; RABOIN, L.M. Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaves of several pear cultivars (*Pyrus communis* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v.25, p.99–105, 1991.

MANSUR, E. & MARGIS-PINHEIRO, M. Plantas geneticamente modificadas: um caminho para o melhoramento vegetal. **ABCTP Notícias**, Brasília, n. 23, p. 2-7, 1995.

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 - SP, v. 23, n. 3, p. 714-717, dezembro 2001.

MEKERS, O. & VAN OSEM, J. G. *In vitro* propagation of *Vriesea* Cultivars in compararison with other ornamental Bromeliaceae. **Acta Horticulturae**, no. 78, p.311-317, 1983.

MELLO, L. M. R. **Produção e mercado de maçã.** Comunicado técnico n<sup>o</sup> 50, EMBRAPA, Bento Gonçalves, RS, junho, 2004.

MENDES-DA-GLÓRIA, F.J.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; ALMEIDA, W.A.B. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus Hamlin cultivar (*Citrus sinensis* L. Osbeck) epicotyl segments. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.955-961, 2002.

MODGIL, M.; SHARMA, D.R.; BHARDWAJ, S.V. Micropropagation of apple cv. Tydemán's Early Worcester. **Science Horticulturae**. v.81, n.2, p.179-188, 1999.

MOHAMED, M.F.; READ, P.E.; COYONE, D.P. Dark preconditioning, CPPU, and thidiazuron promote shoot organogenesis on seedling node explants of common and faba beans. **Jornaul of the America Society for Horticulturae Science**, v117, p.668-672, 1992.

MONDAL, M.; GUPTA, S.; MUKHERJEE, B.B. Callus culture and plantlet production in *Carica papaya* (Var. Honey Dew). **Plant Cell Reports**, v.13, p.390-393, 1994.

MONTEIRO-HARA, A.C.B.A. **Cultivo *in vitro* de três espécies do gênero Passiflora**. Piracicaba, 2000. 82p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

MOORE, G.A.; JACANO, C.C.; NEIDIGH, J.L. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, v.11, p.238-242, 1992.

MORALES, C.F.G.; LOMBARDI, S.R.B.; SOARES, P.F.; FORTES, G.R. de L. Efeito do BAP e TDZ na calogênese e organogênese em internódios de macieira cv. Gala RW1. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.5 no3, 174-177. set-dez, 1999.

MOREIRA-DIAS, J.M.; MOLINA, R.V.; BORDÓN, Y.; GUAARDIOLA, J.L.; GARCÍA-LUIS, A. Direct and indirect shoot organogenic pathways in epicotyl

cuttings of Troyer citrange differ in hormone requirements and their response to light. **Annals of Botany**, v.85, p.103-110, 2000.

MOREL, G. Producing virus-free cymbidiums. **Am. Orch. Soc. Bull.**, 29: 495-497, 1960.

MOURGUES, F. *et al.* Efficient Agrobacterium – mediated transformation and recovery of transgenic plants from pear (*Pyrus communis* L.). **Plant Cell Reports**, New York, v.16, p.245–249, 1996.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and assays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiology**, 15:473-497, 1962.

NAYAK, N.R.; PATNAIK, S.; RATH, S.P. Direct shoot regeneration from foliar explants of and epiphytic orchid, *Acampe traemorsa* (Roxb) Blatter and McCann. **Plant Cell Report**, v.16, p.583-586, 1997.

NHUT, D. T.; SILVA, J. A. T.; LE, B. V.; VAN, K. T. T. Thin cell layer (TCL) morphogenesis as a powerful tool in woody plant and fruit crop micropropagation and biotechnology, floral genetics and genetic transformation. In: JAIN, S. M.; ISHII, K. **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2003. p. 783-814.

NUNES, J. C. O., BARPP, A., SILVA, F. C., PEDROTTI, E. L. Micropropagação do porta-enxerto 'Marubakaido' (*Malus prunifolia*) a partir da cultura de meristemas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, vol.21, no.2, p.191-195, ago. 1999.

PELLEGRINESCHI, A.; MARIANI, O.D. *Agrobacterium rhizogenes* – mediated transformation of scented geranium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v.47, p.79–86, 1996.

PEREIRA, A.M.S.; BERTONI, B.W.; APEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; ARAUJO, A.R.B.; JANUÁRIO, A.H.; LOURENÇO, M.V.;FRANÇA, S.C. Micropropagation of

*Pothomorphe umbellata* via direct organogenesis from leaf explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.60, p.47-53, 2000.

PEREZ-MOLPHE-BALCH, E.; OCHOA-ALEJO, N. *In vitro* plant regeneration of Mexican lime and mandarin by direct organogenesis. **HortScience.**, v.32, p.931-934, 1997.

RAMALHO, M.; SANTOS, J.B.P. **Genética na agropecuária**. São Paulo: Globo, 1990. 359p.

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

RICCI, A.P.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J.; PIEDADE, S.M.S. Somatic embryogenesis in *Citrus sinensis*, *C. reticulata* and *C. nobilis* x *C. deliciosa*. **Scientia Agricola**, v.59, p.41-46, 2002.

RIBEIRO, D.W. **Morfogênese *in vitro* da videira: variedades Paulsen 1103, VR 043-43 e Cabernet Sauvignon**. Florianópolis, 2006. 68p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

ROCHA, S.C. & QUOIRIN, M. **Calogênese e rizogênese em explantes de mogno (*Swietenia macrophylla* King) cultivados *in vitro***. *Ciência Florestal*, v.14, n.1, p.91-101, 2004.

ROUSSY, I.; FRÉDÉRIC, D.; SANGWAN, R.S. SANGWAN-NORREL, B.S. In plant 2,3,5, triodobenzoic acid treatment promotes high frequency and routine *in vitro* regeneration of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) plants. **Plant Cell Reports**, v.16, p.142-146, 1996.

RUZIN, S. E. **Plant microtechnique & microscopy**. Oxford University Press, Inc. New York. 322p. 1999.

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

SCHEARTZ, E., RONCATTO, G., FORTES, G. R. L. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido utilizando 6-benzilaminopurina e ácido naftalenoacético. **Revista Brasileira de Fruticultura**, vol.22, no.1, p.77-79, abr. 2000.

SCHMIDT, W.; SILVA, A.L. La domestication de la pomme au Brésil: histoire d'une politique volontariste. In: BYÉ, P. (Ed.) **Domestique le vegetal: construction et appropriation des techniques**. Montpellier, INRA/CTESI, p. 155-171, 1998.

SCHUCH, M. W. **Regeneração e transformação de macieira, cultivar Gala, mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, visando a obtenção de plantas com o gene antisense da ACC Oxidase**. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, p. 71, 2000.

SCHUCH, M. W.; PETERS, J. A. Regeneração de brotações de macieira (*Malus domestica*, Borkh.) cv. Gala. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 301-305, 2002.

SCHWARTZ, E.; RONCATTO, G.; FORTES, G. R. L. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido utilizando 6-benzilaminopurina e ácido naftaleacético. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – SP, v. 22, n.1, p.77-79, abril, 2000.

SEGURA, J. **Morfogenesis *in vitro***. In: BIETO, J.A.; TALON, M. (Ed.) *Fisiologia y bioquímica vegetal*. Madrid: Ed. Interamericana, 1993. 625p.

SEMERIA, L. et al. Genetic transformation of *Eustoma grandiflorum* by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v.47, p.67–72, 1996.

SIM, G.E.; GOH, C.J.; LOH, C.S. Micropropagation of *Citrus mitis* Blanco: multiple bud formation from shoot and root explants in the presence of 6-benzilaminopurine. **Plant Science**, v.59, p.203-210, 1989.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Sym. Soc. Exp. Biol.**, 11:118-131, 1957.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J.. **Biometry : the principles and practice of statistics in biological research**. 3rd ed. New York: W. H. Freeman, 1995.

STAINER, R.; WOHLGEMUTH, H.; GUMMERER, K. Rischi e opportunità dei mutanti di melo. **Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura.**, Bologna, n.9, p.19-23, 2001.

STREET, H. E. Cell (Suspension) Cultures - Techniques. In: **Plant Tissue and Cell Culture**. Street, H. E. (ed.). University of California Press. Berkeley and Los Angeles. 61-102 p. 1975.

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

TEIXEIRA, P.T. **Propagação *in vitro* e caracterização molecular de porta-enxertos de Prunus por marcadores microssatélites (SSR)**. Florianópolis, 2004. 68p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

TSUCHIYA, S. Perspectivas das novas cultivares japonesas de maçã no Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL DE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 4., 2001, Fraiburgo. **Anais...** Fraiburgo, SC: ENFRUTE, 2001. p. 58-68.

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

VILLALOBOS, A. V. M. & THORPE, T. A. **Micropropagación: Conceptos, Metodología y Resultados. Cultivo de Tejidos en la Agricultura - Fundamentos y Aplicaciones.** Centro Internacional de Agricultura, 969 p. 1991.

WALSH, C. S. & VOLZ, R. 'Gala' and the Red 'Gala' sports: A preliminary comparison of fruit maturity. **Fruit Var. Journ.**, Urbana, v.1, n.45, p.2-3, 1990.

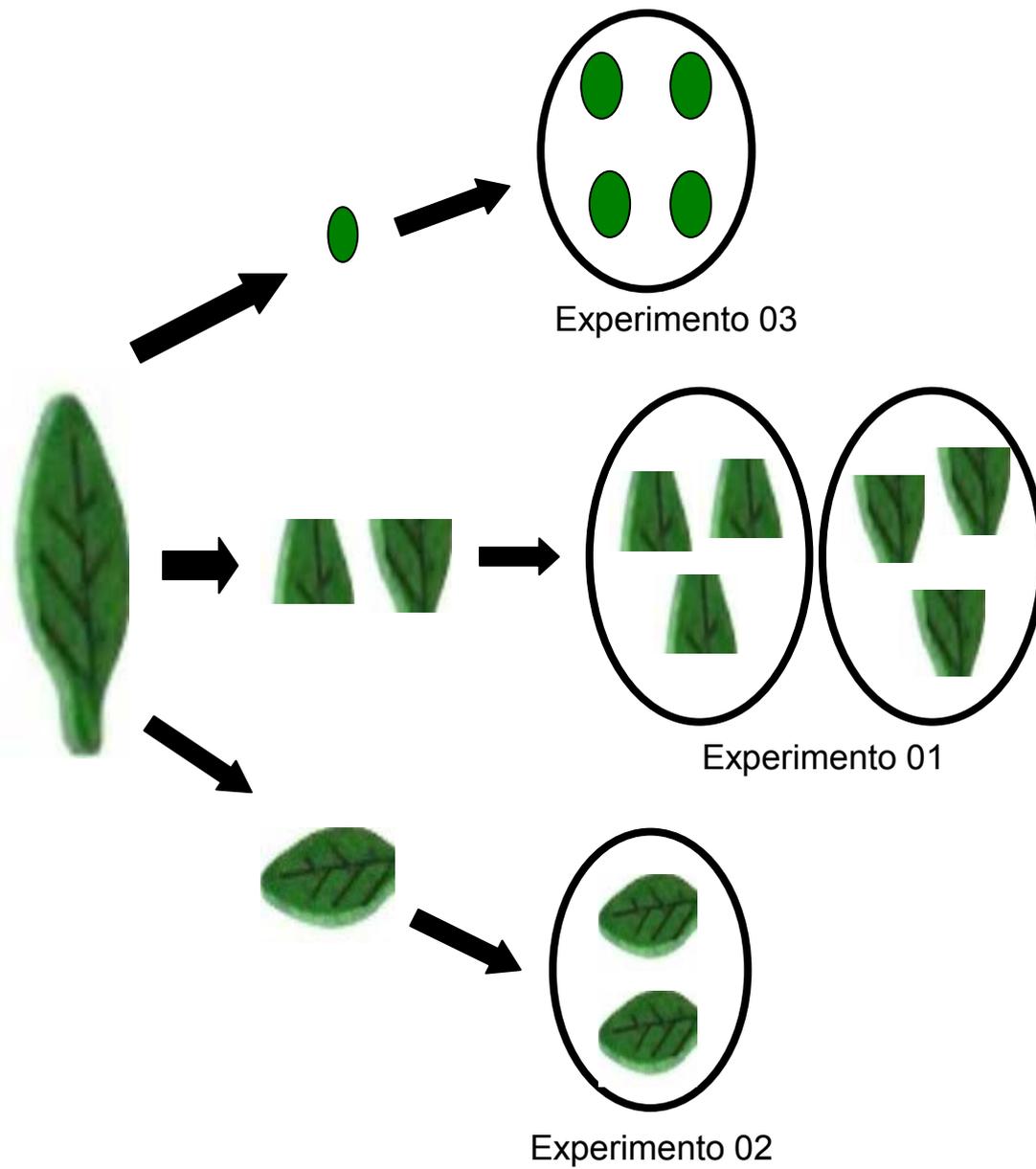
YAO, J. L. et al. Regeneration of transgenic plants from the commercial apple cultivar Royal Gala. **Plant Cell Reports**, New York, v.14, p.407-412, 1995.

ZANETTI, L. J. R. **Produção integrada de maçãs: Pragas e manejo de *Neoseiulus californicus* (Mcgregor) (Phytoseiidae: Acari).** Trabalho de conclusão de curso em engenharia agrônoma – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

ZIMMERMANN, R.H.; FORDHAM, I. Simplified method for rooting apple cultivars *in vitro*. **Jornaul of America Society for Horticulturae Science**, Alexandria, v. 110, n.1, p. 34-38. 1985.

ZORNIG, R. K. Micropropagação de Bromélias. **Bromélias**, 1:3 - 8, 1996.

**8. ANEXO**



**Anexo 01.** Desenho esquemático dos experimentos de organogênese a partir de explantes foliares, experimento 01: folha seccionada pela região mediana, experimento 02: folha não seccionada apenas com escarificações na região da nervura mediana, experimento 03: círculos foliares.