

XVII Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS

Sistemas de desinfestação *In vitro* e transformação via *A. rhizogenes* em espécies do gênero *Solanum* visando a produção de glicoalcalóides.



Montezano, Débora Goulart¹; Andrade, Luciana Bavaresco¹; Echeverrigaray, Sergio Laguna¹

¹Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada – Instituto de Biotecnologia

Universidade de Caxias do Sul; Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130; Cep 95001-970; Caxias do Sul, RS, Brasil

deiagm@gmail.com



INTRODUÇÃO



Plantas do gênero *Solanum* são conhecidas produtoras de alcalóides esteroidais e glicoalcalóides, tais como solasodina, solanina, tomatina entre outros. Estes compostos tem sido utilizados como precursores na produção de hormônios esteroidais pela indústria farmacêutica. O tipo de alcalóide esteroidal assim como a concentração desses alcalóides, pode variar significativamente entre espécies distintas dentro do gênero *Solanum*. As espécies nativas *S. pseudocapsicum*, *S. paranense* e *S. guaranitica x paniculatum*, aparecem como opções na produção desses compostos.

O cultivo *in vitro* e a utilização de raízes transformadas, são alternativas para o estudo e incremento na obtenção desses alcalóides, promovendo novos recursos para o processo comercial de plantas e seus compostos químicos secundários. Com o cultivo *in vitro*, os fatores bióticos são controlados e podemos avaliar a produção real desses compostos além de propiciarmos as condições básicas para a infecção por *Agrobacterium*.

A introdução de espécies coletadas na natureza ao cultivo *in vitro*, é considerada uma das fases críticas da cultura de tecidos vegetais. O desafio é estabelecer um protocolo que consiga eliminar os patógenos vegetais sem danificar a planta.



OBJETIVO

Desenvolver sistemas de desinfestação para introdução das espécies *S. pseudocapsicum*, *S. paranense* e *S. guaranitica x paniculatum* ao cultivo *in vitro* assim como a transformação genética via *A. rhizogenes* visando a produção de glicoalcalóides.

MATERIAIS E MÉTODOS

1) Material Vegetal:

Para a introdução das espécies em estudo no cultivo *in vitro* foram utilizados como explantes de entre-nós, foliares e sementes das espécies em estudo, às quais foram coletadas nos municípios de Caxias do Sul e Cruzeiro do sul.

2) Sistema de desinfestação dos explantes:

Para todos os ensaios de desinfestação os explantes foram imersos em etanol 70%, e após em hipoclorito de sódio 1/3 sob agitação constante seguidos de 3 lavagens com água destilada autoclavada.

Foram testadas diferentes concentrações do fungicida Folicur® (0,5 e 0,25ml/L) nas pré-lavagens e no meio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962).

Diluições do meio de cultivo MS (MS1/2, MS1/4) foram testadas comparando-as com o meio ágar-água.

No meio de cultivo foi acrescida a citocinina belziladenina (BA) na concentração de 0,5 mg/L e o antioxidante PVP-K30 (0,5M) e Nistatina.

3) Ensaios de transformação:

As plântulas obtidas na germinação das sementes de *S. pseudocapsicum* foram repicadas e utilizadas como explantes para ensaio de transformação. Para tanto foram utilizados 80 segmentos caulinares invertidos e inoculados em meio ágar-água 40 explantes serviram como controle e 40 foram infectados com *A. rhizogenes* ATCC15834. Após 48h os explantes foram repassados para meio MS com adição de Claforam (200mg/ml) permanecendo por 40 dias no escuro em sala de crescimento a 25 ± 2 °C. Avaliações de taxas de transformação foram realizadas após esse período.

4) Ensaio de desenvolvimento de raízes transformadas:

Raízes transformadas de *S. pseudocapsicum* foram isoladas e identificadas como eventos independentes de transformação. Após, foi selecionado o evento que manteve o maior crescimento *in vitro* e do mesmo foi realizado ensaio com a combinação de diferentes diluições do meio MS (MS; MS 1/2 e MS 1/4) com a auxina AIA (0 e 0,1mg/L) em presença e ausência do antioxidante PVP na concentração de 0,5M.

Pontas de raiz com 0,3 cm de comprimento foram os explantes utilizados para realização desse experimento. Forma inoculadas em placa de Petri cinco raízes por placa, totalizando 15 raízes por tratamento. O experimento foi conduzido em ausência de luz sob temperatura controlada de 25 ± 2 °C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1) Desinfestação:

A ausência do fungicida Folicur causou 100% de contaminação em estacas foliares e entrenós.

Dosagens de 0,5 ml/L de fungicida foram tóxicas tanto para entrenós como para os explantes foliares. A redução para 0,25ml/L causou necrose apenas nos explantes foliares. Entrenós foram mantidos em meio de cultivo não desenvolvendo gemas laterais.

Sementes das espécies em estudo foram germinadas *in vitro*. Taxas de germinação variaram conforme a espécie e o tratamento testado (Quadro 1; Figuras 1 e 2).

Quadro 1: Porcentagem de germinação *in vitro* de sementes das espécies do gênero *Solanum*

| Meio de cultura | BA (mg/L) | <i>S.pseudocapsicum</i> | <i>S. paranense</i> | <i>S.guaranitica</i> |
|-----------------|-----------|-------------------------|---------------------|----------------------|
| MS | 0 | 85 | - | - |
| | 0,5 | 25 | - | - |
| | 1,0 | 5 | 22 | - |

2) Transformação

A taxa de transformação em *S. pseudocapsicum* foi de 45% (Figura 3.). Foi realizado o ensaio de desenvolvimento de raízes com o intuito de estimular o crescimento e diminuir a oxidação, visto que as mesmas, apresentavam-se com aspecto engrossado e crescimento lento. Os melhores resultados foram obtidos nas diluições do meio MS em presença de AIA independente da presença de PVP (Quadro 2), sendo o melhor resultado em MS1/2 acrescido de AIA e PVP.

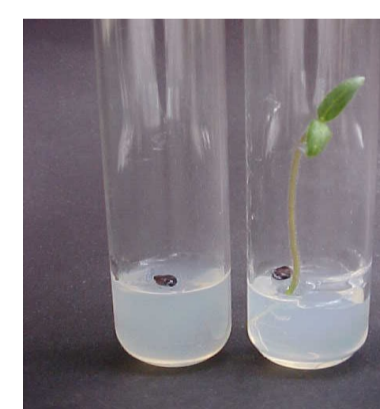


Figura 1. Germinação de sementes de *S. pseudocapsicum*.



Figura 2. Plântulas *in vitro* de germinação de sementes de *S. pseudocapsicum*.



Figura 3. Raízes transformadas em *S.pseudocapsicum*

Tabela 2: Resposta média do desenvolvimento de raízes transformadas (cm) de *Solanum pseudocapsicum* à diferentes concentrações de meio MS, auxina AIA em presença ou ausência de antioxidante.

| AIA (mg/L) | PVP (M) | MS | MS1/2 | MS1/4 |
|------------|---------|-------------|-------------|-------------|
| 0 | 0 | 0,37 ± 0,08 | 0,38 ± 0,07 | 0,46 ± 0,20 |
| | 0,5 | 0,32 ± 0,08 | 0,30 ± 0,00 | 0,34 ± 0,06 |
| 0,1 | 0 | 0,35 ± 0,08 | 0,39 ± 0,07 | 0,64 ± 0,11 |
| | 0,5 | 0,35 ± 0,08 | 2,35 ± 0,64 | 0,74 ± 0,18 |

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente de acordo com o Teste de Tukey a P < 0,05.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As espécies testadas apresentaram resposta variável aos sistemas de desinfestação testados. Da mesma forma, as taxas de germinação variaram entre espécies. A utilização de diluições do meio MS, presença de PVP e adição de auxinas, não levaram a modificações importantes no desenvolvimento de raízes transformantes de *S. pseudocapsicum*, sendo necessária a realização de novos testes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS