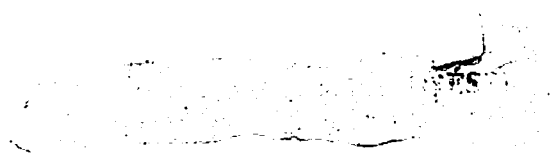


**UTILIZAÇÃO DE ANTICORPOS PARA CARACTERIZAÇÃO DA
SÍNTESE DE ESPORAMINA EM DIFERENTES TECIDOS DE *Ipomoea*
batatas OBTIDOS DE PLANTAS CULTIVADAS *in vivo* E *in vitro***

MÁRCIA MARTINS

1997



005



MÁRCIA MARTINS

**UTILIZAÇÃO DE ANTICORPOS PARA CARACTERIZAÇÃO DA
SÍNTESE DE ESPORAMINA EM DIFERENTES TECIDOS DE *Ipomoea*
batatas OBTIDOS DE PLANTAS CULTIVADAS *in vivo* E *in vitro***

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Lavras como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre na área de Fisiologia Vegetal.

Orientador

Prof. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

EMBR
2013/03/03
div ni ovit
ni II. 251v

UFLA

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1997

MINAS GERAIS - BRASIL

MÁRCIA MARTINS

**UTILIZAÇÃO DE ANTICORPOS PARA CARACTERIZAÇÃO DA
SÍNTESE DE ESPORAMINA EM DIFERENTES TECIDOS DE *Ipomoea*
batatas OBTIDOS DE PLANTAS CULTIVADAS *in vivo* E *in vitro***

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Lavras como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre na área de Fisiologia Vegetal.

APROVADA em 19 de dezembro de 1997

Dr. Edilson Paiva

EMBRAPA

Dra. Maria das Graças Cardoso

UFLA


Dr. JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO

UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Dedico,

**Ao grande companheiro
ALEXANDRE GONÇALVES
e a nosso querido filho DANIEL**

A meus pais.

AGRADECIMENTOS

A todos que de uma forma ou outra contribuíram para realização deste trabalho.

Ao Alexandre pelos momentos em que soube ser pai e mãe ao mesmo tempo, e ao pequeno Daniel pelas tantas horas de minha ausência.

A meus pais, José e Myltes, e a meus sogros, Roberto e Rita, pela presença marcante nos momentos difíceis e também nos momentos felizes.

Ao Dr. José Eduardo e Dr. Edilson Paiva, pela orientação profissional - científica.

Ao CNPq pela bolsa recebida.

A EMBRAPA - CNPMS (Núcleo de Biologia Aplicada) pela oportunidade de aprendizado e desenvolvimento de parte deste trabalho.

A amiga Ilka, pelo apoio e sugestões.

A todo pessoal do Laboratório de Biologia Molecular / EMBRAPA, entre eles Vanessa, Douglas, Paulo, Beth e Edna, pela animação e paciência. E ao grande MIGUEL, que sem a sua ajuda e estímulo este trabalho ainda estaria em andamento.

A Universidade Federal de Lavras, especificamente ao departamento de Biologia/Fisiologia Vegetal e departamento de Agricultura.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos (UFLA), Evaldo, Vantuil, Cláudio e Fátima.

Aos amigos de curso (Fisiologia Vegetal) Lucivane, Gidelma, André (*in memorian*), Vespasiano, Vilma, Marlos, Marcel, Paulino, Laura, Jeferson, Ana Cardoso, Josirley.

A Alessandro Vanini (Barbacena), Luiz Augusto (Guto), Ricardo (Crava's), Luiz (Guagua), Vagner (Fornalha), Luíza (Lulu) e Reginaldo (Régis), pelos momentos de descontração e de grande amizade.

“Uma notícia tá chegando lá do Maranhão
Não deu no rádio, no jornal ou na televisão
Veio no vento que soprava lá no litoral
De Fortaleza, de Recife e de Natal
A boa nova foi ouvida em Belém, Manaus
João Pessoa, Teresina e Aracaju
E lá no norte foi descendo pro Brasil central
Chegou em Minas, já bateu bem lá no sul
Aqui vive um povo que merece mais respeito, sabe?
E belo é o povo como é belo todo amor
Aqui vive um povo que é mar e que é rio
E seu destino é um dia se juntar
O canto mais belo será sempre mais sincero, sabe?
E tudo quanto é belo será sempre de espantar
Aqui vive um povo que cultiva a qualidade
Ser mais sábio que quem o quer governar
A novidade é que o Brasil não é só litoral
É muito mais, é muito mais que qualquer zona sul
Tem gente boa espalhada por esse Brasil
Que vai fazer deste lugar um bom país
Uma notícia tá chegando lá do interior
Não deu no rádio, no jornal ou na televisão
Ficar de frente para o mar, de costas pro Brasil
Não vai fazer desse lugar um bom país”

(Milton Nascimento/Fernando Brant)

LISTA DE ABREVIATURAS

AIB: Ácido indol butírico

ANA: Ácido naftaleno acético

BAP: Benzil aminopurina

CCC: Cloreto de 2-cloroetilamônio

EST: Estruturas semelhantes a tubérculos com proeminente crescimento secundário formadas no sistema radicular de plântulas de batata-doce *in vitro*

JA: Ácido jasmônico

JA-ME: Metil jasmonato

KIN: 6-furfurilamino-purina (cinetina)

MICROTUBÉRCULOS: Raizes tuberosas produzidas *in vitro*

MS: Meio de Murashige e Skoog (1962)

PLÂNTULA: Plantas obtidas em cultura *in vitro*

rpm: Rotações por minuto

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida com sódio duodecil sulfato

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A Cultura.....	1
1.2 Valor Protéico, Energético, Nutricional e Medicinal.....	2
1.3 Doenças.....	4
1.4 Propagação.....	5
1.5 Proteína de Reserva em <i>Ipomoea batatas</i> , Esporamina.....	6
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	8
2.1 Métodos de fracionamento de proteínas.....	8
2.1.1 Eletroforese.....	8
2.1.2 Cromatografia de troca iônica e de exclusão (filtração).....	11
2.2 Imunologia.....	14
2.3 Imunotestes.....	20
2.4 A Esporamina.....	21
2.4.1 Purificação da Esporamina.....	23
2.5 Promotores da Tuberização.....	24
3 OBJETIVOS.....	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 Extração da proteína total.....	32
4.2 Purificação da esporamina.....	32

4.2.1 Purificação através de coluna cromatográfica de exclusão.....	32
4.2.2 Purificação através de coluna cromatográfica de troca iônica.....	33
4.2.3 Purificação da esporamina através de coluna cromatográfica de troca iônica e de exclusão.....	34
4.3 Produção de Anticorpos.....	34
4.3.1 Produção de anticorpo contra a proteína total.....	34
4.3.2 Produção de Anticorpo contra a Esporamina.....	35
4.4 Testes de Imunodifusão.....	35
4.5 Testes de Imunoeletroforese.....	36
4.6 Produção de Raízes Tuberosas in vivo, em casa de vegetação.....	37
4.7 Variação na Concentração de Sacarose do Meio de Cultura in vitro....	38
4.8 Utilização de ácido jasmônico em segmentos nodais de Ipomoea batatas.....	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1 Purificação da esporamina através de coluna cromatográfica de exclusão.....	41
5.2 Purificação da Esporamina através de Coluna Cromatográfica de Troca Iônica.....	42
5.3 Purificação da esporamina através de coluna cromatográfica de troca iônica e de exclusão.....	45
5.4 Produção de Anticorpos.....	47
5.5 Produção de Raízes Tuberosas in vivo, em casa de vegetação.....	48
5.6 Efeito da concentração de sacarose na indução de esporamina.....	56
5.7 Efeito do ácido jasmônico no crescimento de plântulas de batata doce.	59
6 CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

RESUMO

MARTINS, Márcia. Utilização de anticorpos para caracterização imunológica da síntese de esporamina em diferentes tecidos de *Ipomoea batatas* obtidos de plantas cultivadas *in vivo* e *in vitro*. Lavras: UFLA, 1997. 71p. (Dissertação-Mestrado em Fisiologia Vegetal)

Estudou-se a caracterização imunológica da síntese de esporamina (proteína específica de *Ipomoea batatas*) em diferentes tecidos da planta de *I. batatas*, obtidos de cultivos *in vivo* e *in vitro*. A síntese da esporamina foi diagnosticada através de imunotestes realizados com anticorpos produzidos contra essa proteína. Os anticorpos contra a esporamina foram obtidos a partir da aplicação em coelhos da esporamina pura (antígeno). Essa proteína foi purificada por cromatografia de troca iônica, utilizando-se a resina DEAE-celulose trocadora de ânions. Anticorpos contra a proteína total de *Ipomoea batatas* também foram produzidos em coelhos, utilizando o extrato bruto da proteína total como antígeno. Afim de obter a microtuberização da referida espécie, para posterior caracterização imunológica da esporamina, testou-se vários reguladores de crescimento, diferentes concentrações de sacarose, em plantas pré-estabelecidas *in vitro* e em folhas enraizadas em casa de vegetação (*in vivo*). Não foi constatada a formação de raízes tuberosas *in vitro*. Porém, em segmentos nodais, submetidos a meio de cultura MS suplementados com 20 mg de ácido jasmônico por litro tiveram um bom crescimento e desenvolvimento das gemas em plântulas, fato que se repetiu no tratamento sem ácido jasmônico. Nas folhas enraizadas em casa de vegetação, constatou-se a formação de raízes expandidas (semelhantes a raízes tuberosas de plantas cultivadas em campo) no tratamento em que os pecíolos foram diretamente colocados em areia úmida (imediatamente após coletar, no campo, folhas de plantas de batata doce em processo de indução de tuberização). Quanto a caracterização imunológica da esporamina, pode-se confirmar (a partir de testes de imunodifusão) que essa proteína não é específica de raízes tuberosas de *Ipomoea batatas*. Sendo localizada, na maioria das vezes,

Comitê Orientador: José Eduardo B. P. Pinto - UFLA (Orientador), Edilson Paiva - EMBRAPA e Maria das Graças Cardoso - UFLA.

em caules e sistemas radiculares de plântulas submetidas ou não ao meio de cultura contendo sacarose e também em diferentes tecidos retirados das folhas enraizadas em casa de vegetação e de plantas cultivadas em campo. A presença ou não da esporamina em diferentes partes da plântula varia conforme o tratamento utilizado. A síntese de esporamina em diferentes tecidos de *I. batatas* pode estar correlacionada com o estágio fisiológico da planta (em processo de indução de tuberização ou não).

ABSTRACT

UTILIZATION OF ANTIBODIES FOR IMMUNOLOGICAL CHARACTERIZATION OF SYNTHESIS OF SPORAMIN IN DIFFERENT FIBERS OF *ipomoea batatas* Obtained From Plants Cultivated *in vitro* AND *in vivo*.

Immunological characterization of synthesis of sporamin (specific protein of *ipomoea batatas*) in different fibers of the plant of *I. batatas*, obtained from the cultures *in vitro* and *in vivo*, was studied. The synthesis of sporamin was diagnosed by the immunological tests realized with the antibodies produced against this protein. The antibodies against sporamin were obtained beginning the application in rabbits with pure sporamin (antigen). This protein was purified by the ion exchange chromatography, utilizing DEAE-cellulose resin as the ion exchanger. Antibodies against total protein of *ipomoea batatas* also were produced in rabbits utilizing the raw extract of total protein as antigen. In order to obtain microtuberization of the referred species for posterior immunological characterization of sporamin, various growth regulators and different concentrations of saccharose were tested in pre-established plants *in vitro* and leaves radicated in greenhouse (*in vivo*). The formation of tuberose roots *in vitro* was not evidenced. However, in the nodal segments submitted to culture medium MS, supplemented with 20 mg of jasmonic acid per liter, there was a good growth and development of buds/germs in the plantules, with the fact that the same repeated itself in the treatment without jasmonic acid. In the leaves radicated in greenhouse, formation of expanded roots (similar to tuberose roots of the plants cultivated in field) was evidenced in the treatment in which the petioles were directly placed in wet sand (immediately after harvesting in field the leaves of sweet potato plant in the process of inducing tuberization). Like the immunological characterization of sporamin, it could be confirmed (beginning the immuno-diffusion tests) that this protein was not specific to tuberose roots of

Guidance Committee: José Eduardo B. P. Pinto - UFLA (Major Professor), Edilson Paiva - EMBRAPA and Maria das Graças Cardoso - UFLA.

ipomoea batatas. In most cases it was localized in stems and radicular systems of the plantules submitted or not to the culture medium containing saccharose and also in different fibers removed from the leaves radicated in greenhouse and from the plants cultivated in field. The presence or absence of sporamin in different parts of the plantule varied in accordance with the treatment utilized. The synthesis of sporamin in different fibers of *I. Batatas* could be correlated with the physiological stage of the plant (in the process of inducing tuberization or not).

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Cultura

A batata doce (*Ipomoea batatas* L. Poir.) é uma dicotiledônea da família Convolvulaceae, ordem Solanales (Cronquist, 1988), que apresenta consistência herbácea e embora seja perene, é cultivada como anual. Seu hábito de crescimento é predominantemente decumbente, crescendo rápido e horizontalmente sobre o solo, há também cultivares de porte ereto e semiereto (Folquer, 1978; Hauman, 1992).

No Brasil a batata-doce ocupa a quarta posição entre as hortaliças, atingindo uma produção anual de 682.000 ton., inferior somente ao tomate, batata inglesa e cebola. Porém, quando se considera a área plantada, a cultura da batata-doce ocupa a terceira posição, inferior somente à batata inglesa e cebola. No país, os maiores produtores são os Estados da região Sul, sendo o Rio Grande do Sul o maior produtor, seguido de Santa Catarina e Paraná (Anuário... 1991; citado por Figueiredo, 1995).

A cultura encontra-se adaptada a uma ampla faixa de condições edafoclimáticas. Normalmente cultiva-se entre 40° N e 32° S e até 3.000 m de altitude; porém um melhor rendimento se obtém em regiões com uma temperatura média de 23,8° C ou mais, uma distribuição de chuvas durante o ano com uma média de 600-1.200 mm e abundância de sol. Um período de 4-6 meses é essencial para atingir-se o máximo rendimento de raízes na maioria das variedades (Henderson et al, 1984; citado por Paredes, 1995). Em condições agrônômicas de países do terceiro mundo, ainda que isto esteja fortemente

condicionado pela variedade, os rendimentos em raízes frescas oscilam em 5 a 18 t/ha (Horton et al, 1989).

Folquer (1978) estudando batata-doce, afirma que os elementos climáticos que estimulam o crescimento vegetativo são fotoperíodo longo, alta luminosidade e temperatura, enquanto que os elementos climáticos que estimulam a tuberação são fotoperíodo curto, baixa luminosidade e temperatura.

Raízes tuberosas de batata-doce são raízes especializadas que diferenciam-se em órgãos de armazenamento devido a rápida expansão e alta taxa de acúmulo de amido (Hattori et al, 1985). Do ponto de vista anatômico, uma raiz tuberosa pode ser definida como sendo órgão que perdeu sua polaridade de crescimento mudando de longitudinal para radial, sendo necessário para que o órgão apresente crescimento secundário. Este mecanismo pode ocorrer em raízes de dicotiledôneas e de gimnospermas, raramente em monocotiledôneas, período no qual é formado o meristema secundário (câmbio vascular) que dará origem ao floema e xilema, também secundários (Esau, 1976; Cutter, 1987; Fahn, 1990).

1.2 Valor Protéico, Energético, Nutricional e Medicinal

Entre as dez culturas alimentícias com os mais altos valores nutricionais nos países do terceiro mundo (1981/83), a batata-doce alcança uma produção em matéria seca de 31 milhões de toneladas (3,6% do total) uma energia comestível de 99×10^{12} Kcal (3,9% do total) o que mostra claramente que a batata-doce é uma boa fonte de alimento energético e, apesar de seu conteúdo protéico ser relativamente baixo, a qualidade dessa proteína é extraordinariamente alta (Horton et al., 1989). A média de proteína bruta contida na raiz tuberosa de batata doce está em torno de 6 % (em base do peso seco) e cerca de 80 % da proteína solúvel total é caracterizada por um grupo de proteínas (esporamina) com peso molecular aparente de 25 Kd (Maeshima, Sasaki e Asaki, 1985).

Com referência à produção de energia ingerível, proteínas e vitaminas por hectare, a batata-doce ocupa atualmente o primeiro lugar entre as principais culturas alimentícias do terceiro mundo, pois produz 4,0 t/ha de matéria seca, $12,6 \times 10^6$ Kcal/ha de energia comestível e 187 Kg/ha de proteína comestível. Os valores de matéria seca e energia comestível superam amplamente aqueles da batata, inhame e mandioca, e com exceção da mandioca, cujo o valor é muito inferior, os valores de proteína comestível são muito similares aos da batata e inhame. Por outro lado, a batata-doce produz a mais alta taxa de energia comestível por hectare/dia, acima de qualquer das principais culturas, apesar de ter um ciclo comparativamente mais longo (Horton et al., 1989).

Em termos de valor nutricional, a batata-doce produz dois tipos úteis de alimento na mesma planta: as raízes de reserva e a folhagem. De fato, a folhagem é melhor fonte de proteína de alta qualidade que as raízes. Em média a folhagem contém o dobro do nível de proteína em termos de peso fresco. Em 100 g da porção comestível de raízes fervidas, sem incluir a casca, encontra-se 1,7 g de proteína, teor que apesar de relativamente baixo, é de muito boa qualidade, ainda que carente de lisina e aminoácidos sulfurados. Entre os componentes dos carboidratos temos amido, açúcares e um grupo genericamente denominado de "fibra". O amido é o maior e mais importante componente nas raízes frescas e é composto por 70 % de amilopectina e 30 % de amilose. O maior componente dos açúcares é a sacarose nas raízes frescas e a maltose nas raízes fervidas. As vitaminas estão presentes em quantidades moderadas, sendo a vitamina A aquela que se encontra em maior quantidade devido ao alto conteúdo de carotenóides da pró-vitamina A nas raízes tuberosas da batata doce. É também uma fonte importante de vitamina C (ácido ascórbico) atingindo um valor de 49 % de acordo com os índices de dieta diária recomendada. A batata-doce tem quantidades pequenas de várias das vitaminas do grupo B, incluindo niacina,

piridoxina, ácido fólico e riboflavina. Os minerais encontram-se presentes em concentrações variáveis dependendo da variedade: entre eles o ferro (0,7 mg/100g) e o potássio (243 mg/100g) (Collins, 1988; Horton, Prain e Gregory, 1989).

Algumas espécies de *Ipomoea* têm importante valor medicinal. Dentre elas, *Ipomoea orizabensis* ou *Ipomoea violacea* e *Ipomoea rubrocoerulea* Praecox são consideradas como narcóticos indutores de alucinação e catárticos. A espécie *I. purga*, também conhecida como *Exogonium purga* e *E. jalopa*, produz um composto chamado jalopa que consiste de uma resina, goma e açúcar. As referidas espécies (*I. orizabensis*, *I. rubrocoerulea* e *I. purga*) tem sido utilizadas como catárticos, por possuírem altas concentrações de um princípio ativo (heterosídeo) que aumenta a permeabilidade da membrana celular das células intestinais (Merck Index, 1968; citado por Sharp et al., 1984). Sobre a espécie *Ipomoea batatas* pouco se sabe em relação aos produtos do metabolismo secundário, porém nos vacúolos de culturas *in vitro* dessa espécie foi comprovada a presença de ácido isoclorogênico em altas concentrações (Sharp et al., 1984).

Em virtude desta espécie apresentar uma elevada rusticidade e amplo espectro de potencialidade de uso (alimentação humana e animal, medicinal, entre outros), a batata-doce apresenta-se como espécie de grande interesse sócio-econômico, principalmente para países em desenvolvimento e com escassez de alimento para a população (Figueiredo, 1995).

1.3 Doenças

A maioria das doenças da batata-doce causadas por bactérias e fungos são conhecidas há quase 100 anos. A importância destas doenças depende do tipo de sistema de produção agrícola (semente, estaca ou semente-raiz) e do interesse de utilização da planta, seja estacas e folhagens, ou raízes. Ambos agentes afetam

a produção de raízes, qualidade do produto, vida de armazenamento e valor nutricional. Os fungos em particular podem induzir nas raízes a produção de furanoterpenóides, compostos considerados tóxicos para os animais (Clark, 1988).

As doenças virais também afetam gravemente a produção de batata-doce, mais ainda quando o sistema de propagação da espécie é através de estacas e raízes, e os patógenos virais são geralmente transmitidos por vetores móveis como afídeos e moscas brancas (CIP, 1992; citado por Paredes, 1995).

1.4 Propagação

Com relação à propagação da batata-doce, o método tradicionalmente utilizado é o vegetativo por meio das ramas ou raízes tuberosas (Folquer, 1978). Porém, segundo Silva, Souza e Paz (1991) e Sihachakr (1981), este último método de propagação apresenta alguns inconvenientes. Por exemplo, a dificuldade de conservação das raízes tuberosas e de sua propagação faz com que os plantios sejam realizados preferencialmente a partir das ramas. Uma baixa produtividade pode ocorrer devido a existência de grande heterogeneidade nas plantações e a presença de numerosos agentes patogênicos como no caso de determinadas viroses, afetam os rendimentos da produção e podem até levar a extinção de variedades selecionadas.

Para contornar estes problemas tem sido utilizado técnicas de cultura de tecidos. De modo semelhante a muitas espécies de importância econômica, os primeiros esforços realizados em cultura de tecidos da batata-doce foram com a cultura de meristemas, ápices e segmentos nodais. Mediante este processo foi possível a erradicação de diversos patógenos sistêmicos, a propagação clonal massiva e rápida, e a conservação e intercâmbio internacional de germoplasma,

assim como o estudo de alguns eventos fisiológicos e nutricionais (Paredes, 1995).

Entretanto, Mantell e Hugo (1989) enfatizam a necessidade de condições adequadas e de pessoas habilitadas na transferência de plântulas da condição *in vitro* para o campo, principalmente em países tropicais onde esta cultura é socialmente mais importante. Isto porque a taxa de sobrevivência de plântulas *in vitro* durante o seu intercâmbio depende do período e das condições de transporte, bem como do manuseio durante o processo de aclimação dessas plântulas, que é trabalhoso e apresenta, em alguns casos, elevadas taxas de perda. Além dessas condições desfavoráveis, o longo período no escuro durante o transporte normalmente promove a degenerescência do material *in vitro* (Estrada, Tovar e Dodds, 1986; Ng, 1988). Por outro lado, raízes tuberosas poderiam ser produzidas *in vitro*, com a finalidade de serem utilizadas para a conservação de diferentes genótipos em bancos de germoplasma e intercâmbio. Tem sido verificado que essas são menos vulneráveis aos fatores que afetam as plântulas *in vitro*, além de poderem ser facilmente transplantadas e estabelecidas *in vitro* (Wang e Hu, 1982; Figueiredo, 1995).

Dessa forma, a produção de raízes tuberosas de batata-doce *in vitro* apresenta-se como técnica alternativa de propagação e de conservação desta espécie, além de possibilitar o estudo dos fatores que afetam fisiologicamente o processo de formação de raízes tuberosas (Figueiredo, 1995).

1.5 Proteína de Reserva em *Ipomoea batatas*, Esporamina

O estudo de proteínas armazenadas em sementes vêm atraindo a atenção de diversos pesquisadores há muito tempo, devido à sua importância para a alimentação humana e animal, bem como fonte de nitrogênio e aminoácidos para o desenvolvimento dos próprios eixos embrionários da respectiva espécie.

Atualmente, este mesmo tipo de estudo tem sido realizado para as proteínas armazenadas em tubérculos de algumas espécies que os possuem como órgãos de reserva e propagação, sendo mais profusamente estudado em tubérculos de plantas do gênero *Solanum* (Paiva, Lister e Park, 1983).

Tubérculos de *Solanum tuberosum* (caule modificado) bem como raízes tuberosas de *Ipomoea batatas* desenvolvem-se como órgãos de reserva acumulando grandes quantidades de carboidratos durante o desenvolvimento da cultura. Concomitantemente ocorre o acúmulo de quantidades significativas de proteínas específicas de tubérculos durante a tuberização, as quais funcionam como proteínas de reserva que são utilizadas juntamente com os carboidratos durante a propagação vegetativa dessas espécies (Figueiredo, 1995). Em *Ipomoea batatas*, Maeshima, Sasaki e Asahi (1985) identificaram uma proteína, a esporamina, que representa de 60 a 80 % do total de proteínas solúveis nas raízes tuberosas de batata-doce. Em pecíolos e folhas essa proteína não é encontrada ou é em quantidades ínfimas (Hattori, Nakagawa e Nakamura, 1990). Não se pode afirmar que a presença de esporamina esteja relacionada exclusivamente com a tuberização desta espécie, uma vez que Hattori et al. (1991) verificou que sua expressão pode ser induzida em condições *in vitro* pela sacarose.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Métodos de fracionamento de proteínas

Os métodos de fracionamento de proteínas consideram as propriedades de cargas, tamanho e solubilidade, que variam de uma proteína para outra. A maior quantidade de proteínas está presente em células de tecidos ou microrganismos. Rompendo-se as células, as proteínas são liberadas para uma determinada solução tampão (extrato bruto). Vários métodos podem ser utilizados para o fracionamento de proteínas do extrato bruto, dentre eles a: eletroforese, cromatografia de troca iônica e cromatografia de exclusão (filtração) (Rossomando, 1990).

2.1.1 Eletroforese

É uma técnica que se baseia na migração de moléculas ionizadas, de acordo com suas cargas elétricas e pesos moleculares, quando a estas é aplicado um campo elétrico. Por força desse campo elétrico, moléculas carregadas da amostra com carga negativa migram para o pólo positivo (ânodo) e moléculas com carga positiva migram para o pólo negativo (cátodo), em diferentes velocidades, de acordo com suas respectivas quantidades de carga líquida e tamanho. A carga líquida das moléculas de proteínas é a função somatória dos aminoácidos que as constituem (Alfenas, 1991). Os movimentos das moléculas são retardados pela interação com a matriz gélica, atuando como uma peneira molecular, resultando numa migração diferencial dos constituintes protéicos da amostra (Garfin, 1990-a).

Durante a eletroforese, existe uma força (F) que atua sobre a molécula de proteína, que a faz migrar. Contra essa força F , existe uma força f que opõe à migração da molécula. Quando a força f se iguala à força F ($F=f$), a molécula de proteína deixa de migrar. Como cada molécula possui a sua própria carga e seu próprio peso molecular, então cada proteína vai se concentrar numa determinada faixa (banda) (Alfenas, 1991).

As proteínas são substâncias anfóteras capazes de adquirir carga positiva ou negativa em função do pH. Portanto, deve-se manter o pH do meio constante, durante a eletroforese, através do uso de tampões (Alfenas, 1991).

Os locais onde a eletroforese pode ser conduzida são: solução com gradiente de densidade; papel de filtro; sílica gel; membranas de acetato de celulose; gel de agarose, amido ou de poliacrilamida, entre outros. Há um requisito para que um substrato seja utilizado como suporte, como ser química e fisicamente inerte, de modo a não interferir na mobilidade das moléculas. O mais importante na escolha do meio-suporte é o seu poder de resolução. A escolha do meio-suporte depende dos objetivos do estudo. De modo geral, para proteínas, géis de poliacrilamida tem sido preferido por apresentarem um maior poder de resolução e permitem uma ampla variação de diâmetro de seus poros (o diâmetro dos poros do gel é inversamente proporcional à concentração de acrilamida), além de serem altamente translúcidos. Entretanto, esses géis apresentam a desvantagem de sua porosidade ser menos controlável (Alfenas, 1991).

As variações básicas da técnica de eletroforese de proteínas, podem ser divididas em sistema contínuo ou descontínuo de eletroforese em géis de poliacrilamida (PAGE) ou sistema desnaturante contínuo ou descontínuo de eletroforese em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE). O sistema contínuo refere-se à utilização de apenas um tampão, de pH ajustado, no circuito eletroforético e de apenas uma fase no gel de acrilamida. No sistema descontínuo, os tampões e seus

pH's, usados nos eletrodos e na confecção do gel são diferentes e ainda, o gel é composto de duas fases que diferem em concentração e pH do tampão e concentração de acrilamida. Estas fases são designadas de gel concentrador e gel separador. Ambos os sistemas redundam em focalizar de modo mais estreito possível as bandas de proteínas (qualidade de resolução), sendo que o sistema descontínuo, idealizado por Laemmli em 1970, permite uma maior resolução e por isso, é o mais utilizado (Garfin, 1990-b).

No geral, o fracionamento pela eletroforese é baseado no tamanho e forma das macromoléculas. Mas, no sistema eletroforético no qual o fracionamento de proteínas ocorre, com estas na sua conformação nativa, não pode distinguir entre os efeitos do tamanho, forma e carga na mobilidade eletroforética. Como consequência, proteínas com diferentes pesos moleculares podem ter a mesma mobilidade nestes sistemas (Garfin, 1990-b).

No método PAGE (não desnaturante), mantém-se a estrutura nativa das proteínas e por isso, é utilizado para estudos preliminares na determinação da estrutura-função de proteínas e para ensaios qualitativos. De modo a preservar a integridade das proteínas, todo processo metodológico deve ser realizado sob baixa temperatura, tampão e pH adequados à enzima ou proteína de interesse (Garfin, 1990-b).

O sistema SDS-PAGE, superou as limitações do PAGE, onde as proteínas contidas numa mistura são desnaturadas pelo calor na presença de um dissociador e de um redutor. O agente mais usado é o detergente iônico SDS (dodecil sulfato de sódio), e o redutor 2-mercaptoetanol, o qual rompe as ligações dissulfeto (S-S). Nestas condições, as proteínas são solubilizadas e separadas em seus polipeptídeos constituintes, mantendo apenas a estrutura primária. O SDS liga-se aos polipeptídeos numa razão de massa constante, resultando numa carga negativa no complexo formado, pois as cargas líquidas dos polipeptídeos tomam-

se insignificantes frente às cargas negativas do SDS. Deste modo, os complexos SDS-polipeptídeo tem essencialmente a mesma densidade de acordo com a relação entre seus tamanhos e a porosidade do gel. Isto permite ainda, além da análise desejada, estimar a massa molecular de polipeptídeos através da co-migração de outros com massa molecular conhecida (marcadores de peso molecular), relacionando as suas respectivas mobilidades no gel (Garfin, 1990-b).

A eletroforese é uma técnica rápida e de alto valor informativo, que tem sido utilizada em diversos trabalhos de identificação, caracterização e comparação de proteínas entre diversas cultivares (Garfin, 1990-b).

2.1.2 Cromatografia de troca iônica e de exclusão (filtração)

Cromatografia pode ser definida como um processo de análise imediata por migração diferencial dos componentes de uma mistura, dentro de um sistema cromatográfico. Este, é um conjunto formado pela mistura a ser analisada (M), pela fase fixa (FF) e pela fase móvel (FM). A fase fixa, denominada de fase estacionária, é o meio constituído ou suportado por um sólido poroso, cuja função é reter os solutos. A fase móvel é o solvente, também chamado de eluente, que flui através da fase fixa, e tem como função deslocar os solutos. Neste sistema a mistura de solutos é levada a migrar através da fase fixa, por meio de fluxo constante da fase móvel, sendo a diferença de velocidade de migração provocada por processo de competição pelo soluto, entre as duas fases, em função de uma dada propriedade (Sherma, 1990).

Em princípio, qualquer propriedade que permita o estabelecimento de equilíbrio de concentração dos componentes da mistura (M) nas duas fase (FF/FM), em grau distinto para cada um deles, pode ser utilizada como propriedade cromatográfica separativa, isto é, em função dela os vários componentes da mistura migrarão com velocidades diferentes através da fase fixa

do sistema. A este fenômeno dá-se o nome de migração diferencial (Sherma, 1990).

A habilidade para atingir migração diferencial entre os componentes da mistura é o resultado da seletividade do sistema cromatográfico. Sendo assim, os componentes consomem diferentes frações de tempo sobre o solvente (fase estacionária) como determinado pelas interações do sistema cromatográfico. O valor R de retenção de uma substância indica a sua migração relativa àquela da fase móvel: $R = \text{velocidade do soluto} / \text{velocidade da fase móvel}$. Este valor indica a fração de tempo que as moléculas de soluto gastam na fase móvel relativo ao tempo no solvente (Sherma, 1990).

A cromatografia de troca iônica é utilizada especificamente para a separação de compostos iônicos ou ionizáveis. Ocorre uma troca de íons de mesmo sinal entre uma solução e um corpo sólido insolúvel em contato com ela. O sólido (trocador de íons) deve conter os seus próprios íons para que a troca se processe com rapidez e na extensão suficiente para ter interesse prático. Os trocadores de íons utilizados em análise são quase insolúveis em água e em solventes orgânicos e contém íons ativos e contra íons. Um trocador de cátions é constituído por um polímero aniônico e cátions ativos, e o trocador de ânions é um cátion polimérico com ânions ativos. Este método cromatográfico é o mais amplamente utilizado para separar, identificar e quantificar aminoácidos em uma mistura. Explora as diferenças no comportamento ácido-base dos aminoácidos (Vogel, 1992).

A cromatografia de troca iônica envolve dois eventos de separação: a ligação proteínas às cargas fixadas e a eluição ou deslocamento das proteínas fixadas nas cargas. Devido a retenção da proteína envolver uma interação eletrostática entre as cargas fixas e as da proteína, a ligação envolve a substituição da proteína ligada às cargas fixas por um contra íon com grande

afinidade pelas cargas fixas daquela proteína, e que então torna-se o novo íon não-fixado. A habilidade dos contra íons (sais) para substituir as proteínas aderidas as cargas fixas é em função da diferença em afinidade entre as cargas fixas e as cargas não-fixas tanto das proteínas quanto do sal. A afinidade é afetada por diversos fatores, inclusive a magnitude de cargas elétricas da proteína e a concentração e tipo de sal utilizado para o deslocamento (Rossomando, 1990).

A carga elétrica sobre a superfície das moléculas de proteína é uma propriedade intrínseca que deve ser explorada para traçar estratégias padrões e métodos para purificação da proteína. A separação de proteínas com base na sua carga elétrica depende de suas propriedades ácido-base, que são amplamente determinadas pela sua composição e seqüência de aminoácidos. A carga elétrica das moléculas de proteínas é influenciada pelo pH da solução. Em valores de pH baixos ou ácidos muitas proteínas tendem a ter uma rede de carga positiva, ao passo que em pH alto ou básico elas tem uma rede de carga negativa. As proteínas carregadas positivamente e negativamente tendem a mover em um determinado campo elétrico. Entretanto, a um certo pH as proteínas não tem uma rede de carga elétrica e não movem-se quando um campo elétrico é aplicado. Este valor de pH é chamado de pH isoeletrico ou ponto isoeletrico (pI). As propriedades de carga de moléculas de proteínas também permitem a presença de contra-íons na solução tampão, afim de ligar-se às proteínas. Similarmente, uma proteína carregada poderá ligar-se a superfície de uma resina ou algum suporte sólido carregado com cargas opostas (Rossomando, 1990).

A cromatografia de exclusão (ou filtração) é a única em que o fracionamento das proteínas é baseado no tamanho relativo das moléculas de proteína. Nenhuma das proteínas é retida na coluna de exclusão, esta principal característica é um ponto forte e fraco desse processo de fracionamento. Ponto forte devido as proteínas não serem danificadas pela ligação ao suporte

cromatográfico e ponto fraco devido aos limites de precisão relativos a ausência dessas ligações no suporte (Stellwagen, 1990).

Em cromatografia de exclusão, o suporte cromatográfico é em função ao tamanho dos poros da resina. Este método separa as proteínas por tamanho. Uma coluna cromatográfica de exclusão, empacotada com a referida resina, terá dois volumes líquidos: o volume externo (líquido que percola entre as partículas da resina) e o volume interno (líquido que percola dentro dos poros das partículas da resina). As moléculas maiores são equilibradas somente com o volume externo, enquanto que as moléculas menores são equilibradas com os volumes externo e interno. Quando uma mistura de proteínas é aplicada sobre o suporte cromatográfico, e permitida a sua percolação, as moléculas de proteínas maiores são excluídas a partir do volume interno e saem primeiro da coluna enquanto as moléculas de proteínas menores, que tem acesso através do volume interno, emerge posteriormente (Stellwagen, 1990).

2.2 Imunologia

A principal função do sistema imunológico é a de proteção do animal, contra os organismos infecciosos e seus produtos tóxicos. O organismo dos vertebrados é invadido continuamente por substâncias estranhas ou antígenos, muitos dos quais (como os microrganismos) podem ser letais, se não forem destruídos imediatamente. O mecanismo pelo qual o sistema imunológico realiza a eliminação do antígeno, pode ser dividido dentro de duas categorias - imunidade não adaptativa e imunidade adaptativa. A imunidade não adaptativa é realizada por células que reagem não especificamente às moléculas estranhas, como por exemplo, a fagocitose ou a secreção de lisozima pelas células lacrimais. Imunidade não adaptativa não progride quando o organismo é submetido a diversas exposições das moléculas estranhas. A imunidade adaptativa é realizada por células

chamadas de linfócitos que, a partir de receptores localizados na superfície celular sintetizam ou secretam proteínas que ligam-se especificamente à moléculas estranhas. Essas proteínas (globulinas) secretadas são conhecidas como anticorpos e combinam-se especificamente com o antígeno (molécula estranha) que provocou a sua síntese. A imunogenicidade não é uma propriedade intrínseca de uma molécula, mas é definida por sua capacidade de induzir uma resposta adaptiva. E a antigenicidade também não é uma propriedade intrínseca de uma molécula, mas é definida por sua habilidade de ligar-se a um anticorpo. O termo imunoglobulina é muitas vezes utilizado permutavelmente com o termo anticorpo. Formalmente, um anticorpo é uma molécula que liga-se a um antígeno conhecido, enquanto imunoglobulina refere-se ao grupo de proteínas independentemente se ligam ou não a um alvo conhecido (Harlow e Lane, 1988).

O sistema imunológico contém mais de 10^9 linfócitos distribuídos por todo o organismo animal. Os linfócitos surgem continuamente a partir de células da medula óssea, e são translocados através do sangue e sistemas linfáticos acumulando-se em estruturas especializadas (órgãos linfóides), que em mamíferos são as células linfáticas e o baço. Há diversos tipos de linfócitos com diferentes funções. As principais funções celulares do sistema imunológico podem ser descritas por grupos de linfócitos, divididos em três tipos básicos: células B, células citotóxicas T e as células ajudantes T. Essas referidas células possuem, na superfície celular receptores que podem ligar-se a antígenos. As células B secretam anticorpos, e transportam em sua superfície formas modificadas do mesmo anticorpo, onde estas atuam como um receptor para os antígenos. Células citotóxicas T ligam-se aos antígenos através de um receptor, denominado célula-T. As células ajudantes T, também possuem receptores em sua superfície e têm a função chave no controle das respostas das células B e células citotóxicas T (Harlow e Lane, 1988).

Uma das características do sistema imunológico é a de poder sintetizar um grande número de anticorpos, podendo cada um ter diferentes sítios de união. A ligação dos anticorpos e receptores da célula-T à moléculas estranhas ao organismo fornece a base molecular para a especificidade da resposta imunológica (Harlow e Lane, 1988).

A especificidade da resposta imunológica é controlada por um mecanismo simples - uma célula reconhece um antígeno - devido a todos os receptores de antígenos sobre um único linfócito serem idênticos. Isto ocorre nos linfócitos T e B, porém os tipos de respostas produzidos por essas células são diferentes. Cada linfócito produz um único tipo de anticorpo, determinado pelos fenômenos iniciais de recombinação. No entanto, é possível provocar maior diversidade durante a vida da célula através de mutação somática, a qual produz alterações adicionais na região variável da cadeia, promovendo maior afinidade de um anticorpo pelo seu antígeno (Harlow e Lane, 1988).

Todos os receptores de antígenos, encontrados na superfície dos linfócitos, são glicoproteínas. Recombinação, mutação e outros mecanismos geram mais de 10^7 sítios diferentes de união, sendo que a especificidade do antígeno é mantida devido ser sintetizado dentro de uma célula somente um tipo de receptor (Harlow e Lane, 1988).

Embora os receptores da superfície tenham parte das características estruturais similares, os receptores encontrados sobre as células B e células-T são codificados por famílias gênicas diferentes. Os receptores de anticorpos localizados sobre as células B podem ligar-se a antígenos solúveis, enquanto que os receptores das células-T reconhecem antígenos somente quando expostos sobre a superfície de outras células (Harlow e Lane, 1988).

Quando o organismo animal entra em contato pela primeira vez com um antígeno estranho, a resposta imunológica é lenta. Com o desenvolver da resposta

imunológica o antígeno é destruído. Sobre uma segunda exposição do mesmo antígeno há uma resposta mais rápida. Esta capacidade para responder rapidamente a segunda dose é denominada de memória imunológica (Harlow e Lane, 1988).

Portanto, anticorpos são proteínas produzidas em resposta à presença de moléculas estranhas ao organismo. São sintetizados primeiramente pelas células plasmáticas e terminalmente por células diferenciadas dos linfócitos-B. Circulam pelo sangue e linfa onde ligam-se a antígenos estranhos. Os complexos anticorpo-antígeno são removidos da circulação através da fagocitose realizada pelas macrofagas. Os anticorpos pertencem a uma grande família de glicoproteínas com características estruturais e funcionais. Funcionalmente podem ser caracterizados pela habilidade de ligar-se a antígenos e a células especializadas ou proteínas do sistema imunológico. Estruturalmente, os anticorpos são compostos por uma ou mais cópias de uma unidade de característica que pode ser visualizada na forma de Y. Cada Y contém quatro polipeptídeos, sendo que duas cópias idênticas de um polipeptídeo são conhecidas como cadeias pesadas e duas cópias idênticas do outro polipeptídeo são conhecidas como cadeias leves. Toda molécula de anticorpo terá um tipo de cadeia leve e um tipo de cadeia pesada. A composição das duas regiões variáveis determinará as propriedades do sítio de combinação do anticorpo. Os anticorpos são divididos em cinco classes: IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, com base no número de unidades de Y e o tipo de polipeptídeo de cadeia pesada que possuem (Harlow e Lane, 1988).

As cadeias leves têm aproximadamente 220 aminoácidos e podem ser divididas em duas regiões (região constante - C e a região variável - V), cada uma com cerca de 110 aminoácidos. A região variável (V) ocupa a metade amino-terminal da cadeia leve (cerca de 110 aminoácidos) e a metade carboxy-terminal é ocupada pela região constante (C). As cadeias pesadas também são divididas em

região V e C. A região V é semelhante, em tamanho, à região V das cadeias leves, mas a região C das cadeias pesadas é cerca de três vezes maior que a das cadeias leves - Figura 1 - (Harlow e Lane, 1988).

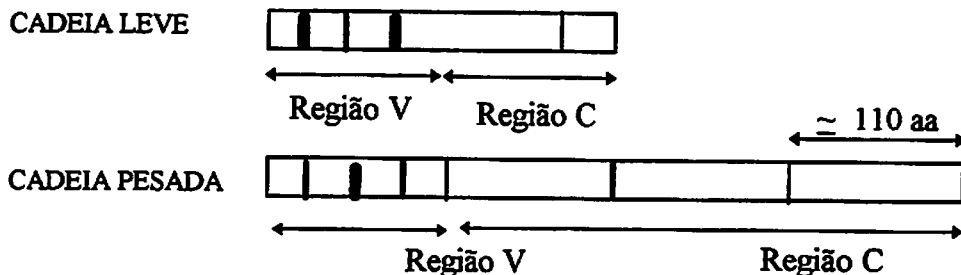


FIGURA 1. Estruturas da cadeia leve e da cadeia pesada (adaptado de Harlow e Lane, 1988).

Os anticorpos são classificados em dois tipos: monoclonais e policlonais. Os indivíduos de uma mesma espécie podem desenvolver diferentes respostas imunológicas, de modo que um mesmo antígeno é capaz de induzir a produção, em cada indivíduo, de um anticorpo diferente. O termo anticorpo policlonal é definido como a população total de anticorpos presentes no soro animal, que contém diferentes subclasses de anticorpos, inclusive: IgG, IgA, IgM, IgE e IgD. Dentre as vantagens do anticorpo policlonal pode-se citar: anticorpos com diferentes subclasses e alta afinidade estão presentes entre o total de anticorpos do soro animal; especificidades múltiplas reconhecem seqüências e conformações dos determinantes antigênicos; esses anticorpos reconhecem múltiplos determinantes específicos para uma proteína; antissoro policlonal altamente específico pode ser facilmente produzido a partir da imunização com proteínas purificadas a partir de gel bidimensional-PAGE. Dentre as desvantagens do anticorpo policlonal pode-se citar: imunógenos devem estar altamente purificados

para a obtenção da especificidade desejada; quantidades dos anticorpos está diretamente relacionada com a vida do animal imunizado; deve-se armazenar separadamente os soros coletados de sangrias realizadas em dias diferentes pois pode ocorrer alguma mudança quanto afinidade, especificidade e subclasse do anticorpo produzido (Dunbar e Skinner, 1990 a - b).

A técnica dos anticorpos monoclonais baseia-se no fato de que cada célula produtora de anticorpos produz um único tipo de anticorpo. Os linfócitos não se multiplicam em cultivo, porém G. Köhler e C. Milstein desenvolveram uma técnica que permite propagar indefinidamente uma linhagem celular, partindo da fusão de um determinado tipo celular com uma célula terminal. Para promover a fusão celular, mistura-se as células na presença de vírus *Sendai* inativado, cuja membrana lipídica estimula a fusão das membranas celulares. O produto inicial de fusão de duas células diferentes é um heterocarion (isto é, uma célula com dois núcleos diferentes). Ambos os núcleos podem entrar sincronicamente em mitose, formar uma placa metafisária única dividir-se e produzir uma linhagem celular híbrida (denominada de sincarion). A célula desta linhagem híbrida contém os cromossomos de ambos os núcleos. Para a obtenção dos anticorpos monoclonais, inicialmente, imuniza-se um camundongo com um antígeno desejado, em seguida os linfócitos do baço são extraídos e fusionados através do vírus *Sendai* a uma linhagem celular de camundongo derivada de plasmócitos tumorais (esses tumores são denominados mielomas porque invadem a medula óssea). Os clones que secretam o anticorpo desejado podem ser identificados e deixados crescer em cultivo. A fusão com a célula terminal torna “imortal” o linfócito do baço do camundongo, que a partir de então cresce indefinidamente *in vitro*. Estas células também podem ser inoculadas em camundongos e mantidas através de transplantes seriados dos tumores. Como todas as células derivam de um único linfócito, os anticorpos produzidos serão

monoclonais e de alta pureza (Harlow e Lane, 1988). Dentre as vantagens dos anticorpos monoclonais pode-se citar: anticorpos específicos de um determinante antigênico definido; anticorpos específicos podem ser utilizados no estudo funcional de uma molécula; grandes quantidades de anticorpos podem ser produzidos a partir da linhagem celular híbrida. Dentre as desvantagens dos anticorpos monoclonais pode-se citar: é um método caro; há maior demanda de tempo para sua produção inicial; necessidade de bons equipamentos para facilitar a multiplicação *in vitro*; se houver contaminação da cultura de tecidos (gerando perdas de cromossomos) pode ocorrer modificações nas linhagens de células híbridas (Dunbar e Skinner, 1990 a - b).

2.3 Imunotestes .

Os imunotestes são utilizados para determinar a especificidade de um anticorpo de por seu antígeno específico. São úteis para a localização de determinada proteína de interesse, assim como para determinar a sua concentração absoluta (Parker, 1990).

A sensibilidade de um imunoteste depende, em parte, do espectro do antígeno que o anticorpo reconhece. A estabilidade dos complexos antígeno-anticorpo é aumentada se o antígeno, assim como o anticorpo, é operacionalmente multivalente, permitindo *cross-linking* e a formação de treliças. No entanto, sendo a afinidade de um anticorpo monoclonal não tão alta como em um soro hiperimune policlonal, o sistema monoclonal pode não ser favorável. Ao passo que, o antissoro policlonal por conter anticorpos de alta e baixa afinidade é muito utilizado em imunotestes sensíveis (Parker, 1990).

Os imunotestes utilizando o antissoro policlonal, como *Ouchterlony* e imunoeletoforese, são simples de realizar e fornecem informações tais como a presença ou não de múltiplos sistemas antígeno-anticorpo (Parker, 1990).

Os testes de imunoeletroforese tem como vantagens: a produção de análise detalhadas sobre a especificidade de um anticorpo; análise dos complexos antissoro-antígeno; e geralmente são realizados sob condições não-desnaturantes. Porém, apresentam como desvantagens a necessidade de grandes quantidades de anticorpo e de antígeno e requer equipamentos especializados (Parker, 1990).

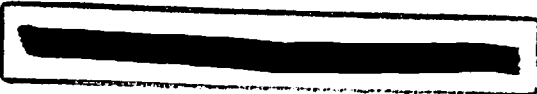
As vantagens que apresentam os testes *Ouchterlony* dupla difusão, são: podem detectar semelhanças imunológicas entre os antígenos; é realizado em condições não-desnaturantes; é também um método simples e barato. Como desvantagens: sais ou detergentes podem resultar em falsos resultados; requer grandes quantidades de antígenos e anticorpos; e, não é um método preciso para determinar a especificidade de um anticorpo (Parker, 1990).

2.4 A Esporamina

Maeshima, Sasaki e Asahi (1985) identificaram em *I. batatas* uma proteína, da classe das globulinas, com duas formas monoméricas de peso molecular em torno de 25 Kda, as quais foram denominadas de esporamina A e B. Segundo Hattori, Nakagawa e Nakamura (1990), esta proteína apresenta de 60 a 80 % do total de proteínas solúveis nas raízes tuberosas de batata-doce.

A esporamina é uma mistura de polipeptídeos intimamente relacionados codificados por uma família multigênica, a qual pode ser classificada dentro de duas grandes subfamílias, A e B, devido ao seu comportamento em eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e, sua seqüência homóloga de nucleotídeos (Maeshima, Sasaki e Asaki, 1985; Hattori, Nakagawa e Nakamura, 1990). Análises imunológicas e mapeamento peptídicos indicam que ambas classes estão intimamente relacionadas uma com a outra. (Maeshima, Sasaki e Asaki, 1985).

Tendo em vista que a esporamina é preferencialmente degradada durante o crescimento de novos brotos das raízes tuberosas, ela é considerada uma



proteína de armazenamento (Maeshima, Sasaki e Asaki, 1985). Através de análises com plantas cultivadas em campo, pode-se confirmar que a esporamina não é detectável ou está presente em quantidades ínfimas em órgãos diferentes das raízes tuberosas (Maeshima, Sasaki e Asaki, 1985; Hattori, Yoshida e Nakamura, 1989). A expressão dos genes que codificam a esporamina é ativada em raízes quando estas se expandem para desenvolver-se como órgão típico de dreno de armazenagem, bem como um resultado do acúmulo de quantidades enormes de amido sintetizado a partir da glicose, que fora transportada em quantidades maciças na forma de sacarose dos órgãos fontes fotossintéticos aéreos (Hattori et al., 1991).

A partir de testes de imunoelctroforese realizados em plântulas de batata-doce cultivadas *in vitro* em meio de cultura sólido contendo sacarose, pode-se observar a presença de esporamina em caules. Quando estas plântulas foram transferidas para o solo, ao atingir a maturidade, o nível de esporamina nos caules diminuiu, chegando ao nível visto em plantas cultivadas no campo (Hattori, Nakagawa e Nakamura 1990).

Os perfis eletroforéticos verificados em gel bidimensional de poliacrilamida SDS-PAGE, dos precursores da esporamina sintetizados *in vitro* pelo RNA poly (A)⁺ são indistinguíveis entre raízes tuberosas das plantas cultivadas em campo e caules das plantas cultivadas assepticamente cultivadas, sugerindo que uma série essencialmente idêntica aos membros da família multigênica da esporamina são expressos nestes dois órgãos sob diferentes condições de crescimento (Hattori, Nakagawa e Nakamura, 1990). Estes resultados indicam que a expressão dos genes de esporamina é regulada por um fator não específico para raízes tuberosas. Há presença de esporamina em folhas e pecíolos quando esses órgãos são retirados das plantas e diretamente colocados

em solução contendo alta concentração de sacarose ou outro açúcar metabolizável (Hattori et al., 1991).

Em plantas de *I. batatas* cultivadas no campo, diagnosticou-se a presença de esporamina em culres e em raízes tuberosas, nesta última essa proteína representa cerca de 80 % do total de proteínas solúveis (Maeshima, Sasaki e Asaki, 1985). Em folhas, pecíolos (Maeshima, Sasaki e Asaki, 1985) e sementes de *I. batatas* (Hattori et al., 1985) não foi detectada a presença de esporamina. Segundo Hattori, Nakagawa e Nakamura (1990) a presença de esporamina em caules de *I. batatas* pode atingir até 70% do total das proteínas solúveis do tecido, sendo que essa quantidade pode variar: de planta para planta, caules de plantas mais velhas continham maior quantidade de esporamina que caules de plantas mais jovens e partes inferiores dos caules continham maior quantidade que as partes superiores. Hattori, Nakagawa e Nakamura (1990) também detectaram a presença de esporamina, menos que 1% das proteínas totais, em alguns preparados de proteínas solúveis de folhas de plântulas de *I. batatas*; sugeriram, portanto, que a esporamina não é uma proteína específica de raízes tuberosas.

2.4.1 Purificação da Esporamina

Segundo Maeshima, Sasaki e Asaki (1985) a purificação parcial da esporamina foi realizada a 0-4 °C, a partir de tecidos parenquimáticos das raízes tuberosas homogeneizados e centrifugados em tampão (Tris-acetato; EDTA; Ascorbato de Sódio e Sacarose). O sobrenadante foi fracionado com sulfato de amônio (35-45%) e dialisado em tampão Tris-EDTA. Fracionado em coluna cromatográfica de troca iônica (DEAE-celulose) e em coluna cromatográfica de exclusão (Sephadex G-75), a esporamina foi visualizada em eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE e quantificada pelo método de Lowry et al. (1951).

Hattori, Nakagawa e Nakamura (1990) seguiram procedimentos semelhantes aos de Maeshima, Sasaki e Asaki (1990) porém o material dialisado foi fracionado somente por coluna cromatográfica de exclusão (Sephadex G-25). O extrato contendo a proteína (esporamina) foi precipitado com ácido tricloroacético 10% e quantificado pelo método de Lowry et al. (1951). Visualizou-se a esporamina por imunoelektroforese vertical.

2.5 Promotores da Tuberização

A indução e iniciação do desenvolvimento de órgãos de reserva em vegetais na natureza resultam de uma série de respostas fisiológicas destes vegetais aos fatores ambientais aos quais estão submetidos. Dentre os fatores ambientais estão: o fotoperíodo, temperatura e disponibilidade de água no solo. Esses estímulos ambientais são percebidos pelas plantas e convertidos em sinais a nível celular, as quais posteriormente tornam-se estímulos bioquímicos. A biossíntese das substâncias, que transmitirão estes estímulos do ambiente a órgãos específicos da planta, faz com que a planta responda por meio do desenvolvimento característico desses órgãos. Este estímulo bioquímico refere-se, basicamente, às substâncias reguladoras de crescimento ou fitohormônios (Figueiredo, 1995).

Vários fatores influenciam no processo de tuberização (Chandra, Dodds e Tovar, 1988; Vreugdenhil e Helder, 1992); as informações mais importantes advêm de pesquisas realizadas em batata, as quais podem ser relacionadas com o processo de tuberização de outras espécies produtoras de tubérculos e raízes tuberosas, entre elas a batata doce (Vreugdenhil e Helder, 1992).

Paredes (1995) relata que o processo de tuberização *in vitro* de *Ipomoea batatas* inicia-se nas terminações das raízes laterais e tem formato variável, porém as formas alongadas são predominantes, fato similar ao que

acontece com essa espécie em condições de campo. Esse processo de tuberização ou formação de raízes tuberosas ocorre com maior frequência em meio líquido MS suplementado com 8% de sacarose, KIN (1mg/L) e CCC (0,5-1 g/L), obtendo-se raízes tuberosas de tamanho não superior a 0,3 cm ao longo de 9 meses de cultura. Essas raízes tuberosas podem formar brotos em meio MS com 4% sacarose. Paredes (1995) cita que dentre os reguladores de crescimento as citocininas podem ser utilizadas no processo de indução de raízes tuberosas em batata-doce, porém o BAP tem um reduzido efeito promotor na formação de raízes tuberosas quando em meio de cultura suplementado com altas concentrações de CCC e sacarose, já a KIN, quando utilizada nas mesmas condições que o BAP, induz a formação de numerosas raízes tuberosas. Chandra, Dodds e Tovar (1988) trabalhando com batata (*Solanum tuberosum*) observaram que a tuberização ocorreu em geral sob condições de obscuridade total ou baixa iluminação (<1 W.m²).

Palmer e Smith (1969) foram os pioneiros com relação à observação da importância das citocininas no processo de tuberização *in vitro* de estolões isolados de batata, c.v. "Norgold Russet", demonstrando ainda que a utilização de KIN foi mais efetiva que o BAP e SD 8339. Muitos trabalhos similares a este confirmam a importância da KIN no processo de tuberização, tais como os realizados por Stallknecht (1972) e, Mingo-Castel, Young e Smith (1976). Outros trabalhos no entanto, demonstram que o BAP é também uma importante citocinina no processo de tuberização (Wang e Hu, 1982; Koda e Okazawa, 1983; Hussey e Stacy, 1984; Estrada, Tovar e Dodds, 1986).

Wang e Hu (1982) testaram a zeatina-ribosídeo a fim de promover a tuberização de batata *in vitro*, mas esta mostrou-se pouco eficaz.

Palmer e Smith (1970) e Palmer e Barker (1972) trabalhando com *Solanum tuberosum* observaram que na ausência de KIN a tuberização não ocorria e que o processo era também influenciado pela temperatura e fotoperíodo.

Hussey e Stacy (1984) e Garner e Blake (1989) induziram o desenvolvimento de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*) em meio de cultura sem reguladores de crescimento, porém em várias concentrações de sacarose e diferentes condições de fotoperíodo. Para Hussey e Stacy (1984) a produção de microtubérculos *in vitro* de *Solanum tuberosum* foi melhor obtida em dias curtos associado ao meio indutor contendo BAP, tal produção foi menor quando adicionado CCC ao meio, porém este reforçou o efeito dominante do BAP.

Em estudos de tuberização *in vitro* com outras espécies, como *Dioscorea rotundata* (Ng, 1988) e *D. alata* e *D. bulbiflora* (Mantell e Hugo, 1989), foi utilizada com sucesso a KIN, já para *D. alata* e *D. abyssinica* (Jean e Cappadocia, 1991) não foi necessária a utilização desta citocinina para que ocorresse a tuberização.

Figueiredo (1995) relata a importância das citocininas (BAP) para a indução do processo de formação de estruturas semelhantes a tubérculos (EST) de *Ipomoea batatas* *in vitro*. O mesmo autor obteve os melhores resultados com a utilização de 21,48 uM de ANA mais 44 uM e 88 uM de BAP; sem o BAP não ocorreu a formação das EST. O BAP é essencial para a produção de estruturas menores que 10 mm e o ANA em concentrações elevadas possibilita a maior individualização dessas estruturas. A utilização de CCC isoladamente não teve efeito algum sobre a tuberização *in vitro* dessa espécie, independentemente da concentração utilizada. Porém fixando-se a concentração de CCC em presença de ANA mais BAP no meio de cultura, houve um redirecionamento da matéria fresca para o sistema radicular como um todo.

As giberelinas atuam principalmente no crescimento da parte aérea a nível de divisão e alongamento celular (Horgan, 1984; Salisbury e Ross, 1992) e, de modo geral reprimem os processos de indução-iniciação de órgãos (Murashige, 1974). O ácido giberélico pode inibir fortemente a tuberização de batata (Hussey e Stacy, 1984).

McDavid e Alamu (1980) estudaram os efeitos de diferentes fotoperíodos, dias curtos (8 horas), dias neutros (11,5 a 12,5 horas) e dias longos (18 horas), no desenvolvimento e crescimento de plantas e folhas enraizadas de batata doce (*I. batatas*) *in vivo*. Esses autores constataram que plantas sob dias longos aumentavam no comprimento dos ramos e reduziam o número destes, tinham atraso na senescência, ocorrência de expansão foliar e inibição do florescimento. O crescimento dos ramos em resposta ao dia longo está associado a redução da produção de raízes tuberosas. Houve uma maior produção de raízes tuberosas em plantas sob regime de dias neutros. As folhas enraizadas mostraram-se insensíveis as mudanças de comprimento de dia, sugerindo que o efeito do comprimento do dia em plantas inteiras provavelmente está relacionado a alterações nos níveis endógenos de fitohormônios, particularmente de giberelina. A carência desta (giberelina) nas folhas enraizadas deve ser devido a capacidade de redução em sua síntese e também à inabilidade dos fitomodelos em perceber os estímulos fotoperiódicos. As folhas enraizadas apresentaram crescimento não comum, fenômeno observado devido aumento da folha e turgescência do pecíolo. As raízes de armazenamento produzidas a partir das folhas enraizadas eram capazes de brotar e gerar plantas normais. McDavid e Alamu (1980) também estimularam os fitomodelos para a produção de raízes de armazenamento com BAP e com ácido giberélico, este último reduziu a formação de raízes de armazenamento mas aumentou a protuberância dos pecíolos.

A maturidade das folhas, em *I. batatas*, é um fator crítico para o sucesso no enraizamento, as folhas mais jovens e completamente expandidas mostraram-se mais susceptíveis ao enraizamento em areia lavada, e as folhas mais velhas formaram calos na base do pecíolo e não enraizaram. Os pecíolos podem ser cortados em comprimentos convenientes, não ocasionando mudanças no enraizamento. As folhas não tratadas com solução fungicida apodreceram mais freqüentemente quando comparadas àquelas que haviam sido tratadas. Sombreamento nos 5 primeiros dias protegeram as folhas da desidratação. Folhas parcialmente sombreadas estavam mais verdes do que as folhas que estavam em pleno sol, porém, as folhas enraizaram mais rapidamente e também desenvolveram raízes de armazenamento quando expostas ao pleno sol. Um sombreamento no início, e sua progressiva remoção, é desejável (Martin, 1982).

Ng (1988) cita em seu trabalho que *Dioscorea rotundata* com fotoperíodos de 12 e 16 horas, teve uma maior freqüência de tuberização *in vitro* nos tratamentos com 5% de sacarose e menor freqüência em concentrações de sacarose superior ou inferior. A sacarose pode provavelmente exercer efeito similar ao da glicose, ou seja, aumentando a eficiência do movimento da auxina na planta, o efeito da sacarose na tuberização talvez seja direto nos níveis de fitohormônios.

Koda e Okazawa (1988) detectaram a atividade indutora da tuberização em folhas e tubérculos mais velhos de batata. A atividade em folhas aumenta sob dias curtos, mas permanece próximo do constante em dias longo. O processo de tuberização parece ser regulado pela ação combinada de alguns hormônios vegetais. Koda e Okazawa (1983), confirmaram que uma redução no nível de giberelinas é indispensável para a tuberização. As substâncias detectadas neste trabalho causaram a cessação do alongamento do estolão e induziram um inadequado aumento em tamanho da região subapical do estolão. As citocininas

acumuladas na parte aumentada (Koda e Okazawa, 1983) parecem induzir um vigoroso crescimento em espessura devido a divisão celular (Koda e Okazawa, 1988).

Segundo Matsuki, et al. (1992), o ácido jasmônico (fórmula estrutural a seguir) e metil ester jasmonato tem ação fitohormonal e são encontrados em muitas plantas. O JA e JA-Me são conhecidos por reduzir o crescimento de plântulas de cevada, aveia e outros cereais; e também por sua atividade promotora de senescência em certos cereais. Além disso, é sabido que o JA-Me causa o fechamento dos estômatos em folhas de *Avena* tratadas exogenamente na luz, as proteínas das folhas são hidrolizadas, e a respiração aumenta mais que 400%. Recentemente, isolou-se das folhas de batata uma substância que induz a formação de tubérculos, o ácido tuberônico glicopiranoside. Tanto o JA quanto os seus derivados são também fortemente ativos na indução de tuberização.

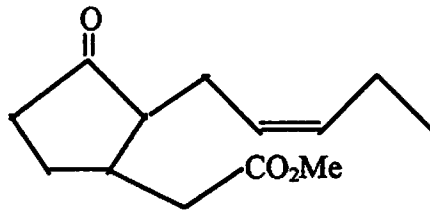


FIGURA 2. Fórmula estrutural do ácido jasmônico (JA), adaptado de Koda, et al. (1992).

Nakatami (1994) utilizou a técnica de cultura de raízes em batata doce a fim de promover a formação de raízes tuberosas. Obteve melhores resultados nos tratamentos em meio sólido juntamente com JA 10^{-5} M e meio líquido com BAP 10^{-6} M (sendo que a parte basal das raízes estavam em meio sólido e a apical em meio líquido). Afirmou que há uma certa imprecisão dos efeitos dos reguladores

de crescimento devido a variação das condições fisiológicas das raízes utilizadas como material. O autor ainda sugere um aperfeiçoamento no sistema de cultivo, com suplemento de ar nas raízes, assim como no cultivo hidropônico.

O JA foi isolado de folhas *Dioscorea batatas*. Koda e Kikuta (1991) pesquisaram o efeito exógeno de JA na tuberização de plantas de *D. batatas*, *in vitro*. A concentração limiar de JA para a indução de tuberização foi de aproximadamente 10^{-7} M. Concluíram que a tuberização dessas plantas está controlada pelo JA.

Pelacho e Mingo-Castel (1991) determinaram em batata (*Solanum tuberosum*) que a sensibilidade do ácido jasmônico em cultivo *in vitro*, avaliado em termos do ponto de saturação na concentração indutora de tuberização, foi mais que 20 vezes maior que a cinetina. A tuberização em ambos os casos estava associada com uma diminuição na habilidade de enraizamento. O ácido jasmônico gerou um estado de indução por todo o estolão.

As espécies de batata *Solanum andigena* (Juz. and Buk) e *Solanum demissum* (Lindl.) necessitam de dias curtos para tuberizar, quando submetidas a pulverizações com 100 uM de ácido jasmônico não tuberizaram. Porém mesmo em condições fotoperiódicas impróprias para a sua tuberização, o ácido jasmônico é absorvido e transportado dentro da planta. O ácido jasmônico leva um sinal de indução a tuberização e não se pode excluir a função do ácido jasmônico numa posterior formação e desenvolvimento de tubérculos. Após a indução, o JA retorna ao seu local (Jackson e Willmitzer, 1994).

3 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- I. Produção de raízes tuberosas de *I. batatas* em casa de vegetação, a partir de folhas coletadas de plantas (induzidas a tuberização) cultivadas em campo.
- II. Produção de raízes tuberosas *in vitro* de *I. batatas* a partir de plântulas, utilizando reguladores de crescimento e diferentes concentrações de sacarose.
- III. Extração, purificação e produção de anticorpos contra uma proteína (esporamina) de armazenamento de raízes tuberosas em batata doce (*Ipomoea batatas* (L.) Poir. cv. Brazlândia Branca).
- IV. Avaliação da síntese de esporamina em diferentes partes da plântula.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Extração da proteína total

Todo procedimento foi realizado a frio, mantendo a temperatura próxima a 4°C. Homogeneizou-se a raiz tuberosa de batata-doce (*Ipomoea batatas* cv. Brazlândia branca) em liquidificador juntamente com tampão (50 mM Tris-acetato, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 8,0; 1% p/v ácido ascórbico; 0,5 M de sacarose; pH final 7,82), na proporção de 1 g de tecido / 4 mL de tampão. Esse extrato bruto foi centrifugado a 10.000 g / 20 minutos. Repetiu-se a centrifugação com o sobrenadante a fim de eliminar o excesso de amido e as impurezas.

A proteína total foi quantificada pelo método BCA (Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit Sigma), e a visualização por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5%.

4.2 Purificação da esporamina

4.2.1 Purificação através de coluna cromatográfica de exclusão

Todo procedimento foi realizado a frio, mantendo a temperatura próxima a 4°C. O extrato da proteína total foi fracionado com solução saturada de sulfato de amônio a 35 - 45%, sendo realizado da seguinte forma: precipitação das proteínas não desejáveis a 0 - 35%, centrifugação (10.000 g / 20 minutos); e, precipitação do sobrenadante a 35 - 45% seguido também de centrifugação. Ressuspendeu-se o precipitado em tampão Tris-acetato 50 mM e EDTA 1 mM.

A fim de retirar o excesso de sulfato de amônio e proteínas não-desejáveis do material realizou-se diálise em membrana celulose (12 Kd) por 20 horas à 3 °C, trocando-se o tampão (TRIS 50 mM e EDTA 1 mM) por 3 vezes.

O material dialisado foi submetido a uma coluna cromatográfica de exclusão (2,5 x10 cm) contendo Sephadex G-25 a uma altura de 8,5 cm. Para determinação da quantidade e o preparo da Sephadex, seguiu-se a metodologia de Maniatis, Fritsch e Sambrook (1982). A coluna foi pré-equilibrada com o mesmo tampão utilizado na diálise, com 4 vezes o seu volume (50 mL). Eluiu-se o material dialisado da coluna com o mesmo tampão (Tris 50 mM e EDTA 1 mM) e frações de 2,5 mL foram coletadas em um total de 15 tubos. As frações foram submetidas a leitura em espectrofotômetro (280 nm) e a eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5 %.

4.2.2 Purificação através de coluna cromatográfica de troca iônica

Submeteu-se o material dialisado, obtido através do mesmo processo descrito anteriormente, a uma coluna cromatográfica (2,5 x 10 cm) de troca iônica (DEAE celulose de troca de ânions) pré-equilibrada com o tampão Tris 50 mM e EDTA 1 mM, sendo 6 cm a altura final de DEAE. A quantidade de amostra aplicada na coluna foi relativa a 1/6 do volume total da coluna. Lavou-se a coluna com 3 vezes o volume da mesma com Tris-acetato 50 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM pH 8,0 e KCl 0,1 M. A esporamina foi eluída, em frações de 1 mL, com Tris-acetato 50 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM pH 8,0 e KCl 0,2 M. A presença de proteínas nas frações foi observada após a leitura em espectrofotômetro (280 nm), e visualizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5%.

4.2.3 Purificação da esporamina através de coluna cromatográfica de troca iônica e de exclusão

Colocou-se 4 mL do material dialisado em uma coluna cromatográfica de troca iônica (2,5 x 10 cm, sendo 8 cm de DEAE-cellulose) pré-equilibrada com tampão TRIS-EDTA.

Coletou-se 72 frações de 1 mL, porém a partir da 25ª fração é que pode-se quantificar a presença de proteínas (espectrofotômetro-280 nm). Essas frações foram visualizadas em eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS a 12,5%.

Liofilizou-se as frações nas quais a esporamina apareceu mais pura e ressuspendeu-se em 5 mL de Tris-EDTA.

Esses 5 mL da amostra foram fracionados em coluna cromatográfica de exclusão com Sephadex G 50-80 (1,5 x 100 cm, sendo 81 cm de Sephadex). O tampão para equilibrar e eluir as proteínas foi o mesmo, Tris-acetato 50 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM pH 8,0 e NaCl 0,1 M. Para cada 10 mL de volume da coluna usa-se 1 g de Sephadex.

Coletou-se 46 frações de 2,5 mL da coluna cromatográfica de exclusão. Verificou-se a presença de proteína em espectrofotômetro (280 nm) e visualizou-se a partir de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5%.

4.3 Produção de Anticorpos

4.3.1 Produção de anticorpo contra a proteína total

Foi realizada uma sangria antes da aplicação dos antígenos, para certificar (a partir de teste de imunodifusão) se o animal produzia ou não anticorpos contra o antígeno em questão, esse soro coletado é denominado de pré-imune (controle). Para a realização das sangrias raspou-se os pêlos da orelha do

coelho, com algodão aplicou-se xylol e fez-se uma pequena incisão na veia marginal.

Preparou-se a primeira dose do antígeno com 12 mg de proteína total; 1,9 mL de NaCl 0,85% e 2,5 mL de adjuvante completo de Freund's. A mistura adjuvante/antígeno foi aplicada intramuscularmente em 2 sítios.

Decorridos 15 dias desde a primeira aplicação injetou-se uma segunda dose de antígeno (12 mg de proteína total, 1,9 mL de NaCl 0,85% e 2,5 mL de adjuvante incompleto de Freund's). Realizou-se as sangrias após sete dias da segunda aplicação do antígeno, num total de 5 sangrias intercaladas dia sim / dia não.

A determinação da especificidade desse anticorpo foi feita a partir de testes de imunodifusão e de imunoeletroforese contra o extrato da proteína total da batata doce.

O soro foi dividido em alíquotas de 1 mL e armazenado a -20 °C.

4.3.2 Produção de Anticorpo contra a Esporamina

Seguiu-se o mesmo procedimento já descrito, porém a primeira dose do antígeno foi preparada com 2,5 mL de solução contendo 0,88 mg de esporamina e 2,5 mL de adjuvante completo de Freund's. E a segunda dose do antígeno: 2,5 mL de solução contendo 0,88 mg de esporamina e 2,5 mL de adjuvante incompleto de Freund's.

4.4 Testes de Imunodifusão

Foram realizados testes de imunodifusão para determinar o grau de titulação dos anticorpos. Para a realização desse tipo de imunoteste utilizou-se uma membrana com 75 cm² (filme Gelbond). O gel foi preparado com 1% de agarose A; 10,8 mL tampão fosfato de sódio 0,025 M pH 7,0 e 1,2 mL de

tampão fosfato de sódio 0,025 M com fenol 2% e; uma vez homogeneizado, após banho-maria a aproximadamente 90°C, colocou-se rapidamente sobre uma membrana em superfície nivelada. Após a polimerização preparou-se os orifícios (3 mm de diâmetro com capacidade aproximada de 20 ul) das amostras, utilizando um vazador. Colocadas as amostras, o gel ficou em repouso em câmara úmida por cerca de 16 horas. A visualização dos resultados pode ser feita diretamente sobre uma lâmpada ou através do processo de revelação. Processo de revelação: lavou-se o gel cerca de 12 horas em solução salina 0,1 M; trocou-se a solução 3 vezes (500 mL cada vez). O gel foi colocado em uma superfície plana cobrindo-o com uma camada de papel de filtro, um vidro e um peso de 1 kg, permanecendo assim por 10 minutos. Secou-se o gel com secador, colocou-se em solução corante (0,7 g de coomassie blue 250; 125mL de etanol; 25 mL de ácido acético e 125mL de água) por 10 minutos e o excesso de corante foi retirado com solução 1:1 de ácido acético 7 % mais álcool, até obter a resolução desejada.

Os testes de imunodifusão também foram utilizados para a avaliação da síntese de esporamina em diferentes partes da plântula.

4.5 Testes de Imunoeletroforese

Utilizou-se gel com 1% de agarose A em solução tampão (tricine 0,02 M pH 8,6) com o suporte para esses géis (filme Gelbond) possuindo uma área de 130 cm² onde 39 cm² foi utilizado como zona de amostras (sem anticorpos) e o restante como zona de reação (com anticorpos), Figura 3.

A amostra antes de ser colocada no orifício foi rapidamente misturada com o gel de agarose (20 ul de amostra mais 20 ul do gel a 50°C e mais 5 ul de solução marcadora). Solução marcadora: 10 mg de azul de bromofenol; 0,5 mL de Tris-HCl 1 M pH 8,5; 9,5 mL de água e 10 mL de glicerol. O gel foi submetido à eletroforese no sentido I (Figura 3) por 1 hora a 100v e em seguida

no sentido II por 4 horas a 100v. O tampão de corrida utilizado foi o tricine 0,02 M pH 8,6. A visualização dos resultados foi realizada através de um processo de revelação (idem ao do gel de imunodifusão).

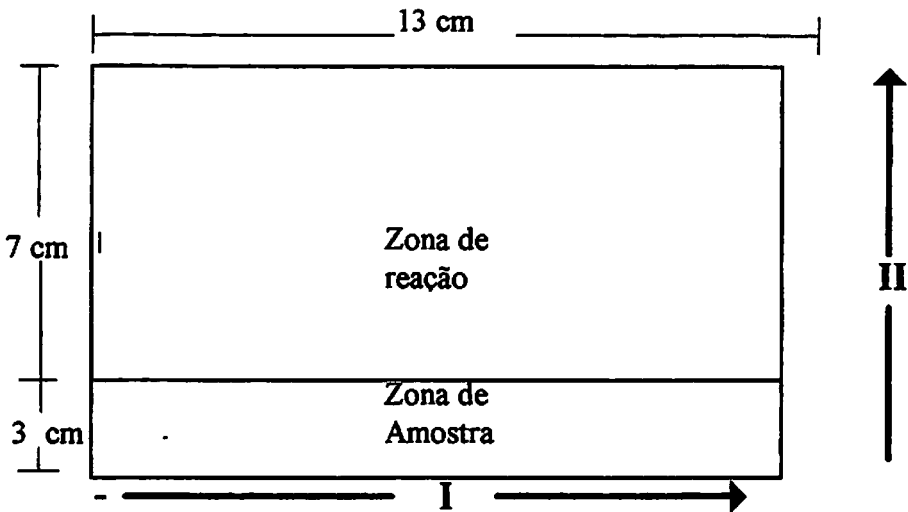


FIGURA 3. Zona de reação e das amostras, com o sentido da corrente elétrica.

4.6 Produção de Raízes Tuberosas in vivo, em casa de vegetação

Utilizou-se as folhas da região mediana do caule de plantas adultas, em processo de indução de tuberização, cultivadas em campo (*Ipomoea batatas* cv. Brazlândia Branca). Essas folhas foram submetidas a oito tratamentos e em seguida transplantadas para bandejas, tendo como substrato areia lavada. As bandejas permaneceram em casa de vegetação sob sombrite 30% e irrigação por nebulização.

Os tratamentos foram: folha coletada no campo e colocada em bandeja com areia úmida; o restante dos tratamentos consistiu em deixar o pecíolo das folhas em imersão por 16 horas em: água destilada; 5 mg/L de BAP e 4 mg/L de IBA; 10 mg/L de BAP e 4 mg/L de IBA; 20 mg/L de BAP e 4 mg/L de IBA; 20

mg/L de BAP e 4 mg/L de ANA; 20 mg/L de BAP, 4 mg/L de ANA e 6% de sacarose; 20 mg/L de BAP, 4 mg/L de IBA e 6% de sacarose.

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado sendo cada tratamento composto por 30 repetições.

O experimento foi conduzido por um período de 45 dias, ao final do qual os sistemas radiculares formado nas folhas foram lavados em água corrente. Quantificou-se o peso fresco de cada folha; peso fresco de cada sistema radicular; número, comprimento e diâmetro das raízes tuberosas formadas. Esse material foi colocado separadamente em sacos de papel identificados e armazenados a -20°C (em freezer) para posterior extração protéica através da maceração em almofariz com solução tampão (50 mM Tris-acetato, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 8,0; 1% p/v ácido ascórbico; 0,5 M de sacarose; pH final 7,82), na proporção de 1 g de tecido / 4 mL de tampão. Estimou-se a quantidade de proteínas total no extrato a partir de leitura em espectrofotômetro (280 nm), o qual foi submetido a testes de imunodifusão.

4.7 Variação na Concentração de Sacarose do Meio de Cultura *in vitro*

Utilizou-se como explantes plântulas inteiras de *Ipomoea batatas* pré-estabelecidas *in vitro* com aproximadamente 30 dias de idade, crescidas em meio Murashige e Skoog (MS) (1962) sólido (0,6% p/v ágar), sem reguladores de crescimento e com 3% de sacarose, em tubos de ensaio de 150 mm x 28 mm com 10 mL de meio.

As plântulas foram transferidas para frascos de 300 mL de capacidade, utilizando o meio líquido de MS variando a concentrações de sacarose de 0; 3; 6; 9 e 12% p/v. As plântulas foram apoiadas em formas de papel de alumínio previamente esterilizadas de tal forma que somente as raízes entrassem em contato com o meio, segundo a metodologia utilizada por Figueiredo, 1995.

Posteriormente, os frascos foram selados com fita plástica e transferidos para sala de crescimento, sob regime de 16h luz/ 8h escuro, temperatura de $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e com radiação fotossinteticamente ativa (RFA) de $42 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ com lâmpada GE de 40 W luz do dia especial.

O delineamento estatístico utilizado foi o de blocos casualizado, sendo 4 blocos com 4 repetições compostas por 5 plântulas cada.

O experimento foi avaliado aos 30 e 45 dias após a implantação, quantificando-se o peso fresco da parte aérea, peso fresco do sistema radicular e observando-se a formação de estruturas semelhantes a raízes tuberosas. A parte aérea foi dividida em: folha, pecíolo e caule. Esse material foi colocado separadamente em sacos de papel identificados e armazenados a -20°C (em freezer) para posterior extração protéica através da maceração em almofariz com solução tampão (50 mM Tris-acetato, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 8,0; 1% p/v ácido ascórbico; 0,5 M de sacarose; pH final 7,82), na proporção de 1 g de tecido / 4 mL de tampão, estimou-se a quantidade de proteínas total no extrato a partir de leitura em espectrofotômetro (280 nm), o qual foi submetido a testes de imunodifusão.

4.8 Utilização de ácido jasmônico em segmentos nodais de *Ipomoea batatas*

Utilizou-se como explantes segmentos nodais de plântulas de *Ipomoea batatas* estabelecidas *in vitro*, crescidas em meio MS sólido (0,6% p/v ágar), sem reguladores de crescimento e com 3% de sacarose, em tubos de ensaio de 150 mm x 28 mm com 10 mL de meio MS.

Os segmentos nodais (com 1 gema) foram transferidos para frascos com 300 mL de capacidade contendo 20 mL de meio MS com 0,2% de phytagel e 6 % de sacarose, variando a concentração de ácido jasmônico: 0, 20, 40 e 80 mg/L. Posteriormente, os frascos foram selados com fita plástica e transferidos para

sala de crescimento, sob regime de 16h luz/ 8h escuro, temperatura de $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e com radiação fotossinteticamente ativa (RFA) de $42 \text{ umol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ com lâmpada GE de 40 W luz do dia especial.

Devido ser o ácido jasmônico ser degradado quando submetido a altas temperaturas ($> 80^{\circ}\text{C}$), o meio de cultura de cada tratamento foi autoclavado em erlenmeyers juntamente com os frascos vazios (com tampas). Os meios de cultura, logo após autoclavagem foram colocados em banho-maria a 40°C , afim de mantê-los na forma líquida e a uma temperatura ideal para a adição dos tratamentos. Os tratamentos (ácido jasmônico) foram adicionados, em câmara de fluxo asséptica, nos erlenmeyers e em seguida distribuídos nos frascos. Deve-se salientar que ao se aferir o pH dos meios de cultura procurou-se mantê-los elevados, afim de torná-los próximo do ideal (pH 5,7) após a adição do ácido jasmônico ao meio autoclavado.

O delineamento estatístico utilizado foi o de blocos casualizado, sendo 4 blocos com 4 repetições compostas por 6 plântulas cada.

O experimento foi avaliado aos 60 dias após a implantação, quantificando-se o peso fresco da parte aérea, peso fresco do sistema radicular e sobrevivência do explante.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Purificação da esporamina através de coluna cromatográfica de exclusão

As frações coletadas foram submetidas a espectrofotômetro (280 nm) e visualizadas a partir de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% utilizando como padrão a proteína total extraída em SDS que fora armazenada a -20°C e a proteína total extraída em SDS no mesmo dia. Este procedimento teve a finalidade de verificar em quais frações apareceram maior quantidade de esporamina e observar se a proteína total permanecia estável após o congelamento.

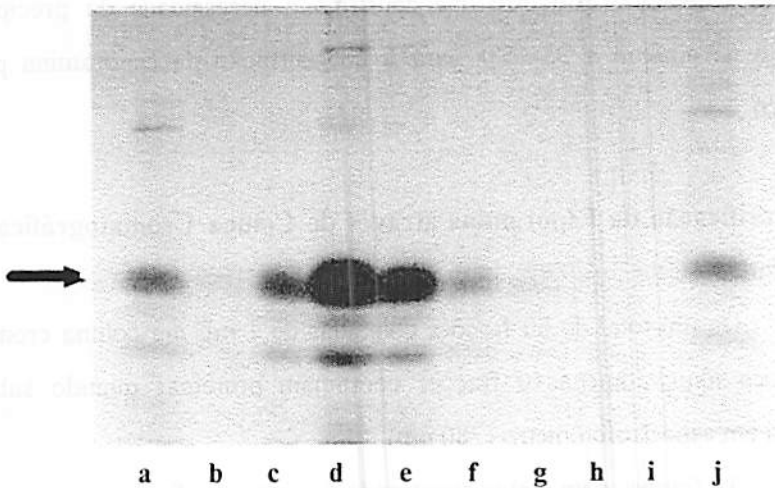


FIGURA 4. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS/PAGE a 12,5% das frações: proteína total armazenada a -20°C (a), frações quantificadas em espectrofotômetro a 280 nm (b a i) e proteína total extraída no mesmo dia (j). A seta na figura indica a localização da esporamina (A e B).

Ao se comparar as bandas da proteína total armazenada a - 20 °C com as bandas da proteína total extraída no momento da utilização (Figura 4), pode-se observar que esta permanece estável após o congelamento. As amostras apresentaram as mesmas bandas, não mostrando nenhuma degradação da proteína.

As amostras de c a f coletadas durante o processo de purificação, quando observadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (Figura 4) apresentaram a banda referente a esporamina juntamente com outras bandas. Portanto, o uso de apenas essa coluna cromatográfica de exclusão (Sephadex) não foi suficiente para a purificação da esporamina.

Quando observamos a região correspondente as bandas da esporamina (observe a seta na Figura 4) pode-se notar maior concentração dessa proteína nas frações coletadas, fato este que confirma a necessidade da precipitação por sulfato de amônio a 35-45% para a concentração da esporamina presente no extrato.

5.2 Purificação da Esporamina através de Coluna Cromatográfica de Troca Iônica

De um total de 60 frações coletadas de 1 mL em coluna cromatográfica de troca iônica, apenas 40 frações continham proteínas quando submetidas a leitura em espectrofotômetro (280 nm).

As frações com maior quantidade de proteínas foram visualizadas em gel de poliacrilamida SDS/PAGE a 12,5% utilizando como padrão a proteína total da batata doce (Figura 5). Como as frações de 7 a 14 (Figura 5) apresentaram a esporamina bastante purificada, estas foram agrupadas, homogeneizadas e submetidas a uma diálise em TRIS-EDTA.

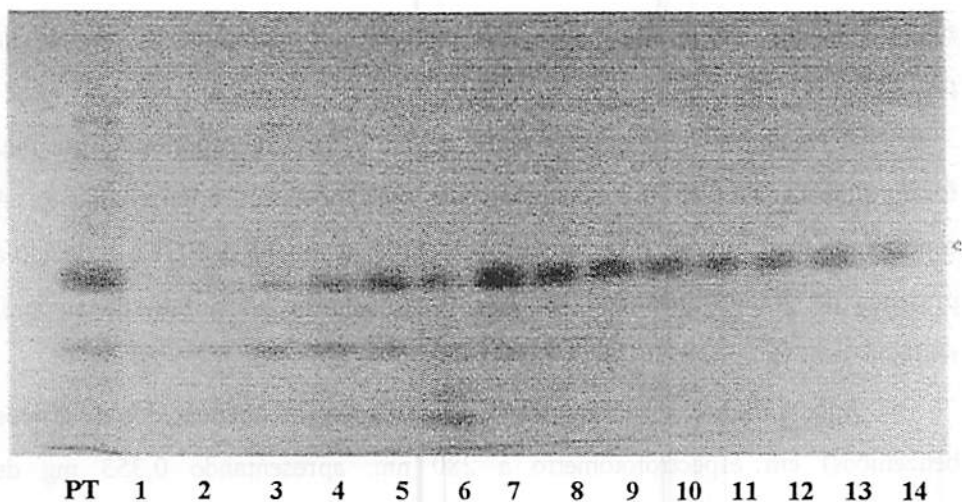


FIGURA 5. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS/PAGE a 12,5%, onde: proteína total (PT), e as frações coletadas da coluna cromatográfica de troca iônica que apresentaram maior quantidade de proteínas a 280 nm (1 a 14).

Após a diálise referida anteriormente, essa amostra passou novamente por coluna cromatográfica de troca iônica, seguindo o mesmo processo anterior. De um total de 71 frações coletadas, 1mL cada, apenas em 29 frações pode-se constatar presença de proteínas a partir de leitura em espectrofotômetro (280 nm). Agrupou-se e homogeneizou-se todas as frações que apresentaram proteínas e precipitou-se com sulfato de amônio (35-45 %). O precipitado foi ressuscitado em 2 mL de TRIS-EDTA, dialisado no mesmo tampão (ressuspensão e sobrenadante, separadamente) e submetido a leitura em espectrofotômetro a 280 nm. A ressuspensão apresentou 0,2 mg de proteína por mL e o sobrenadante 0,17 mg de proteína por mL (considerando que $1 \text{ OD}_{280} \simeq 1 \text{ mg/mL}$).

As amostras foram visualizadas a partir de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS/PAGE a 12,5%. Verificou-se que tanto o sobrenadante 0,17

mg/mL quanto a ressuspensão 0,2 mg/mL apresentaram a esporamina praticamente pura.

A ressuspensão e o sobrenadante, 0,17 e 0,2 mg de esporamina por mL, foram liofilizadas (-53 °C) separadamente para posterior armazenamento. A esporamina 0,17 mg/mL foi ressuspensa em 3 mL de TRIS-EDTA e devido a presença de grande quantidade de sais (provavelmente o sulfato de amônio) realizou-se nova diálise em TRIS-EDTA.

Após a diálise, esse material foi quantificado (os aminoácidos de grupos benzênicos) em espectrofotômetro a 280 nm, apresentando 0,353 mg de esporamina por mL. A visualização da esporamina purificada pode ser observada na Figura 6. Essa purificação foi o suficiente para a obtenção de um anticorpo específico para os imunotestes realizados, porém outro processo de purificação foi testado a fim de comparar por qual método obtinha-se a esporamina mais pura.

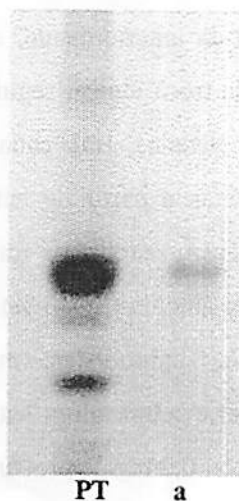


FIGURA 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS/PAGE a 12,5% das amostras: proteína total (PT) e 0,353 mg de esporamina por mL (a).

5.3 Purificação da esporamina através de coluna cromatográfica de troca iônica e de exclusão

As frações, obtidas a partir de cromatografia de troca iônica, com maior quantidade de proteínas (280 nm) foram visualizadas em gel de poliacrilamida SDS/PAGE a 12,5%. As frações que apresentaram a esporamina bastante purificada, foram agrupadas, homogeneizadas e liofilizadas.

A ressuspensão (em 5 mL de TRIS-EDTA) do material liofilizado, foi dialisada e fracionada em coluna cromatográfica de exclusão (em Sephadex G 50-80). As frações foram quantificadas em espectrofotômetro a 280 nm, a fim de detectar a presença de proteínas.

As frações, coletadas em coluna cromatográfica de exclusão, que apresentaram maior quantidade de proteínas foram visualizadas em eletroforese em gel de poliacrilamida SDS/PAGE a 12,5% (Figura 7).

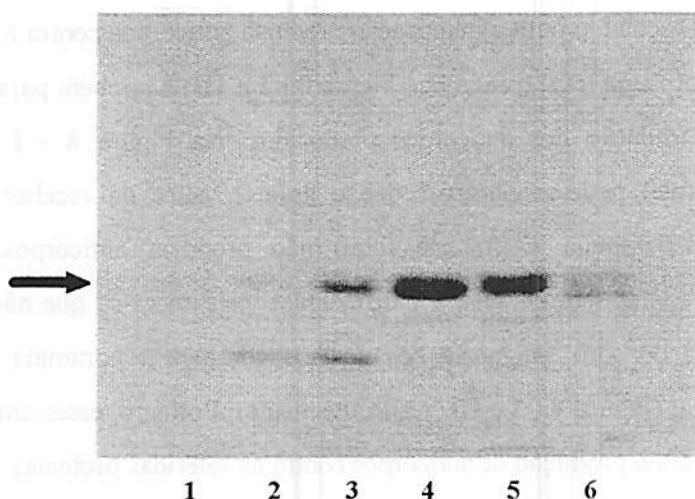


FIGURA 7. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS/PAGE a 12,5% das frações (1 a 6) coletadas em coluna cromatográfica de exclusão.

Observamos que a esporamina não se apresentou tão pura quanto na purificação anterior (somente por coluna cromatográfica de troca iônica). Observando a Figura 7 pode-se notar que além da banda referente a esporamina (seta na figura) outras bandas também apareceram. Pois a cromatografia de exclusão nada mais é do que um processo de filtração, ou seja, considera somente o tamanho relativo das moléculas de proteínas. Em contraste a filtração convencional, a coluna cromatográfica de exclusão não retém (em sua resina) moléculas de proteínas, sendo que as moléculas maiores de proteínas saem primeiramente da coluna enquanto que as menores emergem posteriormente. Por outro lado, a cromatografia de troca iônica é utilizada especificamente para a separação de compostos iônicos ou ionizáveis.

5.4 Produção de Anticorpos

Os testes de imunodifusão (Figura 8) foram utilizados a fim de certificar se o animal escolhido para a imunização produzia anticorpos contra a esporamina e contra a proteína total (pré-imune Figura 8 - I e III) e também para determinar o grau de titulação dos anticorpos produzidos. Na Figura 8 - I e III (pré-imune/controle) pode-se observar que o animal, antes de receber a dose de antígeno (esporamina e proteína total) não produzia anticorpos contra as proteínas de interesse, ou seja, a partir desses testes nota-se que não ocorreu a precipitação do soro sanguíneo dos coelhos contra a esporamina e contra a proteína total (Figura 8 - I e III, respectivamente). Portanto, esses animais foram utilizados para a produção de anticorpos contra as referidas proteínas.

Os testes de imunodifusão - figura 8 (II e IV) - mostram o grau de titulação dos anticorpos produzidos contra a esporamina e proteína total de *Ipomoea batatas*, respectivamente. Pode-se observar, tanto na Figura 8 - II quanto na Figura 8 - IV que o grau de titulação de 1/4 mostrou-se eficiente para

determinar a presença de esporamina e de proteína total em determinados extratos de tecidos de *Ipomoea batatas*.

O anticorpo contra a esporamina também foi testado a partir de imunoeletroforese (FIGURA 9 - I), resultando em um pico único quando aplicado contra extratos de esporamina pura e extratos de proteína total. O teste foi realizado com 600 uL de anticorpo contra a esporamina sem diluição na parte superior do gel e na parte inferior (na figura 9 - I, legendas de a a d) diluições da esporamina pura e da proteína total. A partir desse resultado pode-se provar que o anticorpo contra a esporamina é específico, pois precipita em uma única banda quando aplicado contra a proteína total. E como era esperado, ocorreu a precipitação de várias bandas quando o extrato bruto da proteína total entrou em contato com o anticorpo produzido contra a mesma (Figura 9 - II).

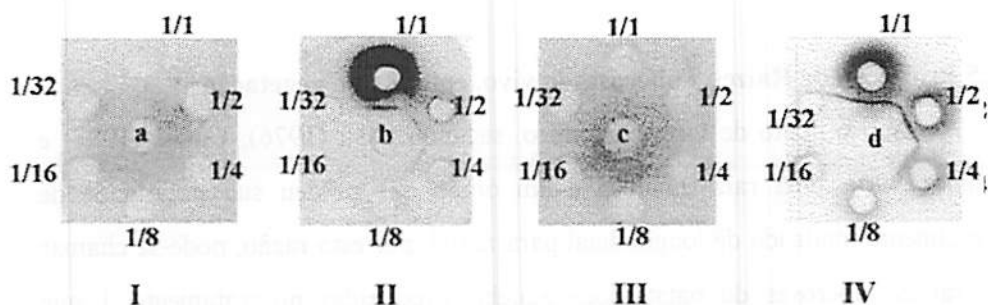


FIGURA 8. Testes de imunodifusão realizados com diferentes diluições (1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 e 1/32) do anticorpo:

- I. produzido para a esporamina e no centro (a) soro sanguíneo do coelho antes da imunização com o antígeno (esporamina) - controle (pré-imune)
- II. produzido para a esporamina e no centro (b) solução contendo 0,022 mg de esporamina
- III. produzido para a proteína total e no centro (c) soro sanguíneo do coelho antes da imunização com o antígeno (proteína total) - controle (pré-imune)
- IV. produzido para a proteína total e no centro (d) solução contendo 2,5 mg de proteína total

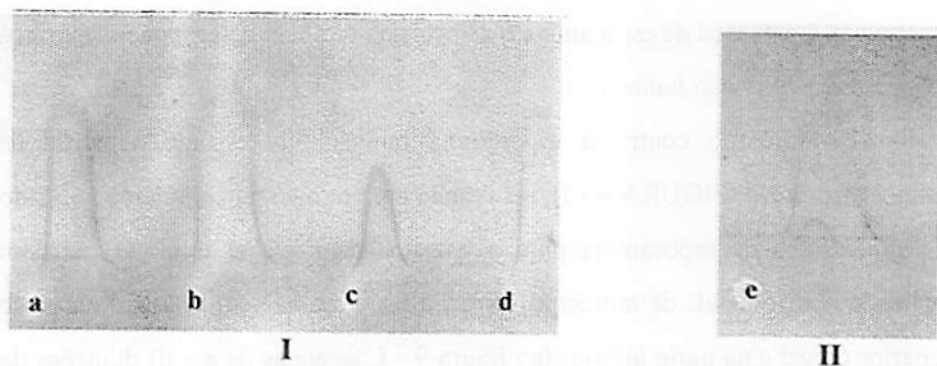


FIGURA 9. Testes de Imunoeletroforese dos anticorpos:

- I. produzido para a esporamina contra as diluições da solução contendo a esporamina pura (a = 0,088 mg/mL e b = 0,180 mg/mL) e o extrato diluído da proteína total (c = 15 mg/mL e d = 30 mg/mL)
- II. produzido para a proteína total contra o extrato diluído da proteína total (e = 5 mg/mL)

5.5 Produção de Raízes Tuberosas *in vivo*, em casa de vegetação

Sob o ponto de vista anatômico, segundo Esau (1976), Cutter (1987) e Fahh (1990), uma raiz tuberosa é um órgão que perdeu sua polaridade de crescimento mudando de longitudinal para radial, por esta razão, pode-se chamar de raízes tuberosas de batata-doce àquelas produzidas no tratamento I que consistiu em retirar a folha do campo e em seguida colocá-la em areia úmida. As raízes mais espessas deste experimento, segundo a análise estatística (tabela 1), estavam presentes neste mesmo tratamento. Pode-se observar na Figura 10 que as raízes tuberosas produzidas nesse tratamento são semelhantes às raízes tuberosas do campo. O tempo de 45 dias de avaliação talvez não tenha sido suficiente o bastante para induzir um maior número de raízes tuberosas nos tratamentos utilizados. Mas notou-se um grande número de raízes em expansão.

Submeteu-se a testes de imunodifusão os extratos das folhas, parte superior e inferior do pecíolo e das raízes comuns e raízes expandidas do tratamento 1. A esporamina estava presente na parte superior e inferior dos pecíolos e nas raízes expandidas, devido a precipitação desta proteína quando em contato com o anticorpo produzido contra a mesma (Figura 11 - I).

Na Figura 11 - II, teste de imunodifusão realizado com a planta do campo, há esporamina nos caules e nas raízes tuberosas. Ao se comparar os pecíolos das folhas enraizadas em casa de vegetação (sem adição de fitorreguladores e de sacarose) com os pecíolos de uma planta do campo percebe-se que nesta última não há esporamina detectável por este teste. Como há esporamina no caule da planta do campo (Figura 11 - II) pode-se concluir que, provavelmente, o pecíolo da folha (retiradas de plantas, cultivadas em campo, em processo de indução de tuberização) enraizada em casa de vegetação sem adição de fitorreguladores e de sacarose pode estar assumindo a função de caule, uma vez que o pecíolo da planta do campo não apresentou esporamina detectável. Esses resultados concordam com os de Hattori, Nakagawa e Nakamura (1990) que detectaram a presença de esporamina em caules de plantas do campo, em quantidade próxima de 70 % do total de proteínas solúveis do tecido, e não detectaram a esporamina em folhas e pecíolos da mesma.



FIGURA 10. Destaque da raiz tuberosa produzida após 45 dias em substrato.

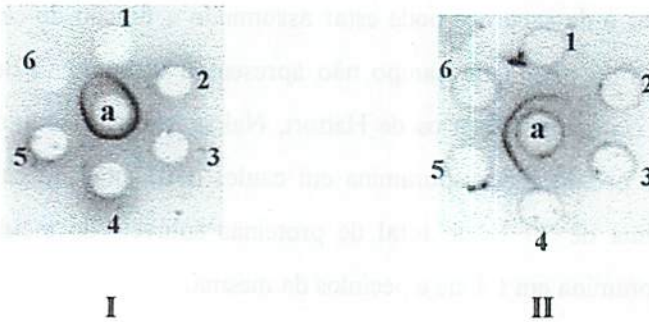


FIGURA 11. Testes de imunodifusão realizados com diferentes:

- I. partes da folha enraizada em casa de vegetação em tratamento sem adição de reguladores de crescimento e de sacarose contra o anticorpo produzido para a esporamina sem diluições (no centro, a); onde, 1. folha, 2. parte superior do pecíolo, 3. parte inferior do pecíolo, 4. e 5. raízes expandidas, 6. raízes comuns
- II. partes da planta cultivada no campo contra o anticorpo produzido para a esporamina sem diluições (no centro, a); onde, 1. caule, 2. e 3. folha, 4. pecíolo, 5. raiz tuberosa, 6. esporamina pura

Através da Tabela 1 pode-se observar que no tratamento 8, em que se utilizou os reguladores de crescimento BAP e AIB suplementados com sacarose, obteve-se uma maior produção de raízes em processo de tuberização (raízes expandidas). Talvez o tempo de condução do experimento (45 dias) não tenha sido suficiente para que o processo de tuberização ocorresse por completo. Realizou-se teste de imunodifusão com as partes da folha enraizada nesse tratamento. Pode-se diagnosticar que a esporamina estava presente na parte superior e inferior do pecíolo, nas raízes expandidas e nas folhas (Figura 11 - I). A partir dos testes de imunodifusão realizados com folhas extraídas de plantas cultivadas em campo, pode-se verificar que a síntese de esporamina não ocorre nessas, tanto em folhas de plantas induzidas a tuberização (Figura 11 - II) quanto em folhas de plantas em processo de formação das raízes tuberosas (figura 16 - II, a seguir). Porém a síntese de esporamina, diagnosticada nessas folhas enraizadas *in vivo* (Figura 11 - I), pode ter sido estimulada pelo metabolismo fisiológico (e seus produtos orgânicos) da planta no momento da coleta dessas folhas (plantas induzidas a tuberização). Por outro lado, pode-se supor que a sacarose e o AIB (juntamente com o BAP) utilizados nesse tratamento tenham sido os responsáveis pelo acúmulo de esporamina nessas folhas, uma vez que a síntese de esporamina não foi diagnosticada em folhas do tratamento 7 em que se utilizou a sacarose e o ANA (e também o BAP) (Figura 12 - II). Ainda, segundo Hattori et al. (1991) uma grande quantidade de esporamina pode-se acumular em folhas e pecíolos quando esses órgãos são retirados das plantas do campo e diretamente suplementados com uma solução que contém alta concentração de sacarose ou outro açúcar metabolizável.

TABELA 1. Valores Médios do número de raízes expandidas, do diâmetro e comprimento em centímetro dessas raízes, e peso fresco (em gramas) da folha ao final de 45 dias.

Trat.	BAP (mg/L)	AIB (mg/L)	ANA (mg/L)	SACA- ROSE (g/L)	Números de raízes expandidas	Diâmetro (cm)	Comprimento (cm)	Peso fresco da folha
1	-	-	-	-	1,225 H	0,767 A	8,978 AB	5,766 B
2	0	0	0	0	1,581 G	0,443 AB	7,214 B	7,430 AB
3	5	4	-	-	1,871 F	0,300 AB	7,063 B	8,427 AB
4	10	4	-	-	2,121 E	0,320 AB	8,900 AB	8,955 A
5	20	4	-	-	2,345 D	0,316 AB	5,750 B	9,238 A
6	20	-	4	-	2,550 C	0,500 AB	14,000 A	7,270 AB
7	20	-	4	60	2,739 B	0,200 B	6,500 B	7,917 AB
8	20	4	-	60	2,916 A	0,500 AB	8,500 AB	6,631 AB
D.M.S					0	0,511	5,698	2,937

Os valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

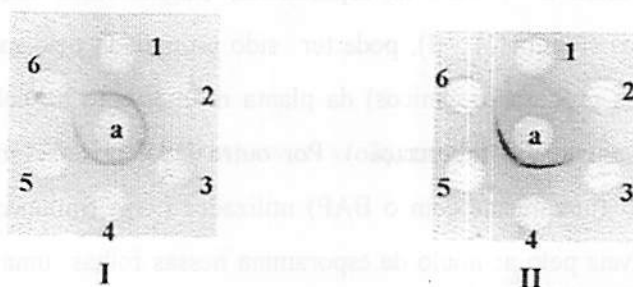


FIGURA 12. Teste de imunodifusão realizado com diferentes partes da folha enraizada em tratamento:

- I. contendo BAP, AIB e sacarose contra anticorpo sem diluições (no centro, a) produzido para a esporamina;
- II. contendo BAP, ANA e sacarose contra anticorpo sem diluições (no centro, a) produzido para a esporamina; onde, 1. folha, 2. parte superior do pecíolo, 3. parte inferior do pecíolo, 4. e 5. raízes expandidas, 6. raízes comuns.

Nas raízes expandidas produzidas no tratamento 7 (BAP, ANA e sacarose) também foi diagnosticada, através de teste de imunodifusão, a síntese de esporamina (Figura 12 - II); tal síntese ocorre com freqüência nas raízes tuberosas extraídas de cultivos em campo (submetidas a testes de imunodifusão).

Apesar da baixa quantidade de raízes expandidas produzidas em presença apenas de BAP e ANA (tratamento 6) estas mostraram-se maiores em comprimento quando comparadas às raízes expandidas dos outros tratamentos (Tabela 1). Na Figura 13 - I pode-se observar o teste de imunodifusão realizado com as folhas enraizadas do tratamento 6. A esporamina ocorreu somente na parte superior e inferior do pecíolo. Sabe-se que a esporamina não é uma proteína específica de raízes tuberosas de batata doce (Hattori, Nakagawa e Nakamura, 1990), sua síntese pode ser induzida em folhas e pecíolos quando esses órgãos são retirados das plantas e diretamente colocados em solução contendo alta concentração de sacarose (Hattori et al., 1991) e que a expressão dos genes que a codificam é ativada na raiz quando ela se expande para desenvolver-se como órgão típico de dreno de armazenagem (Hattori et al., 1991). Como neste tratamento não se utilizou sacarose, pode-se supor que a ocorrência da síntese de esporamina na parte superior e inferior do pecíolo e não nas raízes expandidas seja uma característica metabólica da folha enraizada em processo inicial (acúmulo de amido nas raízes) de tuberização. Ou seja, essas raízes ainda iriam expandir para desenvolverem-se como órgão típico de dreno de armazenagem, e poderiam estar começando a acumular amido sintetizado a partir de glicose que fora transportada (através do pecíolo) na forma de sacarose da folha (órgão fonte fotossintético aéreo). Desse modo a síntese de esporamina, na parte superior e inferior do pecíolo, pode ter sido induzida pela sacarose que estava sendo transportada através do pecíolo, assim como também essa proteína poderia estar sendo transportada para as raízes (drenos) em processo de tuberização.

Observando-se a Tabela 1, percebe-se que os tratamentos possuem valores médios de peso fresco das folhas próximos. Procurou-se coletar as folhas na mesma região mediana do caule da planta do campo, objetivando obter folhas com características metabólicas semelhantes, tamanho e peso aproximado.

Os valores médios do peso fresco do sistema radicular, sem as raízes expandidas, produzido pela folha não diferenciaram significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Para o tratamento 3, com menores concentrações de BAP e AIB, ocorreu um menor número de raízes expandidas (Tabela 1). Porém as raízes expandidas formadas nesse tratamento foram semelhantes a raízes tuberosas. O teste de imunodifusão realizado pode ser observado na FIGURA 12 - II. Detectou-se a presença de esporamina na parte superior e inferior do pecíolo e nas raízes expandidas, assim como para o tratamento 1, que consistiu em coletar as folhas e colocá-las diretamente em areia úmida.

Para os tratamentos 2, 4 e 5 detectou-se a presença de esporamina somente na parte superior do pecíolo e nas raízes expandidas (Figura 14). Segundo Hattori, Nakagawa e Nakamura (1990), as partes inferiores dos caules contém maior concentração de esporamina que as partes superiores. Se os pecíolos das folhas desses tratamentos estão assumindo a função de caule, supõem-se que na parte inferior do pecíolo da folha enraizada em casa de vegetação havia uma pequena quantidade de esporamina, por estar sendo transportada para as raízes (drenos) em processo de tuberização. Entretanto esta quantidade não foi detectada pelo teste de imunodifusão.

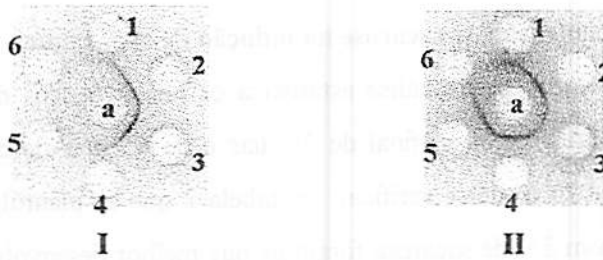


FIGURA 13. Testes de imunodifusão realizados com anticorpo sem diluições (no centro, a) produzido para a esporamina contra diferentes partes das folhas enraizadas em tratamento:

- I. contendo BAP e ANA (tratamento 6)
- II. contendo BAP e AIB em baixas concentrações (tratamento 3)
onde, 1. folha, 2. parte superior do pecíolo, 3. parte inferior do pecíolo, 4. e 5. raízes expandidas, 6. raízes comuns.

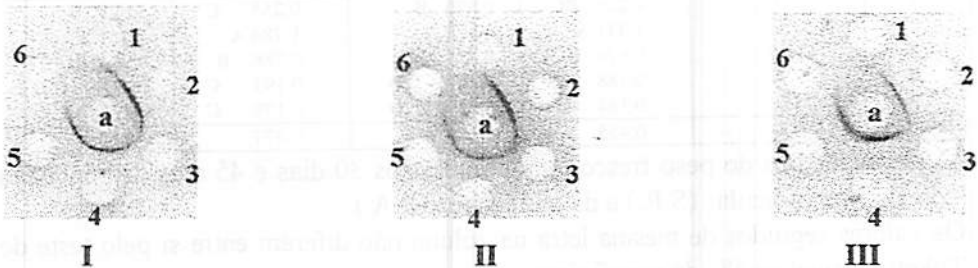


FIGURA 14. Testes de imunodifusão realizados com diferentes partes das folhas enraizadas em tratamento: somente água (I), 10 mg de BAP/L + 4 mg de AIB/L (II) e 20 mg de BAP/L + 4 mg de AIB/L (III); sempre utilizando o anticorpo sem diluições (no centro, a) produzido para a esporamina; onde, 1. folha, 2. parte superior do pecíolo, 3. parte inferior do pecíolo, 4. e 5. raízes expandidas, 6. raízes comuns.

5.6 Efeito da concentração de sacarose na indução de esporamina

Foram coletadas para análise estatística os pesos frescos dos sistemas radiculares e da parte aérea, ao final de 30 dias e de 45 dias de condução do experimento (tabela 2). Pode-se verificar na tabela 2 que as plântulas crescidas meio MS líquido com 3% de sacarose foram as que melhor desenvolveram o seu sistema radicular e parte aérea tanto aos 30 dias de condução quanto aos 45 dias de condução deste experimento.

TABELA 2. Valores médios de peso fresco (P.F.) do sistema radicular (S.R.) e da parte aérea (P.A.) ao final de 30 dias e 45 dias de condução do experimento.

Trat	Sacarose (g/L)	P.F. aos 30 dias ¹		P.F. aos 45 dias ¹	
		S.R.	P.A.	S.R.	P.A.
1	0	0,226 BC	0,925 B	0,255 C	1,021 B
2	30	1,331 A	1,372 A	1,784 A	1,461 A
3	60	0,676 B	0,821 BC	0,786 B	0,954 B
4	90	0,188 C	0,487 D	0,193 C	0,435 C
5	120	0,184 C	0,419 D	0,178 C	0,380 C
DMS	-	0,455	0,352	0,477	0,331

¹ Valores médios do peso fresco (em gramas) aos 30 dias e 45 dias de condução do sistema radicular (S.R.) e da parte aérea (P.A.)

Os valores seguidos de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

A utilização de meio MS líquido variando a concentração de sacarose não foi suficiente para que a plântula produzisse raízes tuberosas. Neste experimento não se constatou qualquer formação de raízes tuberosas em 30 e 45 dias de condução.

Nas Figuras 14 e 15 estão os testes de imunodifusão realizados com diferentes partes das plântulas aos 30 e 45 dias de condução do experimento, respectivamente. Esses testes foram realizados afim de detectar onde ocorre a

síntese da esporamina. Os resultados mostraram que a síntese de esporamina ocorreu nos caules das plântulas submetidas a 0, 6, 9 e 12 % de sacarose aos 30 dias de condução e a 0, 3, 9 e 12% de sacarose aos 45 dias de condução. Esse fenômeno da síntese de esporamina ocorrer nos caules de plântulas submetidas a meio com 6% de sacarose, após 30 dias de condução de experimento, e não ocorrer em plântulas nas mesmas condições (porém aos 45 dias de condução) pode ser devido as diferenças metabólicas existentes entre uma plântula e outra, ou mesmo pelo fato da plântula estar em processo de senescência influenciado pela diminuição de sais e de sacarose no meio de cultura (em decorrência do consumo pela plântula), fazendo com que a plântula realizasse a síntese de esporamina no sistema radicular em resposta a indução de tuberização (como forma de sobrevivência da espécie à senescência). A síntese de esporamina ocorre nos sistemas radiculares e não ocorre nos caules de plântulas submetidas a meio de cultura contendo 3% de sacarose após 30 dias de condução do experimento, este fato se deve provavelmente a quantidade de sacarose ainda presente no meio (estímulo à síntese de esporamina no sistema radicular) e também, possivelmente, em resposta ao processo de indução de tuberização na plântula. A síntese de esporamina ocorreu nos sistemas radiculares e caules de plântulas submetidas a meio contendo 3 % de sacarose após 45 dias de condução do experimento, pode-se supor que plântula estava sintetizando tal proteína para posteriormente tuberizar (também como uma forma de sobrevivência à senescência). Em caules de plântulas submetidas a meio sem sacarose (30 dias de condução) pode-se detectar a presença de esporamina (Figura 15), enquanto que em caules do mesmo tratamento após 45 dias de condução tal proteína não foi detectada (Figura 16). Contradizendo em parte os resultados obtidos por Hattori, Nakagawa e Nakamura (1990) de que a esporamina em caules é fenômeno específico de plantas cultivadas em meio contendo sacarose, desde então quando

estas plantas são transferidas para o solo e assim atingindo a maturidade, o nível de esporamina nos caules diminui ao nível visto em plantas cultivadas no campo. A síntese de esporamina nos caules desse tratamento (0 % de sacarose) pode estar em função da maturidade da plântula. As plântulas quando submetidas aos tratamentos estavam com 30 dias de idade, ou seja, quando coletadas para análise estavam com 60 dias e 75 dias de idade cronológica. Pode-se observar que há presença de esporamina nos caules de plantas do campo na Figura 11 - II, a qual não se repetiu (também com o caule da planta do campo) na Figura 16. Este fato, provavelmente, está correlacionado a diferentes época de coleta do material no campo. No teste mostrado na Figura 11 - II os caules foram coletados de plantas que estavam no início do processo de indução de tuberação e no teste mostrado na Figura 16 - I os caules foram coletados de plantas quando as mesmas estavam iniciando a formação de raízes tuberosas.

Nos sistemas radiculares dos tratamentos com 3, 6, 9 e 12 % de sacarose, tanto para 30 dias quanto para 45 dias de condução, a esporamina estava presente (Figuras 15 e 16). Como já foi descrito a esporamina pode ser induzida em presença de sacarose, daí o fato desta proteína não expressar no sistema radicular do tratamento com 0% de sacarose.

As folhas e os pecíolos (de plantas do campo e das plântulas submetidas aos tratamentos *in vitro*) não expressaram os genes que codificam a esporamina, quando submetidas aos testes de imunodifusão, concordando com os resultados obtidos por Maeshima, Sasaki e Asaki (1985). Ou seja, não ocorreu a precipitação da esporamina ao entrar em contato com o anticorpo produzido contra a mesma (Figuras 15 e 16).

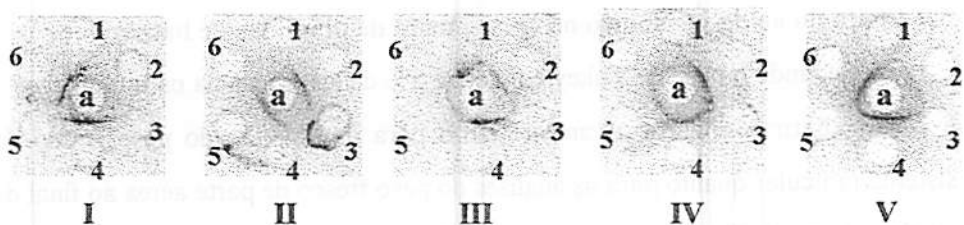


FIGURA 15. Testes de imunodifusão realizados com diferentes partes das plântulas (1. folha, 2. e 5. sistema radicular, 3. pecíolo, 4. e 6. caule) submetidas a variações na concentração de sacarose (I. 0%, II. 3%, III. 6%, IV. 9%, V. 12%) após 30 dias de condução do experimento. Todos os testes foram realizados com o anticorpo produzido contra a esporamina sem diluições (no centro, a).

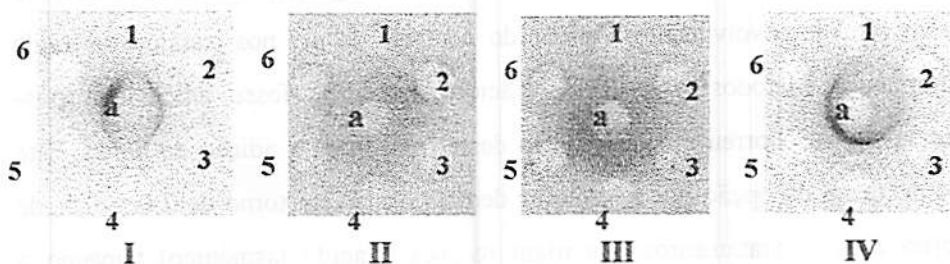


FIGURA 16. Testes de imunodifusão realizados com diferentes partes das plântulas (I. caules, II. folhas, III. pecíolos, IV. sistemas radiculares) submetidas a variações na concentração de sacarose (1. planta do campo em processo de formação de raízes tuberosas, 2. 0%, 3. 3%, 4. 6%, 5. 9%, 6. 12%) após 45 dias de condução do experimento. Todos os testes foram realizados com o anticorpo produzido contra a esporamina sem diluições (no centro, a).

5.7 Efeito do ácido jasmônico no crescimento de plântulas de batata doce

Segundo o teste de Tukey a nível de 5% de significância os tratamentos 1 e 2 não diferiram significativamente tanto para as análises do peso fresco do sistema radicular quanto para as análises do peso fresco de parte aérea ao final de 60 dias de condução deste experimento (Tabela 3). Ou seja, no tratamento sem ácido jasmônico (T1) e no tratamento (T2) com concentração de 20 mg/L de ácido jasmônico no meio MS houve um bom crescimento e desenvolvimento das gemas em plântulas, porém não ocorreu a formação de raízes tuberosas em nenhum tratamento utilizado (Figura 17). Os tratamentos 3 (40 mg/L de JA) e 4 (80 mg/L de JA) não diferiram significativamente (Tabela 3) para o peso fresco da parte aérea, deve-se salientar que nesses tratamentos não houve um bom desenvolvimento das gemas (Figura 17) e no tratamento 4 não obteve-se a formação de sistema radicular permanecendo o segmento nodal sem necrose porém sem desenvolvimento. Apesar do controle de pH nos tratamentos (vide Materiais e Métodos) para que o ácido jasmônico fosse adicionado pós-autoclavagem, ocorreu uma diminuição deste (pH) após a adição do ácido. Este fato decorreu da opção por não elevar demais o pH (em torno de $7,0 \pm 0,5$; de acordo com os tratamentos que iriam receber o ácido jasmônico) temendo a precipitação de alguns sais presentes no meio de cultura, o que acarretaria na indisponibilidade destes para o desenvolvimento do explante. Contribuindo, assim, para que ocorresse a inibição do desenvolvimento parcial das gemas no tratamento 3 e inibição total de seu desenvolvimento no tratamento 4. Ao se repetir este experimento deve-se aumentar um pouco mais o pH do meio antes da autoclavagem para que quando adicionarmos o ácido jasmônico o pH fique próximo do ideal ($\pm 5,7$).

Em *Solanum tuberosum* a sensibilidade ao JA em cultivo *in vitro* foi 20 vezes maior que a cinetina tendo a tuberização associada em ambos os casos (JA

e cinetina) à uma perda na habilidade de enraizamento (Pelacho e Mingo-Castel, 1991). Para a batata doce a utilização do JA como promotor de tuberização a partir de segmentos nodais não foi eficiente. Para plântulas, com 30 dias de idade, desenvolvidas em meio MS e submetidas a meio de cultura contendo JA e outros reguladores de crescimento (testes experimentais - dados não mostrados) também não ocorreu a formação de raízes expandidas. Esses testes experimentais foram realizados em meios de cultura variando a concentração de JA, de citocininas (BAP e KIN), de auxinas (ANA) e também de CCC; com *Ipomoea batatas* L. Poir. Brazilândia Branca e com outras cultivares.

Nakatami (1994) utilizando a técnica de cultura de raízes *in vitro* em batata doce variou a concentração de JA e de BAP obtendo a formação de raízes tuberosas. Mas, este afirma que há uma certa imprecisão dos efeitos dos reguladores de crescimento devido a variação das condições fisiológicas das raízes utilizadas como material, sugerindo um aperfeiçoamento no sistema de cultivo suplementando-o com aeração.

Em testes experimentais tentou-se realizar uma melhor aeração (a partir de formas de papel alumínio, pedras no fundo do frasco, pontes de papel, meio sólido com phytigel e com ágar) utilizou-se meio de cultura com diversas concentrações de reguladores de crescimento (JA, BAP, ANA, IBA, KIN, CCC) reduziu-se a intensidade luminosa e variou-se o fotoperíodo, mas mesmo assim não se obteve a formação de raízes tuberosas (dados não mostrados).

TABELA 3. Valores médios do peso fresco da parte aérea e do sistema radicular ao final de 60 dias de condução do experimento.

TRAT.	ÁC. JASM. (mg/L)	Parte Aérea (g)	Sistema Radicular (g)
1	0	0,866 A	1,319 A
2	20	0,984 A	1,674 A
3	40	0,499 AB	0,815 B
4	80	0,028 B	—
DMS		0,620	0,422

Os valores seguidos de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.



FIGURA 17. Destaque dos tratamentos: I. 0, II. 20, III. 40 e IV. 80 em mg/L de ácido jasmônico.

6 CONCLUSÕES

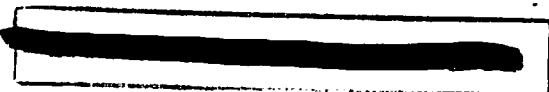
A partir dos resultados obtidos pode se concluir que:

- O anticorpo produzido contra a esporamina é uma importante ferramenta para futuro estudos sobre a localização da síntese dessa proteína nas plantas de *Ipomoea batatas* afim de correlacioná-la com o processo de indução de tuberização.
- O melhor processo de purificação da esporamina (A e B) foi a partir de Cromatografia de Troca Iônica, utilizando como resina a DEAE celulose trocadora de ânions.
- Em folhas enraizadas em casa de vegetação, a obtenção de raízes com maior volume, ocorreu no tratamento que consistia de retirá-las do campo e colocá-las imediatamente em areia úmida. E a maior quantidade de raízes expandidas ocorreu quando os pecíolos foram submetidos a soluções de imersão contendo BAP (20 mg/L), AIB (4 mg/L) e sacarose (60 g/L).
- A variação da concentração de sacarose em meio de cultura líquido para plântulas de batata doce cultivadas *in vitro* não induziu a formação de raízes tuberosas, no período total de 45 dias de condução. As plântulas submetidas ao meio MS líquido com 3% de sacarose obtiveram melhor crescimento e desenvolvimento quando comparadas as plântulas submetidas aos outros tratamentos.

- A partir de testes de imunodifusão pode-se confirmar que a esporamina não é uma proteína específica de raízes tuberosas de *Ipomoea batatas*, sendo que sua síntese ocorre em caules e sistemas radiculares de plântulas submetidas ou não ao meio de cultura contendo sacarose e também em plantas retiradas do campo. A presença ou não da esporamina em diferentes partes da plântula varia conforme o tratamento utilizado e o estágio fisiológico da mesma.
- A utilização do ácido jasmônico em segmentos nodais, obtidos a partir de plântulas *in vitro* de *Ipomoea batatas*, não promoveu a microtuberização. Nos tratamentos ausente e com 20 mg/L de ácido jasmônico em meio MS sólido houve um bom crescimento e desenvolvimento das gemas em plântulas, porém sem formação de raízes tuberosas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. Eletroforese de proteína e isoenzimas de fungos e essências florestais. Universidade Federal de Viçosa, 1991. 242p.
- CHANDRA, R.; DODDS, J.H.; TOVAR, P. In vitro tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). IAPTC Newsletter, v.55, p.10-20, 1988.
- CLARK, C.A. Principal bacterial and fungal diseases of sweet potato and their control. In: Exploration, Maintenance, and Utilization of Sweet Potato Genetic Resources. Report of the Sweet Potato Planning Conference 1987. International Potato Center, Lima, p.275-289, 1988.
- COLLINS, W.W. Improvement of nutritional and edible qualities of sweet potato for human consumption. In: Exploration, Maintenance and Utilization of sweet Potato Genetic Resources. Report of the First Sweet Potato Planning Conference 1987. International Potato Center, Lima, p.221-226, 1988.
- CRONQUIST, A. The Evolution and Classification of Flowering Plants. The New York Botanical Garden. Second Edition, 557p., 1988.
- CUTTER, E.G. Anatomia Vegetal: Experimentos e Interpretação. v.2. Órgãos. São Paulo: Roca, 1987. 336p.
- DUNBAR, B.S.; SKINNER, S.M. Preparation of monoclonal antibodies. In: Methods in Enzymology / Guide to Protein Purification. Edited by: Murray P. Deutscher. Academic Press, Inc. 1990-a. 894p.
- DUNBAR, B.S.; SKINNER, S.M. Preparation of polyclonal antibodies. In: Methods in Enzymology / Guide to Protein Purification. Edited by: Murray P. Deutscher. Academic Press, Inc. 1990-b. 894p.
- ESAU, K. Anatomia da Planta com Sementes. São Paulo: Edgard Brücher. 283p., 1976.



- ESTRADA, R.; TOVAR, P.; DODDS, J.H. Induction of *in vitro* tubers in a broad range of potato genotypes. *Plant Cell, Tissues and Organ Culture*. Dordrecht, v.7, n.1, p.3-10., Jan. 1986.
- FAHN, A. *Plant Anatomy*. 4th ed. Oxford: Pergamon Press, 1990. 588p.
- FIGUEIREDO, S.A. *Tuberização in vitro de Ipomoea batatas (L.) Lam. Brazlândia Branca*. Lavras: UFLA, 1995. 80p. (Dissertação - Mestrado).
- FOLQUER, F. *La batata (camote): estudio de la planta y su produccion comercial*. San Jose, 1978. 144p.
- GARFIN, D.E. Isoelectric focusing In: *Methods in Enzymology / Guide to Protein Purification*. Edited by: Murray P. Deutscher. Academic Press, Inc. 1990-a. 894p.
- GARFIN, D.E. One-dimensional gel electrophoresis In: *Methods in Enzymology / Guide to Protein Purification*. Edited by: Murray P. Deutscher. Academic Press, Inc. 1990-b. 894p.
- GARNER, N.; BLAKE, J. The induction and development of potato microtubers *in vitro* on media free of growth regulating substances. *Annals of Botany*, London, v.63, n.6, p.663-674, June 1989.
- HARLOW, E.; LANE, D. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988. 726p.
- HATTORI, T.; FUKUMOTO, H; NAKAGAWA, S.; NAKAMURA, K. Sucrose-induced expression of genes coding for the tuberous root storage protein, sporamin, of sweet potato in leaves and petioles. *Plant and Cell Physiology*, Osaka, v.32, n.1, p.79-86, Jan 1991.
- HATTORI, T.; NAKAGAWA, T.; MAESHIMA, M.; NAKAMURA, K.E. ASAHI, T. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for sporamin, the major soluble protein of sweet potato tuberous roots. *Plant Molecular Biology*, Dordrechst, v.5, n.2, p.313-320, 1985.

- HATTORI, T.; YOSHIDA, N.; NAKAMURA, K. Structural relationship among the members of a multigene family coding for the sweet potato tuberous root storage protein. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.13, n.2, p.563-572, 1989.
- HATTORI, T.; NAKAGAWA, T.; NAKAMURA, K. High-level expression of tuberous root storage protein genes of sweet potato in stems of plantlets grown *in vitro* on sucrose medium. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.14, n.3, p.595-604, 1990.
- HAUMAN, Z. Systematic botany and morphology of the sweet potato plant. Lima: International Potato Center, n.25, FEB. 1992. 22p. (Technical Information).
- HORGAN, R. Cytokinins. IN: WILKINS, M. B. **Advanced plant physiology**. London: Pitman Press, 1984. p.53-70.
- HORTON, D., PRAIN, G.; GREGORY, P. Retornos de la inversión de alto nivel de investigación y el desarrollo de la batata en el mundo. **Centro Internacional de la Papa**, 1989. vol.17, n.3, p.1-11.
- HUSSEY, G.; STACY, N.J. Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Annals of Botany**, London, v.53, n.4, p.565-578, April 1984.
- JACKSON, S.D.; WILLMITZER, L. Jasmonic acid spraying does not induce tuberization in short-day-requiring potatoes species kept in non-inducing conditions. **Planta**, Springer-Verlag, Berlin, v.194, p.155-159, 1994.
- JEAN, M.; CAPPADOCIA, M. *In vitro* tuberization in *Dioscorea alata* L. "Brazo fuerte" and "Florida" and *D. abyssinica* Hoch. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.26, p.147-152, 1991.
- KODA, Y.; KIKUTA, Y. Possible Involvement of Jasmonic Acid in Tuberization of Yam Plants. **Plant and Cell Physiology**, Osaka, v.32, n.5, p.629-633, 1991.
- KODA, Y.; KIKUTA, Y.; KITAHARA, T.; NISHI, T.; MORI, K. Comparisons of various biological activities of stereoisomers of methyl jasmonate. **Great Britain**, v.31, n.4, p.1111-1114, 1992.

- KODA, Y.; OKAZAWA, Y. Influences of environmental, hormonal and nutritional factors on potato tuberization *in vitro*. **Japanese Journal Crop Science**, Tóquio, v.52, p.582-591, 1983.
- KODA, Y.; OKAZAWA, Y. Detection of Potato Tuber-Inducing Activity in Potato Leaves and Old Tubers. **Plant and Cell Physiology**, Osaka, v.29, n.6, p.969-974, 1988.
- MAESHIMA, M.; SASAKI, T.; ASAHI, T. Characterization of major proteins in sweet potato tuberous roots. **Phytochemistry**, Oxford, v.24, n.9, p.1899-1902, 1985.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. Molecular cloning. A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory**, 1982. 545p.
- MANTELL, S.H.; HUGO, S.A. Effects of photoperiod, mineral medium strength, inorganic ammonium, sucrose and cytokinin on root, shoot and microtuber development in shoot and microtuber development in shoot cultures of *Dioscorea alata* and *Dioscorea bulbifera* L. yams. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.16, n.1, p.23-42, Jan 1989.
- MARTIN, F.W. Technique for Rooting Sweet Potato Leaves. **HortScience**, Alexandria, v.17, n.3, p.395-396, 1982.
- MATSUKI, T.; TAZAKI, H.; FUJIMORI, T.; HOGETSU, T. The Influence of Jasmonic Acid Methyl Ester on Microtubules in Potato Cells and Formation of Potato Tubers. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v.56, n.8, p.1329-1330, 1992.
- MAYER, R.J.; WALKER, J.H. Immunochemical Methods in the Biological Sciences: Enzymes and Proteins. **Academic Press**, London, 1980. 168p.
- MCDAVID, C.R.; ALAMU, S. The effect of growth regulators on tuber initiation and growth in rooted leaves of two sweet potato cultivars. **Annals of Botany**, London, v.45, n.3, p.363-364, 1980.
- MINGO-CASTEL, A.M.; YOUNG, R.E.; SMITH, O.E. Kinetin-induced tuberization of potato *in vitro*: on the mode of action of kinetin. **Plant and Cell Physiology**, Osaka, v.17, n.2, p.557-570, 1976.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review Plant Physiology*, Palo Alto, v.25, p.135-166, 1974.
- NAKATAMI, M. *In Vitro* Formation of Tuberos Roots in Sweet Potato. *Japanese Journal of Crop Science*, Tóquio, v.63, n.1, p.158-159, March 1994.
- NG, S.Y.C. *In vitro* tuberization in white yam (*Dioscorea rotundata* Poir). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Dordrecht, v.14, n.2, p.121-128, Jan. 1988.
- PAIVA, E.; LISTER, R.M.; PARK, W.D. Induction and accumulation of major tuber protein of potato in stems and petioles. *Plant Physiology*, Maryland, v.71, n.1, p.161-168, Jan. 1983.
- PALMER, C.E.; BARKER, W.G. Changes in enzyme activity during elongation and tuberization of stolons of *Solanum tuberosum* L. cultured *in vitro*. *Plant and Cell Physiology*, Osaka, v.13, p.681-688, 1972.
- PALMER, C.E.; SMITH, O.E. Cytokinins and tuber initiation in the potato *Solanum tuberosum* L. *Nature*, London, v.221, n.18, p.279-280, 1969.
- PALMER, C.E.; SMITH, O.E. Effect of kinetin on tuber formation on isolated stolons of *Solanum tuberosum* L. cultured *in vitro*. *Plant Cell Physiology*, Osaka, v.11, p.303-314, 1970.
- PAREDES, G.E.D. *Cultura de Tecidos de Batata Doce (Ipomoea batatas L. Poir.): Propagação, Morfogênese e Variação Somaclonal*. São Paulo. 166p. 1995. (Tese - Doutorado).
- PARKER, C. Imunoassays. In: *Methods in Enzymology / Guide to Protein Purification*. Edited by: Murray P. Deutscher. Academic Press, Inc., 1990. 894p.

- PELACHO, A.M.; MINGO-CASTEL, A.M. Jasmonic Acid Induces Tubercization of Potato Stolons Cultured *In Vitro*. **Plant Physiology**, Maryland, v.97, p.1253-1255, 1991.
- ROSSOMANDO, E.F. Purification Procedures: Chromatographic Methods. In: **Methods in Enzymology / Guide to Protein Purification**. Edited by: Murray P. Deutscher. Academic Press, Inc., 1990. 894p.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant physiology**. 4th ed. Belmont: Publishing Company, 1992. 628p.
- SHARP, W.R.; EVANS, D.A.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. **Handbook of Plant Cell Culture. Crop Species**. Collier Macmillan Publishers. London, Vol.2, 644p., 1984.
- SHERMA, J. **Handbook of cromatography**. In: General data and principles. 1990. Vol. II, p.1-89.
- SIHACHAKR, D. Premiers Resultats Concernant La Multiplication Vegetative *In Vitro* De La Patata Douce (*Ipomoea batatas* L. Poir., Convolvulacea). **Agronomie Tropicale XXXVII-2**, 142-151p., 1981.
- SILVA, S.O.C.; SOUZA, A.S.; PAZ, O.P. Efeito da multiplicação vegetativa *in vitro* na produtividade de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Poir.). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v.3, n.1, p.47-52, 1991.
- STALLKNECHT, G.F. Coumarin induced tuber formation on excised shoot of *Solanum tuberosum* L. cultured *in vitro*. **Plant Physiology**, Maryland, v.50, p.412-413, 1972.
- STELLWAGEN, E. Gel filtration. In: **Methods in Enzymology / Guide to Protein Purification**. Edited by: Murray P. Deutscher. Academic Press, Inc. 1990. 894p.
- VOGEL, A.I. **Análise química quantitativa**. 5.ed. p.154-208, 1992.
- VREUGDENHIL, D.; HELDER, H. Hormonal and metabolic control of tuber formation. In: KARSSSEN, C.M., Van LOON, L.C.; VREUGDENHIL, D. eds. **Progress in Plant Groeth Regulation**. Kluwer Academic Publishers, p.393-400, 1992.

WANG, P.; HU, C. *In vitro* mass tuberization and virus-free seed-potato production in Taiwan. **American Potato Journal**, Orono, v.59, n.1, p.33-37, Jan. 1982.