



INFLUÊNCIA DO TIPO DE EXPLANTE, DAS CONCENTRAÇÕES DE ZEATINA E DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO DO EXPLANTE A ESTE REGULADOR DE CRESCIMENTO NA REGENERAÇÃO DE BATATA (*Solanum tuberosum*) CV. MACACA

**BARBOSA, Leticia Mascarenhas Pereira¹; PETERS, José Antônio²;
DANIELOWSKI, Rodrigo; SILVA², Médelin Marques da¹; NORA, Leonardo¹**

¹Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial – FAEM/UFPEl

²Departamento de Botânica - Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas-IB/UFPEl
Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900. leticiampb@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A batata, além de ser uma cultura importante nutricionalmente, devido ao alto valor energético de seus tubérculos, produz alguns metabólitos secundários biologicamente ativos. Dentre estes, encontram-se as calisteginas, alcalóides nortropânicos poliidroxilados, descritos como potentes inibidores específicos de glicosidases, podendo, dessa forma, ter efeito benéfico no tratamento de doenças associadas ao metabolismo de carboidratos.

No entanto, a ação inibitória das calisteginas e suas funções biológicas e nutracêuticas não estão totalmente esclarecidas, uma vez que a reduzida concentração destes compostos em plantas dificulta a extração e a purificação das mesmas em quantidades suficientes para testes *in vitro* e *in vivo*. Além disto, a quantificação de calisteginas por cromatografia depende de padrões não disponíveis comercialmente (Drager, 2004).

Nestas circunstâncias, a obtenção de plantas geneticamente modificadas que, através do controle da expressão gênica, produzam calisteginas de forma diferenciada é um passo muito importante no desenvolvimento de modelos experimentais para o estudo destes metabólitos (Richter et al., 2005; Nora, 2006). Calisteginas têm sua rota metabólica relativamente bem conhecida e o gene chave (*tropinone reductase 2 – tr2*) envolvido em sua síntese já foi clonado em diversas plantas (Nora, 2006). Segundo Braga (2002), a batata (*Solanum tuberosum* L.) é uma planta ideal para transformação genética, devido à relativa facilidade de ser transformada, além de seu modo de propagação que permite uma expansão clonal dos transformantes. Porém, apesar de já haver protocolos estabelecidos para a regeneração de batata, em nosso estudo, existe grande dificuldade em regenerar os explantes transformados. Este fato pode estar associado a efeitos colaterais da transformação.

A morfogênese *in vitro* resulta de processos de competência, determinação e diferenciação celular. Estes processos são influenciados diretamente pelo meio de cultivo, pelo genótipo e pelo tipo e condições fisiológicas dos explantes (Braga, 2002; Litz, 1993). De acordo com Kerbauy (1999), alguns tecidos são mais

favoráveis à regeneração, podendo esta ser controlada através de combinações hormonais e de substratos diversos.

Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo verificar a influência do tipo de explante, das concentrações de zeatina e do tempo de exposição do explante a este regulador na regeneração de plantas de batata cv. Macaca.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Botânica, IB/UFPel. Foram utilizadas plantas de batata (*Solanum tuberosum*, cv. macaca) mantidas *in vitro* em sala de crescimento a 26 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 h e densidade de fluxo de fótons de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mediante subcultivos mensais em meio com sais e vitaminas de MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de 25 g L^{-1} de sacarose, 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 7 g L^{-1} de Ágar.

Como fontes de explantes, foram utilizados entrenós e secções foliares de plantas com 20 dias de cultivo. Os explantes foram transferidos para placas de Petri contendo 25 mL de meio MS com 25 g L^{-1} de sacarose e 100 mg L^{-1} mio-inositol, geleificado com 2.5 g L^{-1} de gelrite e acrescido de 0.05 mg L^{-1} de AIA, 3.0 mg L^{-1} de GA3 e zeatina nas concentrações de 2.0, 2.5 e 3.0 mg L^{-1} . As placas foram vedadas com filme plástico transparente de policloreto de vinila – PVC e acondicionadas em sala de crescimento. As culturas permaneceram neste meio por 14, 21 ou 30 dias de cultivo (Tabela 1). Ao final deste período, os meios eram renovados, sendo a concentração de zeatina modificada para 2.0 mg L^{-1} , até o final do experimento.

A unidade experimental consistiu em uma placa de Petri com 10 explantes cada. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 9 tratamentos para cada tipo de explante e 4 repetições por tratamento. Foi utilizado o teste F na análise de variância e o teste de Tukey na comparação de médias entre os tratamentos, ambos a 5 % de probabilidade.

Ao final do experimento (50 dias), foram feitas avaliações quanto à percentagem de explantes com brotações.

Tabela 1. Tratamentos combinando concentrações de zeatina e tempo de exposição do explante a este regulador de crescimento.

Tratamento	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Zeatina	2.0	2.0	2.0	2.5	2.5	2.5	3.0	3.0	3.0
Dias de exposição	14	21	30	14	21	30	14	21	30

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, a percentagem de regeneração de brotações foi influenciada pelo tipo de explante utilizado. Para todos os tratamentos realizados, a percentagem de regeneração (Figura 1) foi significativamente superior em explantes de entrenós, em relação aos explantes foliares. Resultados semelhantes foram obtidos por Torres et al. (2000 e 2003) e Wendt et al. (2001), em experimentos utilizando batatas das variedades macaca e baronesa. Além disso, a regeneração de brotações a partir de

entrenós formou pequena quantidade de calo, quando comparado aos explantes foliares, o que representa uma redução na possibilidade de variação somaclonal. Estes resultados qualificam entrenós como explantes ideais para experimentos de transformação genética.

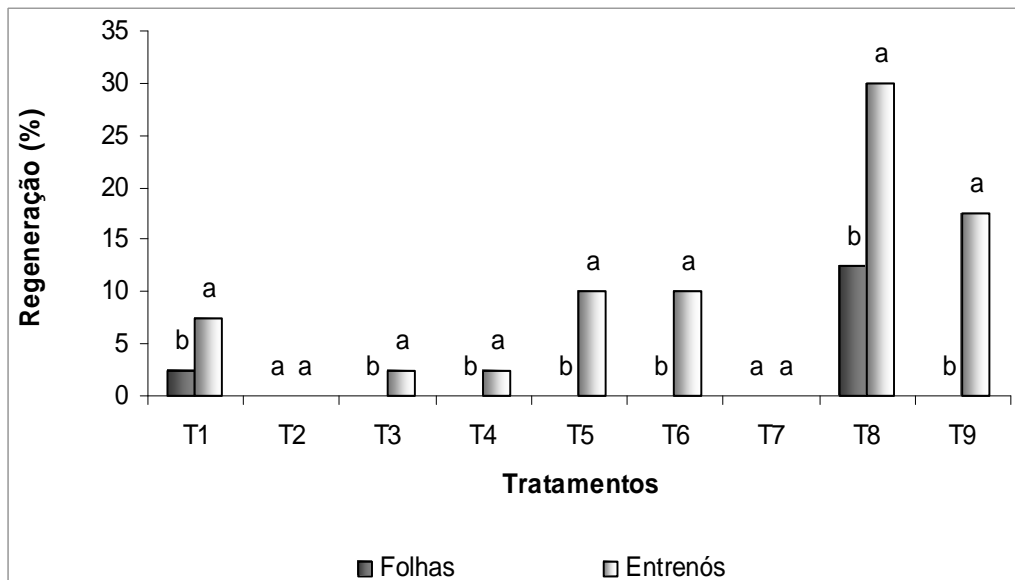


Figura 1. Regeneração de explantes de entrenós ou secções foliares de batata 'macaca' em diferentes concentrações de zeatina e tempos de exposição a esta concentração.

A influência das concentrações de zeatina e do tempo de exposição dos explantes de entrenós a esta concentração sobre a percentagem de regeneração pode ser observada na Tabela 2. Nos segmentos de entrenós, verificou-se diferença estatística significativa entre os tratamentos. A concentração de 3.0 mg L⁻¹ foi superior às demais utilizadas, sendo a maior percentagem de regeneração (30%) obtida ao se combinar esta concentração com a exposição dos explantes a este meio por 21 dias (Tratamento 8). O mesmo resultado foi observado nos explantes foliares, confirmando a superioridade deste tratamento em relação aos demais.

Tabela 2. Percentagem de regeneração de explantes de batata 'macaca' provenientes de entrenós em diferentes concentrações de zeatina e tempo de exposição a esta concentração.

Zeatina (mg L ⁻¹)	Percentagem de regeneração		
	15 dias	21 dias	30 dias
2.0	7.5 a A	0.0 c C	2.5 c B
2.5	2.5 a B	10.0 b A	10.0 b A
3.0	0.0 c C	30.0 a A	17.5 a B

Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente ao nível de 5%, pelo teste de Tukey.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, nas condições de cultivo testadas, conclui-se que:

- Explantes de segmentos de entrenós têm maior potencial de regeneração, quando comparados com explantes foliares, nas mesmas condições de cultivo;
- A percentagem de regeneração é superior quando os explantes são cultivados por 21 dias em meio contendo 3.0 mg L^{-1} de zeatina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAGA, E. J. B. **Microtuberização e transformação genética de batata (*Solanum tuberosum* L.), cv. macaca, com genes de resistência a fungos.** Pelotas, 2002. 91p. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal de Pelotas. 2002.

DRÄGER, B. Chemistry and biology of calystegines. **Natural Products Reports**, v.21, p.211-223, 2004.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1999. p. 519-531.

LITZ, R. E. Organogenesis and somatic embryogenesis. **Acta Horticulturae**, v.336, p. 199-205, 1993.

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

NORA, L. **A virus-based transgenic approach to engineer the production of tropane alkaloids and calystegines in *Hyoscyamus muticus* plants** (PhD). John Innes Centre - Department of Cell and Developmental Biology. University of East Anglia, Norwich, UK. 280 pp, 2006.

RICHTER, U.; ROTHE, G.; FABIAN, A. K.; RAHFELD, B.; DRÄGER, B. Overexpression of tropinone reductases alters alkaloid composition in *Atropa belladonna* root cultures. **Journal of Experimental Botany**, 56, 645-652. 2005.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; ROMANO, E.; CATTONY, M. K. NASCIMENTO, A. S. Transformação genética da batata cultivar Achat via *Agrobacterium tumefaciens*. **Horticultura Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 41-45, 2000.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; WIDHOLZER, C. F. N.; ROMANO, E.; PETERS, J. A. Expressão eficiente do gene reporter b-glucuronidase nos tecidos vasculares de batata (*Solanum tuberosum* L.) utilizando de um promotor específico (BRA3) de *Agrobacterium rhizogenes*. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 176-179, 2003.

WENDT, S. N.; PETERS, J. A.; OLIVEIRA, A. C.; BOBROWSKI, V. L.; CÁPPIO, F. L.; MADRUGA, C. S.; VIGHI, I. L. Plant Regeneration and Molecular Characterization of Potato Cultivar Macaca, Obtained from Gamma-Irradiated Explants. **Journal of seed news**, v. 3, n. 2, p. 17-37, 2001.