

**ORGANOGENESE *IN VITRO* DE BATATA
(*Solanum tuberosum* L.) CULTIVAR
ATLANTIC VISANDO TRANSFORMAÇÃO
GENÉTICA**

RODRIGO KELSON SILVA REZENDE

2008

RODRIGO KELSON SILVA REZENDE

**ORGANOGÊNESE *IN VITRO* DE BATATA (*Solanum tuberosum* L.)
CULTIVAR ATLANTIC VISANDO TRANSFORMAÇÃO
GENÉTICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Dr. Moacir Pasqual

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Rezende, Rodrigo Kelson Silva.

Organogênese *in vitro* de batata (*Solanum tuberosum* L.) cultivar
Atlantic visando transformação genética / Rodrigo Kelson Silva Rezende.

-- Lavras : UFLA, 2008.

75 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Orientador: Moacir Pasqual

Bibliografia.

1. Micropropagação. 2. Cultivo *in vitro* 3. *Agrobacterium tumefaciens*
4. Gomesina I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD - 631.53

RODRIGO KELSON SILVA REZENDE

**ORGANOGENESE *IN VITRO* DE BATATA (*Solanum tuberosum* L.)
CULTIVAR ATLANTIC VISANDO TRANSFORMAÇÃO
GENÉTICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 6 de junho de 2008.

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva	UFLA
Dr. Edvan Alves Chagas	IAC
Prof. Dr. Adriano Bortolotti da Silva	UNIFENAS
Dra. Aparecida Gomes de Araújo	UFLA

Prof. Dr. Moacir Pasqual

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus avós,

Astolfo José da Silva (*in memoriam*)

Joselina da Silva Landim

João de Rezende Costa (*in memoriam*)

Jacinta Ribeiro Costa (*in memoriam*)

OFEREÇO.

Aos meus pais, Jofre de Rezende Costa e

Maria Aparecida Silva Rezende.

A minha irmã, Renata Kelly Silva Rezende,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Santo Expedito, por sempre guiarem meus passos e serem minha fortaleza em todos os momentos.

Aos meus pais, Jofre e “Cidinha”, e a minha irmã, “Rê”, por fazerem parte da minha vida e serem os grandes responsáveis por esta conquista. A vocês devo todo amor, carinho e respeito. **MUITO OBRIGADO POR TUDO!**

A Tathi, grande amor da minha vida, por se mostrar uma pessoa companheira, compreensiva e por ser meu “porto seguro” nos momentos em que preciso. **TE AMO!**

A todos os meus familiares, que sempre acreditaram em meu potencial e me incentivaram a seguir em frente.

À Universidade Federal de Lavras e ao CNPq, pela oportunidade da realização do doutorado e pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, professor Dr. Moacir Pasqual, pela amizade, atenção, confiança, apoio e conselhos oferecidos durante este período.

Ao professor Dr. Luciano Vilela Paiva, pela orientação durante o mestrado, co-orientação no doutorado e por fazer parte da banca avaliadora.

Aos demais membros da banca avaliadora: Dr. Edvan Alves Chagas, Prof. Dr. Adriano Bortolotti da Silva e Dra. Aparecida Gomes de Araújo, pelas valiosas sugestões para a melhoria deste trabalho.

Aos pesquisadores Dr. Marcelo Murad e Dra. Raírys Cravo Nogueira, pelo agradável convívio e por fazerem parte da banca avaliadora.

À Multiplanta, na pessoa do Dr. Marcos Paiva, pela cessão das plantas matrizes para a realização dos experimentos.

Aos professores do setor de Fisiologia Vegetal, Renato, Donizeti, Evaristo, Amauri, Ângela, Luiz Edson e Chalfun, por todos os conhecimentos transmitidos.

Aos grandes amigos que conheci no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM).

Aos laboratoristas e amigos Anderson Ramos, Anderson Tadeu, Claret, Vantuil e “Tina”, pela eficiência e boa vontade em ajudar aos companheiros de laboratório.

Aos funcionários Izonel, “Lena”, “Tanhan”, Evaristo, Joel, Odorêncio e “Barrinha”, pela grande amizade ao longo desses anos.

A todos os amigos da Fisiologia Vegetal, com quem tive a oportunidade de conviver durante minha trajetória acadêmica.

A todos os amigos da graduação e pós-graduação que estiveram comigo nesta caminhada.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

Rodrigo Kelson Silva Rezende, filho de Jofre de Rezende Costa e Maria Aparecida Silva Rezende, nasceu em 6 de abril de 1980, na cidade de Andrelândia, estado de Minas Gerais.

Concluiu o ensino médio no Colégio Nossa Senhora de Lourdes, em dezembro de 1997, na cidade de Lavras, estado de Minas Gerais.

Graduou-se Engenheiro Agrônomo pela Universidade Federal de Lavras em julho de 2003, onde foi bolsista de iniciação científica do PIBIC/CNPq, de novembro de 2000 a julho de 2003, na área de Fisiologia Vegetal.

Concluiu o mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, em agosto de 2005.

Ingressou no Doutorado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, em agosto de 2003, obtendo o título de doutor em junho de 2008.

Atualmente, é Professor da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), lotado na Faculdade de Ciências Agrárias.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL	1
1 INTRODUÇÃO	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO	5
2.1.1 Origem	5
2.1.2 Aspectos botânicos	5
2.1.3 Importância econômica da batata	6
2.1.4 Cultivar estudada	7
2.2 Cultura de tecidos vegetais	7
2.2.1 Organogênese e embriogênese	9
2.2.2 Meios nutritivos	11
2.3 Cultura de tecidos em batata (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	13
2.4 Sistema de transformação usado em batata (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	14
2.4.1 Infecção de uma planta por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15
2.4.2 Uso de plasmídeos como vetores da transformação por <i>Agrobacterium</i> ...	17
2.4.3 Transformação de batata mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	18
2.4.4 Regeneração de plantas transformadas	19
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
CAPÍTULO II: INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA E DO TIPO DE VEDAÇÃO DOS TUBOS NA REGENERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Solanum</i> <i>tuberosum</i> L. cv. ATLANTIC	31
1 RESUMO	32
2 ABSTRACT	33
3 INTRODUÇÃO	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Material vegetal	36

4.2 Regeneração <i>in vitro</i> de batata cv. Atlantic	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÕES	43
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
CAPÍTULO III: ORGANOGÊNESE <i>IN VITRO</i> VISANDO	
TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BATATA (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	
cv. ATLANTIC VIA <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	
1 RESUMO	47
2 ABSTRACT	48
3 INTRODUÇÃO	49
4 MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 Material botânico	50
4.1.2 Tipo de explantes	51
4.2 Meios de cultura.....	51
4.3. Doses do antibiótico carbenicilina sobre a taxa de regeneração de brotos e plântulas normais	53
4.4 Transformação genética de batata cv. Atlantic por <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i>	54
4.4.1 Condições de crescimento das plantas micropropagadas	54
4.4.2 Cepa de bactéria e vetor.....	55
4.4.3 Co-cultivo	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1 Indução de regeneração	59
5.2 Efeito de diferentes concentrações de carbenicilina sobre a taxa de regeneração de brotos e desenvolvimento de plântulas normais	64
5.3 Transformação genética de batata cv. Atlantic por <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i>	69
6 CONCLUSÕES	72
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

RESUMO

REZENDE, Rodrigo Kelson Silva. **Organogênese *in vitro* de batata (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Atlantic visando transformação genética.** 2008. 75 p. (Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A obtenção de cultivares comerciais de batata com resistência a fitopatógenos é uma alternativa muito promissora que a engenharia genética pode proporcionar, por meio da introdução de genes exógenos, visando transformação genética. Para tal, torna-se imprescindível estabelecer um sistema eficiente de transformação e, nesse sentido, a determinação de um protocolo de organogênese *in vitro* é o passo fundamental para este processo. Foi possível otimizar a micropropagação de batata cv. Atlantic, utilizando-se frascos contendo meio WPM vedados com tampa plástica associada a filme de PVC, resultando em plantas mais desenvolvidas. A eficiência da organogênese *in vitro* é influenciada pelo tipo de explante e pelo tipo e pelas concentrações de reguladores de crescimento utilizados. Segmentos internodais de batata cv. Atlantic apresentam melhor capacidade organogenética que explantes foliares. Recomenda-se utilizar o meio WPM, suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de ANA + 5,0 mg L⁻¹ de ZEA, para se obter brotações em segmentos internodais. A carbenicilina (Cb) adicionada a este meio potencializa esta formação. Para o processo de alongamento de brotos, este mesmo antibiótico, quando adicionado ao meio WPM em concentrações crescentes (100, 250 e 500 mg L⁻¹), promove diminuição na altura de plantas, no número de nós e no comprimento radicular. Após o co-cultivo de segmentos internodais com *Agrobacterium tumefaciens*, estas concentrações de Cb não são eficientes na eliminação da bactéria, o que compromete a organogênese. No entanto, foi possível estabelecer um protocolo de organogênese *in vitro* de batata cv. Atlantic, a partir de segmentos internodais não co-cultivados. Estes resultados serão úteis para futuros experimentos de transformação genética com esta e outras cultivares comerciais de batata.

* Comitê Orientador: Dr. Moacir Pasqual – UFLA (Orientador), Dr. Luciano Vilela Paiva (Co-Orientador) – UFLA.

ABSTRACT

REZENDE, Rodrigo Kelson Silva. ***In vitro* organogenesis of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Atlantic for the genetic transformation.** 2008. 75 p. (Doctor Program in Agronomy/Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The obtaining of commercial cultivars of potato with resistance to the phytopathogen is a very promising alternative that the genetic engineering can provide, through the introduction of exogenous genes for the genetic transformation. In order to establish an efficient system of transformation, it is crucial first to optimize *in vitro* organogenesis protocol. It was possible to optimize the micropropagation of potato cv. Atlantic, being used vessels containing WPM medium, prohibited with plastic cap associated to PVC film, resulting in plants more developed. The efficiency of the *in vitro* organogenesis is influenced by the explant type and for the kind and concentrations of growth regulators used. Shoots segments of potato cv. Atlantic present better organogenesis capacity than leaf explants. It is recommended to use the WPM medium supplied with 1,0 mg L⁻¹ of NAA + 5,0 mg L⁻¹ of ZEA, to obtain shoots in shoots segments, and the carbenicilin (Cb) added to this medium increased this formation. For the process to enlarge shoots, this same antibiotic when added to the WPM medium in growing concentrations (100, 250 and 500 mg L⁻¹) promoted a decrease in the height of plants, number of shoots and length roots. After the co-cultivation of shoots segments with *Agrobacterium tumefaciens* these concentrations of Cb are not efficient in the elimination of the bacteria, what commits the organogenesis. However, it was possible to establish a protocol of *in vitro* organogenesis of potato cv. Atlantic starting from shoots segments not co-cultivated. These results will be useful for futures experiments of genetic transformation with this and another commercials cultivars of potato.

* Guidance Committee: Dr. Moacir Pasqual – UFLA (Adviser), Dr. Luciano Vilela Paiva (Co-Adviser) – UFLA.

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é considerada a quarta fonte de alimento da humanidade, após arroz, trigo e milho. É cultivada em todo o mundo e, em alguns países, o consumo está em torno de 75-95 kg per capita/ano (Fontes, 2005).

Trata-se de uma das mais importantes oleráceas cultivadas no Brasil. A área plantada no país está em torno de 141.000 hectares e a produção ao redor de 3,2 milhões de toneladas (ANUÁRIO DE AGRICULTURA BRASILEIRA - Agriannual, 2006).

Um dos maiores problemas da cultura da batata é a susceptibilidade de cultivares comerciais a patógenos (por exemplo, *Phytophthora infestans*, *Alternaria solani*, *Xanthomonas* sp. e *Erwinia carotovora subsp. carotovora*), ocasionando queda da produtividade. Dessa forma, a introdução de genes exógenos em cultivares comerciais de batata, por meio da engenharia genética, apresenta grande potencial, tanto para estudos básicos quanto para o melhoramento desta espécie.

Os programas de melhoramento convencional de batata, para a obtenção de novas cultivares resistentes, confrontam-se com dificuldades que começam com a complexidade genética das cultivares comerciais, as quais são tetraplóides e altamente heterozigotas. Isso se soma ao caráter essencialmente conservador de muitos produtores e industriais em dar preferência às cultivares tradicionais já estabelecidas, mesmo que as novas possam apresentar vantagens comparativas, como a presença de genes de resistência a doenças causadas por microrganismos.

A batata apresenta características favoráveis importantes para a transformação genética, tais como susceptibilidade à infecção por

Agrobacterium tumefaciens – sistema de transferência de genes mais utilizado para espécies dicotiledôneas – e a relativa facilidade com que plantas transgênicas têm sido regeneradas a partir de diferentes explantes, por meio de diferentes técnicas de cultura de tecidos. Além disso, o modo de propagação desta espécie, vegetativamente, permite que a expressão clonal de um indivíduo transformante de batata ocorra sem variação epistática da expressão do transgene, a qual, muitas vezes, ocorre durante a propagação sexual (Vayda & Belknap, 1992).

Atualmente, a utilização de peptídeos antimicrobianos tem se mostrado com grande potencial para aplicações em humanos, outros animais e em plantas (Silva et al., 2000).

Em geral, os peptídeos antimicrobianos são moléculas pequenas, de até 5 kDa, que apresentam amplo espectro de atividade contra bactérias, fungos, vírus e parasitas. O mecanismo de ação mais bem conhecido é por meio de sua inserção na membrana celular, o que causa a destruição ou a permeabilização da mesma, levando o microrganismo à morte.

Neste contexto, pode-se destacar o gene que codifica para o peptídeo antimicrobiano gomesina, o qual pode ser encontrado na hemolinfa da aranha-caranguejeira (*Acanthoscurria gomesiana*). A gomesina apresenta amplo espectro de atividade antimicrobiana (fungos e bactérias), causadora de várias doenças em culturas de interesse econômico. Em relação à batata, pode-se citar, por exemplo, a podridão mole causada por *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, responsável por grandes perdas de produtividade.

A obtenção de cultivares comerciais de batata com resistência a fitopatógenos é uma alternativa muito promissora que a engenharia genética pode proporcionar, por meio da introdução de genes exógenos mediante a transformação genética.

A técnica de cultivar tecidos de plantas *in vitro* tem servido como ferramenta em diversas áreas da agricultura. Particularmente para a cultura da batata, esta técnica pode ser muito útil quando se pretende trabalhar com transformação genética desta espécie, visto que é o passo fundamental para esse processo.

Embora existam inúmeros trabalhos relacionados à melhoria do processo de multiplicação *in vitro* de diferentes espécies de plantas, em batata são poucos os relatos que mencionam a influência das características iniciais dos explantes sobre o desenvolvimento e a multiplicação *in vitro* (Levin et al., 1997; Lorenzo et al., 1998; Guerra et al., 1999; Pereira & Fortes, 2003).

Este trabalho é parte inicial de um projeto que visa à obtenção de plantas transgênicas de diferentes cultivares de batata com resistência a fitopatógenos por meio de engenharia genética. O objetivo é obter plantas transformadas contendo o gene que codifica para o peptídeo antimicrobiano gomesina. Este projeto está sendo realizado no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em parceria com o Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen/Embrapa -DF).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo eficiente de organogênese *in vitro* de batata cv. Atlantic, visando transformação genética.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Espécie em estudo

2.1.1 Origem

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é originada dos Andes, próximo à fronteira entre o Peru e a Bolívia, onde é cultivada desde a antiguidade. No processo de dispersão, foi levada para a Europa, sendo introduzida na Espanha e na Inglaterra nos anos de 1570 e 1588, respectivamente. Da Europa, a batata foi levada para a América do Norte, a África do Sul e a Austrália, no início do século XVIII, só chegando ao Brasil no final do século XIX (Fedalto, 1982; Hawkes, 1994).

A batata pertence à família *Solanaceae*, ao gênero *Solanum* e tem número básico de cromossomos igual a 12. Porém, há espécies com diversos graus de ploidia, variando de diplóide ($2n = 24$) a hexaplóide ($2n = 72$). A espécie *Solanum tuberosum* é tetraplóide e a mais cultivada. A partir dela, foram diferenciadas as subespécies *tuberosum* e *andigena*, das quais a *Solanum tuberosum* spp. *tuberosum* se tornou o alimento universal (Fontes, 2005).

2.1.2 Aspectos botânicos

A batateira é uma planta herbácea, dicotiledônea, anual, que possui raiz, caule aéreo, caule subterrâneo (estólion e tubérculo), folha e flores hermafroditas de coloração branca, arroxeadas ou rosadas. Normalmente, são autopolinizadas, embora possam apresentar polinização cruzada, às vezes, em nível bastante elevado (Filgueiras, 2003).

O tubérculo é a ponta intumescida do caule subterrâneo, na qual são acumuladas substâncias de reserva. É também a forma de reprodução e a parte

comercial da planta. Cerca de 77% do tubérculo é constituído de água e 19%-20% de carboidratos, dos quais destacam-se amido, açúcares não redutores (sacarose) e redutores (glicose e frutose), celulose, pectinas e gomas. Também são encontrados proteínas e vitaminas, minerais, glicoalcalóides e lipídeos (Fontes, 2005).

As características dos tubérculos é que determinam sua aceitação por parte do consumidor, principalmente as externas, como coloração da película externa, da polpa e o formato, alongado ou arredondado. O consumidor brasileiro é considerado, por observadores externos, um dos mais exigentes quanto ao aspecto do tubérculo (Filgueiras, 2003).

2.1.3 Importância econômica da batata

Nos últimos 10 anos, a produção mundial de batata, nos países em desenvolvimento, particularmente na Ásia, teve aumento de 4,5% na média anual, superando, em crescimento, a produção de muitos outros produtos alimentares importantes.

A cultura da batata ocupa a quarta posição, em importância econômica no mundo, com produção anual de 323 milhões de toneladas. A Ásia é a maior região produtora (41,24%), seguida da Europa (40,97%), América do Norte (7,4%), África (4,8%) e América do Sul (4,3%). Em relação aos países, a China é o maior produtor, com 70 milhões de toneladas, seguida de Rússia, Índia, Estados Unidos e Ucrânia, com produções de 38,5; 24; 19,4 e 19,7 milhões de toneladas, respectivamente. Na América do Sul, o Peru tem a maior produção anual (3,3 milhões de toneladas), seguido de perto pelo Brasil, com, aproximadamente, 3 milhões de toneladas e pela Argentina, com 2,4 milhões de toneladas (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO - FAO, 2007).

O Brasil possui elevado potencial edafoclimático para o cultivo da batata que, em geral, é produzida com alto nível tecnológico. Em 2006, a produção foi de 3,137 milhões de toneladas em uma área de 140,7 mil hectares, colocando o Brasil como 12º maior produtor em cultivo de batata. Os estados de Minas Gerais (30%), Paraná (26%), São Paulo (20%) e Rio Grande do Sul (13%) são responsáveis pela maior parte da produção nacional (Agriannual, 2006). Nos últimos 15 anos, a produção de batata por hectare cresceu, em média, 5% ao ano, aumentando, assim, a produção média para 14 a 22 toneladas por hectare (FAO, 2007).

2.1.4 Cultivar estudada

A cultivar Atlantic foi desenvolvida no Maine Department Agriculture, Estados Unidos (1978), a partir do cruzamento entre ‘B 5141-6 (Lenape)’ e ‘Wauseon’. Em relação aos caracteres descritivos, essa cultivar possui tubérculos com formato oval-arredondado, película branca, meio áspera, olhos e inserção de estolho meio-profundo e polpa branca. É uma planta de médio a alto porte, com folhas verdes brilhantes, flores e gema vermelho-violeta. Quanto às doenças, é muito susceptível à requeima, ao vírus Y e à murchadeira e pouco susceptível à sarna comum. Quanto à sua utilidade, é específica para processamento na forma de rodela fritas (chips), de produção industrial.

2.2 Cultura de tecidos vegetais

Cultura de tecidos vegetais, ramo da biotecnologia, é um conjunto de técnicas de crescimento de células, tecidos e órgãos em um meio nutritivo artificial, isolados da planta-mãe (George, 1996). O cultivo de tecidos vegetais *in vitro* pode minimizar os efeitos da variação de fatores ambientais, assim como

se pode conseguir maior controle sobre as condições de temperatura, luz e nutrientes.

Nesta técnica, pequenos fragmentos de tecido vivo, chamado explantes, são isolados de um organismo vegetal, desinfestados e cultivados assepticamente por períodos indefinidos em um meio de cultura apropriado. O objetivo é obter nova planta, idêntica à original, ou seja, realizar uma clonagem vegetal, que é definida como uma propagação assexuada de células ou organismos, de modo a obter novo indivíduo, mantendo-se o genótipo idêntico àquele do ancestral (Torres et al., 2000).

Um explante pode ser fragmento de folha, raiz, caule ou qualquer outro tecido que responda às condições de indução do meio de cultura, com vistas à regeneração vegetal *in vitro* (Torres et al., 2000). Essa regeneração é fundamentada na capacidade de a proliferação das células vegetais organizarem-se em tecidos e, eventualmente, em plantas completas (Kerbaudy, 1997; Mantell et al., 1994). Essa capacidade é denominada totipotência e considera que as células vegetais manifestam, em momentos diferentes e sob estímulos apropriados, a potencialidade de iniciar novo indivíduo multicelular (Torres et al., 2000). Teoricamente, considera-se que todas as células vegetais sejam capazes de expressar sua totipotência. No entanto, os explantes são uma mistura de células em variados estados fisiológico, bioquímico e de desenvolvimento. Nesse sentido, espera-se que a exposição desses explantes a um ambiente *in vitro* estimule reações diversificadas nos diferentes tipos celulares, fazendo com que somente algumas células desse explante respondam às condições de cultura *in vitro*, levando à regeneração de um novo indivíduo (Mantell et al., 1994).

Essa habilidade que uma célula ou um grupo de células têm ao responder a um estímulo indutivo, visando a um processo de desenvolvimento, é denominada competência (Torres et al., 2000). Existem três fatores que afetam a regeneração da planta *in vitro*: o genótipo (qual espécie, cultivar ou variedade

está sendo utilizada), a fonte de explantes (folha, raiz, caule, meristema, etc.) e a condução da cultura (meio de cultura, luz, temperatura, recipiente). O sucesso da iniciação e da regeneração da cultura *in vitro* depende da decisão correta no estabelecimento de todos esses fatores.

Na realidade, muito ainda precisa ser conhecido sobre os mecanismos de hormônios vegetais e sobre os processos que controlam o desenvolvimento das plantas (Caldas et al., 1998).

A escolha do genótipo a ser utilizado na cultura de tecidos vai depender dos objetivos experimentais. É interessante notar que variedades de uma mesma espécie respondem de maneira diferente às condições de cultivo. No entanto, alguns autores consideram que toda espécie e toda cultivar são capazes de responderem à combinação correta dos fatores que afetam a regeneração *in vitro* e, assim, produzir o resultado esperado (Mantell et al., 1994).

A fonte de explante também é fator importante no sucesso da regeneração *in vitro*, pois a capacidade de regeneração depende da maturidade, do estado fisiológico e do tecido utilizado (Andrade, 2002). Segundo Pereira (2005), a homogeneidade dos explantes no momento inicial do cultivo é de fundamental importância para o sucesso da cultura. Por exemplo, uma folha em senescência já perdeu grande parte de seus nutrientes e está em processo degenerativo, não sendo uma boa fonte de explante. De modo geral, tecidos jovens e em crescimento são utilizados como fonte de explante (Andrade, 2002).

2.2.1 Organogênese e embriogênese

Organogênese é uma via de desenvolvimento na qual órgãos vegetais (brotos, raízes ou ambos) são induzidos à diferenciação a partir de uma ou várias células. A organogênese pode ser direta ou indireta. Na direta, também chamada adventícia, o órgão vegetal é induzido e se desenvolve diretamente de um explante, isto é, sem passar por uma fase inicial de calo. Na indireta, há uma fase

inicial de proliferação e de crescimento de calo, seguida por indução de brotos ou raízes e o desenvolvimento desses tecidos (Mantell et al., 1994). Segundo Handro & Floh (1990), uma das respostas mais comuns induzidas em um tecido cultivado é a formação de calos.

O calo corresponde a uma massa de células desorganizadas e parcialmente indiferenciadas, que variam quanto ao tipo, ao tamanho, ao conteúdo celular e à espessura da parede.

Pesquisas com calos formados a partir de fragmentos de caules, folhas e raízes são realizadas, principalmente, para determinar as condições de incubação que os explantes requerem para sobreviver e crescer e para estudar o desenvolvimento celular, explorar produtos provenientes do metabolismo primário e secundário e obter suspensão celular e propagação, com a formação de gemas ou de embriões somáticos (Siqueira & Inoue, 1992).

A embriogênese somática é uma via de desenvolvimento na qual a formação de embriões é induzida a partir de células somáticas. Como a organogênese, a embriogênese somática pode ocorrer diretamente de um explante sem o aparecimento de calos. Entretanto, a via de embriogênese indireta, na qual embriões somáticos são induzidos e desenvolvidos de proliferações de calos, é a mais comum. Assim como ocorre na organogênese, certo período de tempo é necessário para desdiferenciar e obter competência para a via embriogênica, iniciada de uma cultura celular (Mantell et al., 1994).

Outra via de regeneração é a micropropagação, tomando como base explantes meristemáticos. Essa via tem a vantagem de as plantas regenerarem-se diretamente de um tecido organizado, sem a necessidade do estágio de calo. Desse modo, tem-se uma economia de tempo e elimina-se a variação somaclonal, que está associada a longos períodos de cultura de calos. A variação somaclonal é uma variação genética espontânea de plantas regeneradas de

cultura de células ou tecidos *in vitro*, a qual é indesejada quando o objetivo é obter uma planta idêntica à planta matriz (Mantell et al., 1994).

A regeneração de plantas por organogênese ou embriogênese somática, direta ou indireta, normalmente, requer uma fase de macropropagação, ou aclimatização, depois que as plântulas são produzidas. Essa fase envolve a exposição das plantas ao ambiente externo, que possui umidade relativa mais baixa e variações das condições de luz e temperatura. Depois do crescimento sustentável nesse meio ambiente, as plântulas podem ser colocadas em casa de vegetação (Mantell et al., 1994).

2.2.2 Meios nutritivos

Torres et al. (2001) descrevem que o meio de cultura é constituído de componentes essenciais (água, sais inorgânicos, fonte de carbono e energia, vitaminas e reguladores de crescimento) e opcionais (aminoácidos, amidas, ácidos orgânicos e substâncias naturais complexas). A composição do meio de cultura tem importante papel nas respostas de crescimento de células e de tecidos *in vitro* (Borgatto et al., 2002).

As plantas ou explantes cultivados *in vitro* têm exigências nutricionais específicas. Assim, ao excisar parte da planta para cultivo *in vitro*, observa-se que os explantes não são completamente autotróficos e requerem meios nutritivos suplementados com as necessidades exógenas da célula, em termos de elementos essenciais, constituintes orgânicos e energia (Torres et al., 2001).

Segundo George (1996), entre os meios mais utilizados no cultivo *in vitro*, há o MS, desenvolvido por Murashige & Skoog (1962) e o WPM (do ingl. *Wood Plant Medium*), formulado por Lloyd & McCown (1980).

O melhor crescimento de células e tecidos de plantas em meio MS é, em grande parte, devido à alta concentração de amônio e nitrato. Além do nitrogênio, o potássio encontra-se também em altas concentrações. A alta

concentração de sais encontrados neste meio tem proporcionado ganhos significativos no crescimento de diversas espécies *in vitro*. Uma das críticas feitas a este meio refere-se ao baixo nível de fosfato que, para alguns pesquisadores, é insuficiente para sustentar o crescimento das culturas (Pasqual et al., 1998).

O meio WPM foi desenvolvido para a cultura de brotações em plantas lenhosas. Apresenta 25% das concentrações de íons nitrato e amônia do meio MS, além de maior concentração de potássio e alto nível de íons sulfato (Pasqual et al., 1998).

Os meios de cultura podem ser, ainda, modificados de acordo com a necessidade de cada tipo de explante e a espécie com a qual se está trabalhando, sendo importante deter o conhecimento da importância de cada elemento contido em um meio de cultivo (Torres et al., 2001).

A adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura visa suprir as possíveis deficiências de fitormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras da planta matriz. As auxinas têm sido amplamente utilizadas nos meios de cultivo para a indução de calos e, geralmente, dependendo da concentração, causam alongamento celular e expansão ou divisão celular.

Dentre as citocininas, a 6-benzilaminopurina (BAP) e a zeatina ribosídeo (ZEA) têm sido utilizadas para a formação de grande número de brotos e alta taxa de multiplicação em muitos sistemas de micropropagação.

A interação entre auxinas e citocininas é muito utilizada para a indução de calogênese (Torres et al., 1998).

Outras classes de hormônios vegetais, como as giberelinas, o etileno e o ácido abscísico ou, mesmo, substâncias que não sejam propriamente hormônios, como poliaminas, ácido salicílico e jasmonatos também são, muitas vezes, utilizados em processos de regeneração por organogênese. Existe considerável

número de evidências de que o efeito dessas substâncias é indireto, por meio da alteração do balanço auxina/citocinina endógeno. O próprio efeito das auxinas e das citocininas aplicadas ao meio de cultura parece ser, na verdade, o reflexo dessas substâncias alterando os balanços endógenos de auxina/citocininas nas células vegetais (Peres & Kerbauy, 1999).

A morfogênese de calos nem sempre leva à formação de plântulas viáveis. Embora brotos e raízes possam ser emitidos, pode não ocorrer uma conexão vascular entre eles, o que é de extrema necessidade para a viabilização da plântula (Wetmore & Rier, 1963).

2.3 Cultura de tecidos em batata (*Solanum tuberosum* L.)

A micropropagação de plantas, junto com a transformação genética, vem sendo aplicada rotineiramente a um grande número de espécies de importância econômica, como a batata, e representa uma das formas mais viáveis de propagar plantas isentas de doenças. Contudo, os resultados são, muitas vezes, divergentes e nem sempre é possível a reprodução dos mesmos pela necessidade de a cultura de tecidos, como técnica de propagação vegetativa, ser adaptada às necessidades de cada espécie e cultivar. Isto porque essas necessidades diferem entre si, podendo apresentar resultados diferentes sob as mesmas condições de cultivo, o que indica que, provavelmente, a regulação fisiológica do processo de regeneração é cultivar dependente (Pereira & Fortes, 2003).

Uma das possíveis causas nas diferenças de resultados obtidos, além da diferença genética entre as cultivares, para variáveis como a capacidade de regeneração e multiplicação das espécies *in vitro*, pode ser explicada pelo tipo de explante utilizado (Pierik, 1990).

Em batata, as fontes de explante incluem discos de tubérculos e de microtubérculos, discos de folhas e segmentos internodais (Campos, 1995).

Entretanto, o uso de explantes de tubérculos apresenta certas desvantagens, como: os tubérculos devem ser recentemente colhidos do campo ou de casa de vegetação; alguns genótipos de batata dão pouco ou nenhum tubérculo; o nível de ploidia da maioria das células no tubérculo é mais elevado do que no resto da planta, além de este explante oxidar facilmente quando manipulado *in vitro* e poder apresentar contaminação endógena. Em função dessas características, em métodos recentes, há uma tendência da utilização de explantes foliares ou entrenós de plantas cultivadas *in vitro* (Visser, 1991; Trinca et al., 1991; Wefels et al., 1993; Figueira Filho et al., 1994). Esses explantes superam os limites encontrados pelo uso de tubérculos, porém, uma curta fase de calo pode ocorrer.

O tipo ótimo de explante deve ser estabelecido para cada genótipo de interesse (Visser, 1991).

2.4 Sistema de transformação usado em batata (*Solanum tuberosum* L.)

Diversas técnicas de transformação de plantas foram desenvolvidas até o momento. No entanto, a técnica a ser utilizada vai depender, principalmente, do genótipo vegetal em questão.

A transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* tem sido o método mais empregado para a obtenção de plantas transgênicas de espécies dicotiledôneas, como é o caso da batata. Isso ocorre devido ao amplo espectro de hospedeiros deste grupo de plantas que são susceptíveis à infecção por bactérias do gênero *Agrobacterium* (Campos, 1995).

Agrobacterium tumefaciens é uma bactéria aeróbica gram-negativa, fitopatogena do solo, pertencente à família Rhizobiaceae. Esta bactéria movimenta-se na rizosfera, por quimiotactismo, graças a dois flagelos polares, de 2 a 4 filamentos bilaterais (Brasileiro, 1993).

2.4.1 Infecção de uma planta por *Agrobacterium tumefaciens*

Durante milhões de anos, provavelmente, linhagens patogênicas de *A. tumefaciens*, ditas oncogênicas, vêm infectando um grande número de plantas dicotiledôneas, resultando na doença conhecida por galha-da-coroa (em inglês, *crown gall*). Esta doença é caracterizada pela formação de uma galha, ou tumor, geralmente perto da união do caule com a raiz, no colo ou na coroa, após lesões superficiais sofridas neste tecido, devido a geadas, insetos, tratos culturais, etc. (Chilton, 1983). A infecção de uma planta por *Agrobacterium tumefaciens* está ilustrada na Figura 1.

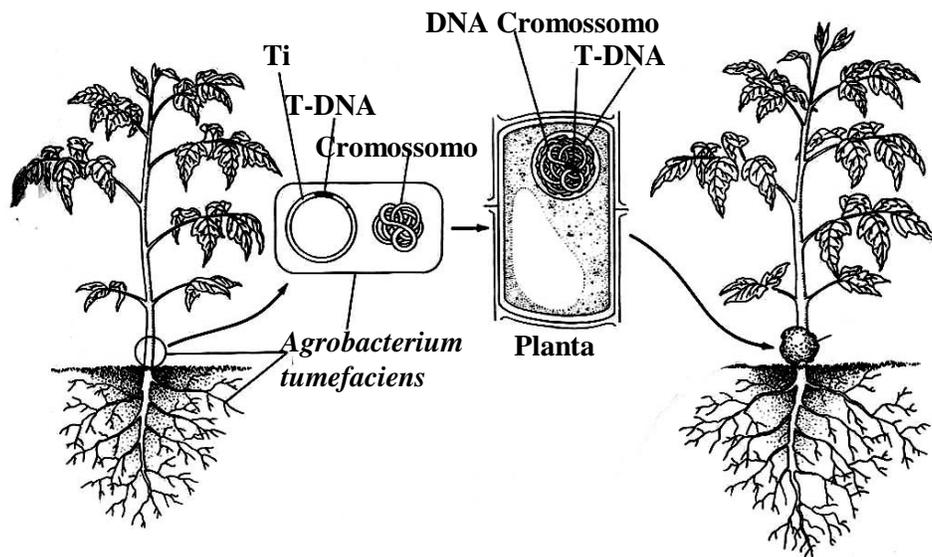


FIGURA 1 Infecção de uma planta por *Agrobacterium tumefaciens*. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Estudos realizados na década de 1970 comprovaram que o desenvolvimento deste tumor é o resultado da expressão de genes da bactéria, os quais são transferidos e integrados de forma estável no genoma vegetal. Essa capacidade de transferência de genes está associada à presença do plasmídeo Ti (em inglês, *tumor inducing*), encontrado em todas as cepas virulentas de *A. tumefaciens* (Chilton, 1983).

O plasmídeo Ti possui alto peso molecular (de 120 a 250 kb) e conta com cinco regiões funcionais identificadas. Duas dessas regiões estão diretamente envolvidas no processo de transferência de genes, que são a região-T e a região de virulência (região *vir*). A região *vir* contém genes que codificam enzimas responsáveis pela excisão e pela transferência do T-DNA da bactéria para a planta. Os genes de virulência são ativados por moléculas sinal (compostos fenólicos e monossacarídeos) que são exsudadas pelas células da planta em resposta a algum ferimento (Zambryski, 1988; Lacorte & Mansur, 1993; Brasileiro, 1993).

A região-T, denominada T-DNA (em inglês, *transferred DNA*), quando integrada ao genoma da planta, corresponde ao segmento de DNA bacteriano que é transferido para a célula vegetal. O T-DNA contém os oncogenes que codificam para enzimas envolvidas na via da biossíntese de fitormônios, além de genes para a síntese de opinas. Esta região é delimitada por duas seqüências repetidas diretas de 25 pares de bases, chamadas de fronteiras direita e esquerda, que são essenciais ao processo de infecção (Zambryski et al., 1983; Zambryski, 1988).

Os oncogenes interferem na biossíntese de fitormônios, auxinas e citocininas, levando a um desbalanço hormonal que tem como conseqüência a formação do tumor. As células transformadas passam a sintetizar opinas, que são moléculas simples, resultantes da condensação de um carboidrato com um aminoácido, as quais são secretadas para fora da célula vegetal e catabolizadas

especificamente pela bactéria infectante como fonte de energia (Zambryski, 1988; Lacorte & Mansur, 1993).

Este processo infectivo representa uma forma natural de engenharia genética e seu entendimento foi o ponto de partida para pesquisas intensivas sobre as possibilidades de sua utilização como sistema para a transferência de genes em plantas (Chilton, 1983).

2.4.2 Uso de plasmídeos como vetores da transformação por *Agrobacterium*

Embora a formação do tumor seja a consequência da expressão dos genes do T-DNA integrado no genoma vegetal, estes genes não participam diretamente nos processos de transferência e integração, para os quais apenas a região *vir* e as fronteiras do T-DNA, constituídos por seqüências repetidas de 25 pares de base, são essenciais (Lacorte & Mansur, 1993). Os oncogenes, portanto, podem ser deletados, por meio de um processo de dupla recombinação, produzindo linhagens “desarmadas”, sem que ocorram alterações no processo de transformação. Linhagens desarmadas mantêm a região *vir* funcional, sendo os oncogenes do T-DNA original substituídos por genes marcadores e de interesse para a planta, flanqueados pelas seqüências repetidas indispensáveis ao processo de referência (Zambryski et al., 1983).

Os fatores essenciais para o uso de plasmídeos como vetores para a transformação de plantas são um T-DNA, contendo os genes de interesse, sob controle de um promotor que se expressa eficientemente em plantas e de um terminador transcripcional, para finalizar a expressão do gene exógeno e os elementos genéticos da bactéria, necessários à transferência e à integração do T-DNA modificado no cromossomo da planta. Além desses, genes marcadores de seleção também são introduzidos na região T-DNA do vetor para que células transformadas possam ser diferenciadas das não transformadas (Shah et al., 1987; Zambryski, 1988; Gasser & Fraley, 1989).

Uma vez que o gene de interesse a ser transferido para a planta está clonado em um vetor, dentro de uma cepa desarmada de *Agrobacterium*, o próximo passo é o estabelecimento de uma metodologia eficiente de transformação.

Basicamente, um protocolo de transformação por *Agrobacterium tumefaciens* envolve um período de co-cultura, que varia de 2 horas a 3 dias, no qual os explantes são cultivados com uma cepa desarmada contendo um vetor com os genes a serem introduzidos. É essencial o prévio estabelecimento de uma metodologia eficiente de regeneração de plantas, via cultura de tecidos, e de um sistema de seleção de plântulas transformadas. As células de *Agrobacterium* são indesejáveis após o período de co-cultura e devem ser eliminadas utilizando-se antibióticos (ex.: carbenicilina, timentin, etc.) no meio de cultura, a partir desse momento. O produto da expressão de um determinado gene marcador em células transformadas irá conferir a estas células resistência a um agente seletivo (antibiótico ou herbicida) correspondente, tornando possível distingui-las das não transformadas, quando cultivadas em meio seletivo. Entretanto, os sistemas de seleção podem não ser totalmente eficientes e alguns escapes podem emergir. Uma vez enraizadas, as plântulas potencialmente transformadas são aclimatizadas e transferidas para casa de vegetação, para posteriores análises (Klee et al., 1987; Lindsey, 1992; Brasileiro, 1993).

2.4.3 Transformação de batata mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

A batata é considerada uma candidata ideal para transformação genética, devido às dificuldades associadas ao seu melhoramento, à relativa facilidade em ser geneticamente transformada e regenerada *in vitro*, além do seu modo de propagação que permite uma expansão clonal dos transformantes (Vayda & Belknap, 1992). A susceptibilidade desta espécie à infecção por *Agrobacterium*

foi demonstrada por Anand & Heberlein (1977). Desde então, vários métodos de transformação via *Agrobacterium* têm sido descritos para cultivares de batata economicamente importantes no mundo.

As primeiras tentativas de introduzir genes exógenos, por meio de *Agrobacterium*, em batata cultivares Maris Bard e Desirée, produziram plantas *in vitro* a partir de tumores, as quais foram aneuplóides e morfológicamente anormais (Ooms et al., 1987). Estudos posteriores mostraram que plantas normais podem ser obtidas após inoculação com uma cepa de *Agrobacterium* não oncogênica (Block, 1998; Sheerman & Bevan, 1988; Ishida et al., 1989; Wenzler et al., 1989).

Usando várias metodologias de transformação, batata transgênica com características agronomicamente importantes, tais como resistência a viroses (Lawson et al., 1990; Vlugt et al., 1992; Farinelli & Malnoë, 1993; Wefels et al., 1993) e a insetos (Vayda & Belknap, 1992), entre outras, tem sido relatada nos últimos anos. De acordo com Szychalla & Bevan (1993), a eficiência da transformação de batata é influenciada pela combinação dos fatores cultivar, tipo de explante, vetor e cepa de *Agrobacterium*.

2.4.4 Regeneração de plantas transformadas

Um fator importante para a obtenção de plantas transgênicas é que as células cultivadas competentes para a transformação também sejam capazes de regenerar uma nova planta. O mais efetivo gatilho biológico para despertar células potencialmente competentes para a regeneração ao estado competente, e que provavelmente afeta células potencialmente competentes para transformação, é o ferimento mecânico. Espécies de plantas diferem em resposta ao ferimento, assim como diferem tecidos de uma mesma planta (Potrykus, 1989). Em batata, a fonte de explante para a produção de plantas transgênicas

inclui discos de tubérculos e de microtubérculos, discos de folhas e segmentos internodais.

Métodos de transformação de batata têm utilizado explantes foliares ou entrenós de plantas cultivadas *in vitro* (Visser, 1991; Trinca et al., 1991; Wefels et al., 1993; Figueira Filho et al., 1994). Este explantes superam os limites encontrados pelo uso de tubérculos, porém, uma curta fase de calo pode ocorrer. Segundo Visser (1991), a probabilidade de ocorrer variação somaclonal, devido a esta fase de calo, é pequena.

Entretanto, o tipo ótimo de explante deve ser estabelecido para cada genótipo de interesse, uma vez que, após o evento de transformação com *Agrobacterium*, é necessário um protocolo eficiente de regeneração de células transgênicas, que combine com uma variação somaclonal mínima (Stiekema et al., 1988; Visser, 1991).

Os meios de cultura descritos para regenerar os diferentes explantes de batata apresentam, basicamente, a composição do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementados com combinações hormonais de zeatina ribosídeo (ZEA) ($1,0 - 3,0 \text{ mg L}^{-1}$) e ácido indol-3-acético (AIA) ($0,01 - 0,02 \text{ mg L}^{-1}$) ou de 6-benzilaminopurina (BAP) ($2,0 - 3,0 \text{ mg L}^{-1}$). Sheerman & Bevan (1988) relataram que ZEA, como citocinina, combinada com AIA ou ácido DL-aspártico, foi mais efetivo na produção de brotos transgênicos de batata do que combinações de BAP e ANA (ácido naftaleno-acético). Snyder & Belknap (1993) também regeneraram plantas transgênicas de quatro cultivares de batata (“Lemhi Russet”, “Russet Burbank”, “Wauseon”, e “Yankee Chipper”), usando diferentes combinações de ZEA e AIA.

Os regenerantes transgênicos obtidos apresentam características das cultivares parentais com elevada frequência. De acordo com Jongedijk et al. (1991), citados por Vayda & Belknap (1992), dependendo da cultivar, de 18% a 82% das plantas regeneradas retiveram 50 características comerciais da cultivar

parental. A retenção de características parentais, tais como produção, taxa de crescimento e qualidade, é possível por meio da regeneração direta de explantes co-cultivados, sem passar, portanto, pela fase de calo, o que minimiza a oportunidade para variação somaclonal.

2.5 Peptídeos antimicrobianos (gomesina)

Os peptídeos antimicrobianos são, tipicamente, moléculas anfipáticas positivamente carregadas, compostas de 12 a 45 resíduos de aminoácidos. O principal modo de ação dessas moléculas é por meio do aumento da permeabilidade da membrana plasmática (Andreu & Rivas, 1998; Hancock & Lehrer, 1998). Uma correlação direta entre o efeito antibiótico e a habilidade de permeabilização foi encontrada para defensinas, magaininas, cecropinas, batenecinas e dermaseptinas, entre outras (Andreu & Rivas, 1998).

A primeira etapa no mecanismo de ação seria a interação eletrostática entre o peptídeo positivamente carregado e os componentes negativamente carregados da membrana do microorganismo e ou parasita. Em uma etapa posterior, a interação entre a porção apolar da membrana das células e os resíduos hidrofóbicos das proteínas e peptídeos antimicrobianos culminaria na permeabilização das membranas.

Embora a maioria das proteínas e peptídeos antimicrobianos descritos seja fortemente positiva, foram descritos alguns peptídeos antimicrobianos negativamente carregados muito ativos e, provavelmente nestes casos, um modo diferente de ação pode estar envolvido (Andreu & Rivas, 1998).

Peptídeos antimicrobianos estão amplamente distribuídos nos microrganismos. A ampla ocorrência dessas substâncias sugere que elas desempenham um papel importante na imunidade contra microrganismos e outros patógenos (Boman, 1995; Ganz & Lehrer, 1999; Hoffmann et al., 1999).

A “gomesina” é um peptídeo antimicrobiano com massa molecular de 2.270 Da, apresentando 18 aminoácidos (ZCRRLCYKQRCVITYCRGRa), com quatro resíduos de cisteína envolvidos em duas pontes de dissulfeto. Este peptídeo foi isolado da hemolinfa da aranha-caranguejeira (*Acanthoscurria gomesiana*), sendo importante para a defesa desse aracnídeo contra infecções e, como tal, poderá ser usado no desenvolvimento de novas drogas para o uso na medicina e na agricultura. Segundo Silva et al. (2000), esse peptídeo apresentou amplo espectro de atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, leveduras e fungos, conforme se observa na Tabela 1.

TABELA 1 Espectro de atividade antimicrobiana da gomesina. A atividade da gomesina amidada foi comparada com a forma não amidada (Gomesin-fa) e com a androctonina, um peptídeo antimicrobiano extraído do escorpião (*Androctonus australis*). Adaptado de (Silva et al., 2000). UFLA, Lavras, MG, 2008.

Microorganisms	Minimal inhibitory concentration		
	Gomesin	Gomesin-fa	Androctonin
	μM		
Gram-positive bacteria			
<i>Aerococcus viridans</i>	0.8–1.6	0.8–1.6	0.3–0.6
<i>Bacillus cereus</i>	6.25–12.5	12.5–25	ND ^a
<i>Bacillus megaterium</i>	0.2–0.4	0.4–0.8	NM ^b
<i>Bacillus thuringiensis</i>	1.6–3.15	3.15–6.25	ND
<i>Enterococcus faecalis</i>	6.2–12.5	NM	NM
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.8–1.6	3.15–6.25	NM
<i>Micrococcus luteus</i>	0.4–0.8	0.4–0.8	0.6–1.5
<i>Pediococcus acidolactici</i>	3.15–6.25	3.15–6.25	NM
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.6–3.15	3.15–6.25	15–30
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.8–1.6	3.15–6.25	NM
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0.8–1.6	1.6–3.15	NM
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0.8–1.6	1.6–3.15	NM
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1.6–3.15	3.15–6.25	NM
<i>Nocardia asteroides</i>	1.6–3.15	3.15–6.25	NM
Gram-negative bacteria			
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	ND	ND	ND
<i>Alcaligenes faecalis</i>	>100	NM	NM
<i>Escherichia coli</i> 1106	0.8–1.6	1.6–3.15	6–15
<i>Escherichia coli</i> D22	0.4–0.8	0.4–0.8	6–15
<i>Escherichia coli</i> D31	0.8–1.6	0.8–1.6	3–6
<i>Escherichia coli</i> SBS363	0.4–0.8	0.4–0.8	NM
<i>Erwinia carolovorora carolovorora</i>	3.15–6.25	3.15–6.25	ND
<i>Enterobacter cloacae</i> β 12	3.15–6.25	6.25–12.5	ND
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3.15–6.25	6.25–12.5	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.6–3.15	1.6–3.15	NM
<i>Salmonella thyphimurium</i>	0.8–1.6	0.8–1.6	3–6
<i>Serratia marcescens</i> Db11	ND	ND	ND
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>orizae</i>	3.15–6.25	6.25–12.5	ND
Fungi			
<i>Alternaria brassicola</i>	0.4–0.8	0.4–0.8	3–6
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1.6–3.15	1.6–3.15	25–50
<i>Beauveria bassiana</i>	12.5–25	25–50	NM
<i>Fusarium culmorum</i>	0.4–0.8	0.4–0.8	3–6
<i>Fusarium oxysporum</i>	0.4–0.8	0.8–1.6	6–12
<i>Neurospora crassa</i>	0.4–0.8	0.4–0.8	6–12
<i>Nectria haematococca</i>	0.2–0.4	0.2–0.4	6–12
<i>Trichoderma viridae</i>	0.4–0.8	0.4–0.8	6–12
<i>Tricophyton mentagrophytes</i>	0.8–1.6	0.8–1.6	NM
Yeasts			
<i>Candida albicans</i>	0.15–0.3	0.15–0.3	1.6–3.15
<i>Candida glabrata</i>	12.5–25	12.5–25	NM
<i>Candida tropicalis</i>	3.15–6.25	NM	NM
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0.8–1.6	NM	NM
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.6–3.15	1.6–3.15	NM

^a ND means not detected in the range of the concentrations tested up to 100 μM (gomesin) and 50 μM (androctonin).

^b NM means not measured.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUÁRIO DE AGRICULTURA BRASILEIRA. São Paulo: FNP Consultoria, 2006. p. 200-204.

ANAND, V. K.; HEBERLEIN, G.T. Grown gall tumorigenesis in potato tuber tissue. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 64, n. 2, p. 153-158, Mar. 1977.

ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais.** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2002. 41 p. (Embrapa. Documentos, 46).

ANDREU, D.; RIVAS, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. **Bipolymers**, New York, v. 47, n. 6 , p. 415-433, Nov. 1998.

BLOCK, M. de. Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.76, n. 5, p.767-774, 1988.

BOMAN, H. G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 13, p. 61-92, 1995.

BORGATTO, F.; DIAS, C. T. dos S.; AMARAL, A. F. C.; MELO, M. Calcium, potassium and magnesium treatment of *Chrysanthemum morifolium* cv. “Bi Time” and callogenesis *in vitro*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 4, p. 669-693, out./dez. 2002.

BRASILEIRO, A. C. M. Biologia de *Agrobacterium* sp. **ABCTP Notícias**, Brasília, v. 20, p. 2-6, 1993.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. p. 87-132.

CAMPOS, M. A. **Sistema de transformação de batata (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Baronesa mediado por *Agrobacterium tumefaciens*.** 1995. 93 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitomelhoramento) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

CHILTON, M.D. A vector for introducing new genes into plants. **Scientific American**, New York, v. 248, n. 5, p.36-45, Nov. 1983.

FARINELLI, L.; MALNOE, P. Coat protein gene-mediated resistance to potato virus Y in tobacco: examination of the resistance mechanism: is the transgenic coat protein required for protection? **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 6, n. 3, p.284-292, May/June 1993.

FEDALTO, A. A. **Avaliação da produtividade de tubérculos de plantas oriundas de sementes sexuadas de batata (*Solanum tuberosum* L.) e da primeira geração de propagação vegetativa**. 1982. 70 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FIGUEIRA FILHO, E. S.; FIGUEIREDO, L. F. A.; MONTE-NESHICH, D. C. Transformation of potato (*Solanum tuberosum*) cv. Mantiqueira using *Agrobacterium tumefaciens* and evolution of herbicide resistance. **Plant Cell Reports**, New York, v. 13, n. 12, p. 666-670, Sept. 1994.

FILGUEIRAS, F. A. R. **Solanáceas: agrotecnologia moderna na produção de tomate, batata, pimentão, pimenta, berinjela e jiló**. Lavras: Ed. UFLA, 2003. 331 p.

FONTES, P. C. R. Cultura da batata. In: FONTES, P. C. R. **Olericultura: teoria e prática**. Viçosa: UFV, 2005. p. 322-343.

GANZ, T.; LEHRER, R. I. Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. **Molecular Medicine Today**, Oxford, v. 5, n. 7, p. 292-297, July 1999.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Pt. 1. The technology. 2. ed. Edington: Exegetics, 1996. pt. 1, 574 p.

GASSER, C. S. ; FRALEY, R. T. Genetically engineered plants for crop improvement. **Science**, Washington, v. 244, n. 4910, p.1293-1299, June 1989.

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A. R.; NODARI, R. O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 9, p.1557-1563, set. 1999.

HANCOCK, R. E. W.; LEHRER, R. I. Cationic peptides: a new source of antibiotics. **Trends Biotechnology**, Amsterdam, v.16, n. 2, p. 82-88, Feb. 1998.

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

HAWKES, J. G. Origins of cultivated potatoes and species relationships. In: BRADSHAW, J. E.; MACKAY, G. R. (Ed.). **Potato genetics**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 3-42.

HOFFMANN, J. A.; KAFATOS, F. C.; JANEWAY, C. A.; EZEKOWITZ, R. A. Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science**, Washington, v. 284, n. 5418, 2, p.1313-1318, May 1999.

ISHIDA, B. K.; SNYDER JÚNIOR, G. W. ; BELKNAP, W.R. The use of *in vitro*-grown microtuber discs in *Agrobacterium*-mediated transformation of Russet Burbank and Lemhi Russet potatoes. **Plant Cell Reports**, New York, v. 8, n. 6, p.325-328, Sept. 1989.

KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n.1, p.30-33, maio 1997.

KLEE, H.; HORSCH, R.; ROGERS, S. *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 38, p. 467-486, June 1987.

LACORTE, C.; MANSUR, E. Transferência de genes através de *Agrobacterium tumefaciens*: avaliação da compatibilidade patógenos-hospedeiro. **ABCTP Notícias**, Brasília, v. 21, p. 2-7, 1993.

LAWSON, C.; KANIEWSKI, W.; HALEY, L.; ROZMAN, R.; NEWELL, C.; SANDERS, P.; TUMER, N. E. Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic russet Burbank. **Biotechnology**, New York, v. 8, n. 2, p.127-134, Feb. 1990.

LEVIN, R.; ALPER, Y.; STAV, R.; WATAD, A. Methods and apparatus for liquid media and semiautomated micropropagation. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, n. 447, p. 659-663, 1997.

LINDSEY, K. Genetic manipulation of crop plants. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 26, n.1, p.1-28, Oct. 1992.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Internacional Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.

LORENZO, J. C.; GONZALES, B; ESCALONA, M.; TEISSON, C.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C. G. Sugar cane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 54, n.3, p.197-200, 1998.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; MCKEE, R. A. Técnicas de cultura de tecidos. In: MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; MCKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. p. 101-181

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, July 1962.

OOMS, G.; BURREL, M. M.; KARP, A.; BEVAN, M.; HILLE, J. Genetic transformation in two potato cultivars with T-DNA from disarmed *Agrobacterium*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 73, n. 5, p.744-750, 1987.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO. **Potato World**. Disponível em: <www.faostat.fao.org>. Acesso em: 10 out. 2007.

PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; HOFFMAN, A.; CARVALHO, G. R. **Meios de cultura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 1998. 127 p.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G.R.L. Protocolo para a produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 9, p. 1035-1043, set. 2003.

PEREIRA, J. E. S.; FRANÇA, R. B.; DANTAS, A.C. M.; FORTES, G. R. L. Influência do número de gemas, presença ou ausência de folhas e posição do explante na multiplicação *in vitro* da batata. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n.1, p. 86-89, jan./mar. 2005.

PERES, L. E. P.; KERBAUY, G. B. High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae). **Plant Cell Reports**, New York, v. 18, n. 12, p. 1002-1006, Sept. 1999

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madri: **Mundi Prensa**, 1990. 326 p.

POTRYKUS, I. Gene transfer to plants: assesment and perspectivas. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 79, n. 1, p. 125-134, Jan. 1989.

SHAH, D. M.; TUMER, N. E.; FISCHHOFF, D. A.; HORSCH, R. B.; ROGERS, S. G.; FRALEY, R. T.; JAWORSKI, E. G. The introduction and expression of foreign genes in plants. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, Newcastle, v. 5, p. 81-106, 1987.

SHEERMAN, S.; BEVAN, M. W. A rapid transformation method for *Solanum tuberosum* using binary *Agrobacterium tumefaciens* vectors. **Plant Cell Reports**, New York, v. 7, n. 1, p. 13-16, Jan. 1988.

SILVA, P.I.; DAFFRE, S.; BULET, P. Isolation and full characterization of gomesin, na 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequences similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 275, n. 43, p. 33464-33470, Oct. 2000.

SIQUEIRA, E. R. de; INOUE, M. T. Propagação vegetativa do coqueiro através da cultura de tecidos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 27, n. 4, p. 639-646, abr. 1992.

SNYDER, G. W.; BEIKNAP, W. R. A modified method for routine *Agrobacterium-mediated* transformation of *in vitro* grown potato microtubers. **Plant Cell Reports**, New York, v. 12, n. 6, p.324-327, Apr.1993.

SPYCHALLA, J. P.; BEVAN, M. W. *Agrobacterium-mediated* transformation of potato stem and tuber tissue, regeneration and PCR screening for transformation. IN: LINDSEY, K. **Plant tissue culture manual: fundamentals and applications**. Boston : Kluwer Academic, 1991. p.1-18

STIEKEMA, W. J.; HEIDEKAMP, F.; LOUWERSE, J. D.; VERHOEVEN, H. A.; DIJKHUIS, P. Introduction of foreign genes into potato cultivars Bintje and Desiree using an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector. **Plant Cell Reports**, New York, v. 7, n. 1, p. 47-50, Jan. 1988.

TORRES, A. C.; BARBOSA, N. V. dos S. R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M. P.; FERREIRA, C. F.; PAIVA, S. A. V. de. **Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas:** formulações de meio de cultura de tecidos de plantas. Brasília: Embrapa, 2001. 19 p. (Embrapa. Circular Técnica, 24).

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; PETERS, J. A. Potato transformation (*Solanum tuberosum* L. cvs Baronesa and Macaca) via *Agrobacterium tumefaciens* for the production of transgenic plants resistant to the potato leafroll virus (PLRV). In: ENCUESTRO LATINOAMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 3., Havana, 1998; ENCUESTRO LATINOAMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 2, Playa, 1998. **Encuentro ... Cuba** : Palcograf Artes Gráfica, 1998. p. 358-359.

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

TRINCA, S.; DE PACE, C.; CACCIA, R.; SCARASCIA-MUGNOZZA, G.; DODDS, J. H.; JAYNES, J. Transformation of potato (*Solanum tuberosum* L.) leaf disc using *A. tumefaciens* mediated transfer of DNA sequences coding for lytic peptides. In: **Molecular methods for potato improvement**. Lima: CIP, 1991. p. 85-95. Report of the Planning Conference on Application of Molecular Techniques to Potato Germplasm Enhancement, Lima, Peru, 1990.

VAYDA, M.E.; BELKNAP, W.R. The mergence of transgenic potatoes as commercial products and tools for basic science. **Transgenic Research**, Amsterdam, v. 1, n. 4, p. 149-163, Nov. 1992.

VLUGT, R. A. A. van der ; RUITER, R.K.; GOLDBACH, R. Evidence for sense RNA-mediated resistance to PVY^N in tobacco plants transformed with the viral coat protein cistron. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 20, n. 4, p. 631-639, Nov. 1992.

VISSER, R.G.F. Regeneration and transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens*. In: LINDSEY, K. **Plant tissue culture manual**. New Delhi: Springer, 1991. p. 1-9.

WEFELS, E.; SALAMINI, F.; ROHDE, W. Modification at the N-terminus of the potato virus Y capsid protein CP does not interfere with CP-mediated virus resistance in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.). **Journal of Genetics and Breeding**, Rome, v. 47, n. 1, p.89-93, Mar. 1993.

WENZLER, H.; MIGNERY, G.; MAY, G.; PARK, W. A rapid and efficient transformation method for the production of large numbers of transgenic potato plants. **Plant Science**, Limerick, v. 63, n. 1, p. 79-85, 1989.

WETMORE, R. H.; RIER, J. P. Experimental induction of vascular tissues in callus of angiosperms. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 50, n. 5, p. 418-430, May 1963.

ZAMBRYSKI, P. Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. **Annual Review of Genetic**, Palo Alto, v. 22, p. 1-30, 1988.

ZAMBRYSKI, P.; JOOS, P. H.; GENETELLO, C.; LEEMANS, J.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. **Embo Journal**, Oxford, v. 2, n.12, p. 2143–2150, 1983.

**CAPÍTULO II: INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA E DO TIPO DE
VEDAÇÃO DOS TUBOS NA REGENERAÇÃO *IN VITRO* DE *Solanum
tuberosum* L. cv. ATLANTIC**

1 RESUMO

REZENDE, Rodrigo Kelson Silva. Influência do meio de cultura e do tipo de vedação dos tubos na regeneração *in vitro* de *Solanum tuberosum* L. cv. Atlantic. In:_____. **Organogênese *in vitro* de batata (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Atlantic visando transformação genética.** 2008, p.31-46. Tese (Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O estabelecimento de um protocolo eficiente de micropropagação é uma prática inicial de fundamental importância em sistemas de transformação genética. Isto se deve ao fato de que é desejável a obtenção de plântulas morfológicamente normais, com parte aérea e raízes bem desenvolvidas. Estas servirão como plantas matrizes para futuros experimentos envolvendo organogênese e transformação genética. O objetivo da realização deste trabalho foi o de avaliar a influência do tipo de meio de cultura e do tipo de vedação dos tubos no cultivo *in vitro* de batata. Segmentos nodais de batata contendo uma gema axilar foram inoculados em meios de cultura WPM e MS e os tubos foram vedados com cinco tipos diferentes de tampas. Os maiores valores obtidos para número de brotos, comprimento de brotos, número de nós e número de raízes foram 1,7 brotos; 5,2 cm; 2,7 nós e 3,4 raízes, respectivamente. O tipo de vedação do tubo teve influência no cultivo *in vitro*. A vedação por tampa plástica associada com filme de PVC promoveu os maiores valores para número de brotos, comprimento de brotos, número de nós e número de raízes. O tipo de meio de cultura teve efeito na regeneração *in vitro* de batata somente para a variável comprimento de brotos. Frascos contendo meio de cultura WPM, vedados com tampa plástica associada com filme de PVC, propiciou a formação de brotos com maior comprimento, sendo ideal para micropropagação de batata cv. Atlantic.

* Comitê Orientador: Dr. Moacir Pasqual – UFLA (Orientador), Dr. Luciano Vilela Paiva (Co-Orientador) – UFLA.

2 ABSTRACT

REZENDE, Rodrigo Kelson Silva. Influence of culture medium and type of vessels seal in the *in vitro* regeneration of *Solanum tuberosum* L. cv. Atlantic. In: _____. ***In vitro* organogenesis of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Atlantic for the genetic transformation.** 2008. p.31-46. Thesis (Doctor Program in Agronomy/Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The establishment of an efficient protocol of micropropagation is an initial step for genetic transformation. This is due to the fact that it is desirable the obtaining of morphological normal seedlings, with aerial part and roots well developed. These will serve as donor plants for futures experiments involving organogenesis and genetic transformation. The objective of the present work was to evaluate the influence of the type of culture mediums and of the type of vessels seal in the *in vitro* potato cultivation. Potato shoots segments containing an axillary bud was inoculated in WPM and MS medium and the vessels were prohibited with five types different from caps. The highest values obtained for number of shoots, length of shoots, number of buds and number of roots were 1,7 shoots; 5,2 cm; 2,7 buds and 3,4 roots, respectively. The type of vessels seal had influence in the *in vitro* cultivation. The plastic cap associated with PVC film promoted the largest values for number of shoots, length of shoots, number of buds and number of roots. The type of culture medium had effect in the potato *in vitro* regeneration, only for the variable length of shoots. Vessels containing WPM culture medium containing plastic cap associated with PVC film, promoted the formation of larger length shoots, being ideal for micropropagation of potato cv. Atlantic.

* Guidance Committee: Dr. Moacir Pasqual – UFLA (Adviser), Dr. Luciano Vilela Paiva (Co-Adviser) – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

A batateira (*Solanum tuberosum* L.), pertencente à família botânica *Solanaceae*, ocupa a quarta posição entre as principais culturas produzidas mundialmente, sendo superada apenas pelo trigo, arroz e milho. A cultura apresenta maior destaque nas regiões Sul (PR, SC e RS) e Sudeste (SP e MG), em virtude, principalmente, das condições edafoclimáticas mais propícias para seu desenvolvimento (Camargo Filho, 2001).

A técnica de cultivar tecidos de plantas *in vitro* tem servido como ferramenta em diversas áreas da agricultura, principalmente para a batata, nas quais é utilizada na obtenção e na multiplicação de clones isentos de patógenos, com atenção especial às viroses. A micropropagação vem sendo amplamente utilizada, especialmente na produção de material propagativo com elevada qualidade fitossanitária (Assis, 1999).

Na etapa de multiplicação *in vitro*, a capacidade de os explantes sobreviverem, desenvolverem e se multiplicarem é conseqüência de vários fatores, como o genético, o estado fisiológico e as concentrações endógenas de hormônios nos explantes e as condições ambientais de cultivo. Além disso, o uso de um meio de cultura apropriado para cada fase do cultivo é condição básica, devendo estes meios proporcionar os nutrientes necessários ao metabolismo das células vegetais em cultivo para o crescimento e a diferenciação dos tecidos (Kozay et al., 1997).

As vedações convencionais utilizadas nos recipientes, sob os quais as plantas crescem, para prevenir a contaminação por microrganismos, retardar a dessecação dos tecidos e a evaporação da água do meio de cultura, podem restringir a troca de gases entre o recipiente e a atmosfera externa. A conseqüência desse confinamento são condições ambientais peculiares,

caracterizadas por alta umidade relativa, baixa disponibilidade de CO₂ e grande flutuação diurna na sua concentração, além de acúmulo de etileno e outras substâncias tóxicas (Zobayed et al., 1999).

Em adição, nos sistemas clássicos de micropropagação utilizados em laboratórios comerciais, os explantes e as plantas são cultivados sob baixos níveis de irradiância (15-75 μmol m⁻² s⁻¹) e altas concentrações de sacarose no meio de cultura (30-30 g L⁻¹) (Kitaya et al., 1995; Kodym & Zapata-Arias, 1998).

Sob essas condições ambientais, a fotossíntese, a transpiração e a absorção de água e de nutrientes são inibidas e a respiração no escuro elevada, resultando em pobre crescimento das brotações e de plantas durante o cultivo *in vitro* e em marcantes desordens morfológicas e fisiológicas em âmbito celular, de tecidos e de órgãos (Chenevard et al., 1997). Essas alterações reduzem a capacidade de sobrevivência e de crescimento das plantas micropropagadas no ambiente natural porque diminuem sua habilidade de suprir a necessidade de energia e de carbono por meio da fotossíntese e de controlar eficientemente os processos de perda e de absorção de água, mantendo um favorável balanço hídrico (Zobayed et al., 1999).

O estabelecimento de um protocolo eficiente de micropropagação é uma prática inicial de fundamental importância em sistemas de transformação genética. Isto se deve ao fato de ser desejável a obtenção de plântulas morfológicamente normais, com parte aérea e raízes bem desenvolvidas. Estas servirão como plantas matrizes para futuros experimentos envolvendo organogênese e transformação genética.

Neste trabalho, objetivou-se avaliar a influência do meio de cultura e do tipo de vedação do tubo de ensaio na regeneração *in vitro* de batata (*Solanum tuberosum* L.) cv. Atlantic.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM-UFLA), em parceria com o Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, do setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG.

4.1 Material vegetal

Os experimentos foram conduzidos utilizando-se plantas de batata (*Solanum tuberosum* L.) cv. Atlantic, cedidas pela empresa Multiplanta Tecnologia Vegetal, localizada no município de Andradas, MG.

O aspecto das plantas de batata cv. Atlantic, cultivadas *in vitro*, é mostrado na Figura 1.

4.2 Regeneração *in vitro* de batata cv. Atlantic

Segmentos nodais de batata, com aproximadamente 1,0cm de comprimento e contendo uma gema axilar, foram excisados de plantas matrizes em câmara de fluxo laminar horizontal, com auxílio de lâmina de bisturi. Posteriormente, estes explantes foram inoculados em meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1980) e MS (Murashige & Skoog, 1962), ambos solidificados com 6 g L⁻¹ de ágar (Sigma®) e suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose (Sigma®). O pH foi ajustado para 5,8±0,1, antes da autoclavagem à temperatura de 121°C e à pressão de 1,05 kg.cm⁻², durante 20 minutos. Logo após a inoculação de cada tubo, procedeu-se a vedação, utilizando-se cinco tipos



FIGURA 1 Cultivo *in vitro* de batata (*Solanum tuberosum* L.) cv. Atlantic. UFLA, Lavras - MG, 2008.

diferentes de tampas, sendo estas: algodão, rolha, rolha + filme de PVC, tampa de plástico e tampa de plástico + filme de PVC. Em seguida, os explantes foram transferidos para sala de crescimento com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e irradiação de fótons de $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A avaliação foi realizada 25 dias após a inoculação, observando-se o número de brotos, o comprimento de brotos, o número de nós e o número de raízes.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 2 X 5 (dois tipos de meio de cultura e cinco tipos de vedação dos tubos de ensaio), com cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição formada por dois tubos. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Sisvar[®].

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito do tipo de vedação do tubo foi significativo em todas as variáveis analisadas: número de brotos, comprimento de brotos, número de nós e número de raízes para o meio WPM (representado nos gráficos pelas letras 'A' e 'a').

Para o meio MS, o efeito do tipo de vedação do tubo só não foi significativo para a variável número de brotos (representado nos gráficos pelas letras 'B' e 'b').

Com relação ao número de brotos, o máximo valor obtido foi de 1,7 broto por segmento nodal inoculado em meio WPM e vedado com tampa plástica + filme de PVC (Figura 1).

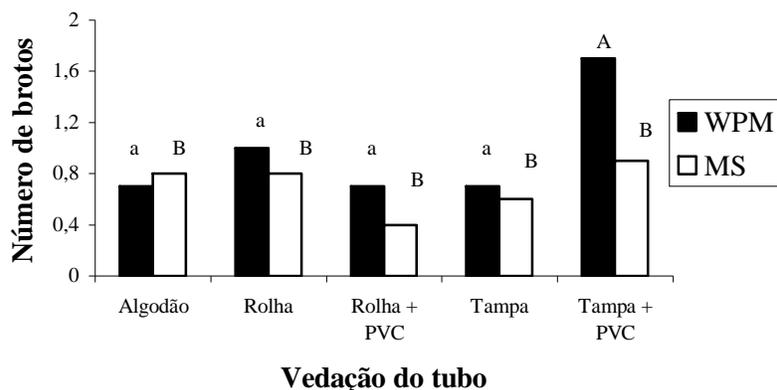


FIGURA 1 Número médio de brotos obtidos a partir de segmentos nodais de batata cv. Atlantic, cultivados em meio WPM ou MS em função de diferentes formas de vedação do tubo. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Estes resultados sugerem que houve somente regeneração da gema contida no segmento nodal, sem a indução de múltiplas brotações.

Para comprimento de brotos, a maior média (5,2 cm) foi alcançada em WPM com vedação utilizando algodão, que não diferiu significativamente da vedação por rolha e tampa plástica + PVC (Figura 2). Quando a vedação dos tubos foi feita com tampa plástica + PVC, a utilização do meio WPM teve efeito significativo em relação ao meio MS, gerando brotos de 4,9 e 1,4cm, respectivamente. Comparando-se os meios WPM e MS, verificou-se que a influência do tipo de meio de cultura foi significativa (representado por *) somente para a variável comprimento de brotos - Tampa + PVC (Figura 2).

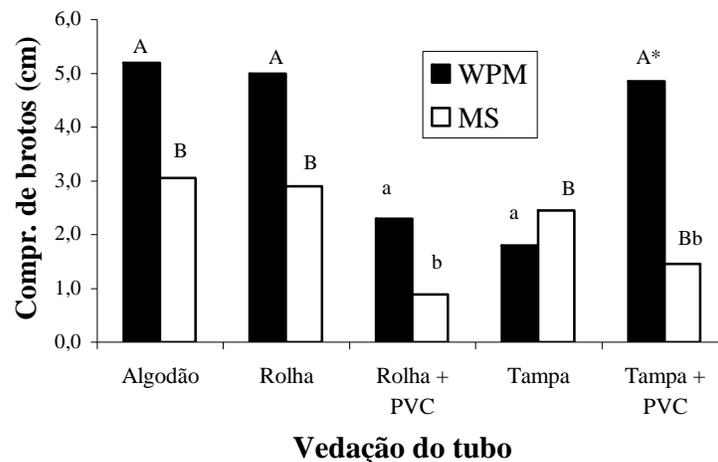


FIGURA 2 Comprimento médio de brotos obtidos a partir de segmentos nodais de batata cv. Atlantic, cultivados em meio WPM ou MS, em função de diferentes formas de vedação do tubo. (*) Indica que o tipo do meio de cultura foi significativo somente para a variável tampa + PVC. UFLA, Lavras, MG, 2008.

A vedação por rolha e tampa plástica + filme de PVC também promoveu os maiores valores para o número de nós, com média máxima de 2,7 nós por explante (Figura 3).

Com relação ao número de raízes por explante, os melhores resultados foram obtidos com a utilização de meio WPM com vedação com algodão, rolha e tampa + filme de PVC, não havendo diferenças estatísticas entre esses tratamentos. Estes resultados foram significativamente superiores aos obtidos com a utilização de rolha + PVC na vedação dos tubos (Figura 4).

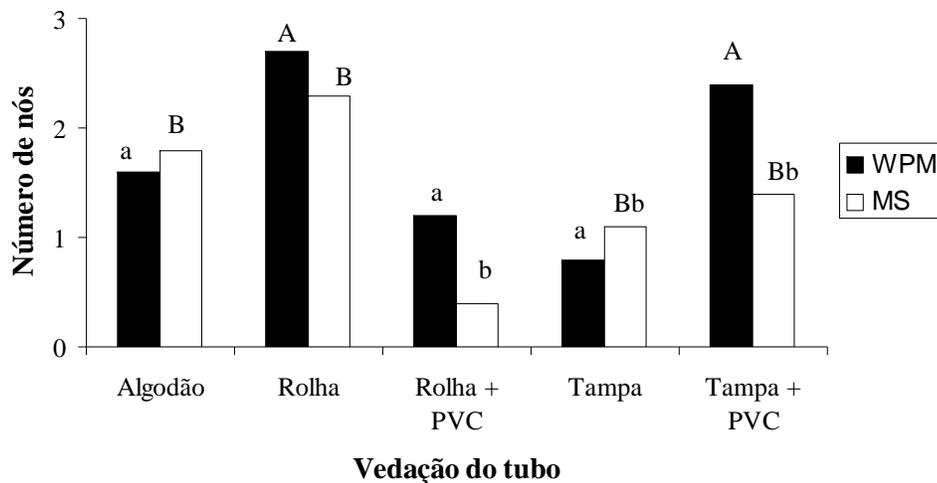


FIGURA 3 Número médio de nós obtidos a partir de segmentos nodais de batata cv. Atlantic, cultivados em meio WPM ou MS em função de diferentes formas de vedação do tubo. UFLA, Lavras, MG, 2008.

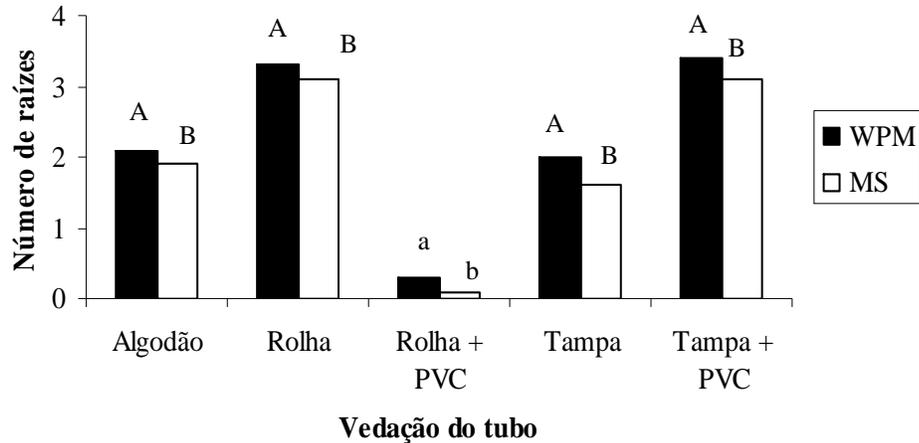


FIGURA 4 Número médio de raízes obtidas a partir de segmentos nodais de batata cv. Atlantic, cultivados em meio WPM ou MS, em função de diferentes formas de vedação do tubo. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Estes resultados diferem dos obtidos por Sha et al. (1985) que mencionam que, em cultura de batata, frascos vedados com parafilme (filme parafinado impermeável à água) mostraram maior incidência de necrose apical. Segundo os mesmos autores, a vedação total do frasco de cultura pode também acarretar acúmulo de alguns metabólitos liberados pela cultura, os quais, ao se complexarem com o cálcio, tornam este nutriente indisponível, intensificando os sintomas de deficiência.

Santana (2003) verificou que a vedação com tampa de algodão constitui um sistema excelente para o crescimento de brotações *in vitro* de *Annona glabra*, obtendo-se brotações com 2,0 cm de comprimento.

Souza et al. (2007), trabalhando com enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira M9, constataram que a vedação dos frascos com algodão

promoveu maior número médio de raízes e porcentagem de enraizamento em meio de cultivo.

Já Carvalho et al. (1995), estudando a influência do tipo de tampa no crescimento e no desenvolvimento de batata-doce, notaram que houve diferença no peso da matéria fresca e seca da plântula.

Do ponto de vista da micropropagação, é desejável a obtenção de plântulas de batata morfológicamente normais (com raiz e parte aérea) e que, particularmente, apresentem maior número de brotos, nós e maior comprimento de brotos. Essas plântulas dão origem a um maior número de segmentos nodais (com gema axilar) e internodais (sem gema axilar), podendo ser utilizados como propágulos em larga escala, tanto para organogênese direta quanto indireta.

6 CONCLUSÕES

O tipo de vedação do tubo de ensaio influencia o cultivo *in vitro*.

A vedação por tampa plástica associada com filme de PVC promove os maiores valores para número de brotos, comprimento de brotos, número de nós e número de raízes.

O tipo de meio de cultura tem efeito na regeneração *in vitro* de batata somente para a variável comprimento de brotos (frascos vedados com tampa + PVC).

Frascos contendo meio de cultura WPM, vedados com tampa plástica associada com filme de PVC, propiciam a formação de brotos com maior comprimento, sendo ideal para repicagem de batata cv. Atlantic.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSIS, M. Novas tecnologias na propagação de batata. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n. 197, p. 30-33, 1999.

CAMARGO FILHO, W.P. Produto Interno Bruto (PIB) da cadeia produtiva da batata. **Batata Show**, Itapetininga, v. 1, n. 2, p. 22, jun. 2001.

CARVALHO, R.; FAVARETTO, N.; PINTO, J. E. B. P. Influência de fatores físicos no desenvolvimento e crescimento *in vitro* de batata-doce (*Ipomea batatas* (L.) Peir. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 19, n. 2, p.158-164, abr./jun. 1995.

CHENEVARD, D.; FROSSARD, J. S.; ALLEMAND, C. J. Carbohydrate reserves and CO₂ balance of hybrid walnut (*Juglans nigra* no. 23 x *Juglans regia*) plantlets during acclimatization. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 68, n. 1/4, p. 207-217, Mar. 1997.

KITAYA, Y.; FUKUDA, O.; KOZAI, T.; KIRDMANEE, C. Effects of light intensity and lighting direction on the photoautotrophic growth and morphology of potato plantlets *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 60, n. 1/2, p.15-24, Apr. 1995.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. "Grande Naine". **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 55, n. 2, p. 141-145, 1998.

KOZAY, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B. R. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 51, n. 1, p. 49-56, 1997.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, Alexandria, v. 15, n. 3, p. 416, 1980. Supplement. (Abst. 321).

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, Mar. 1962.

SANTANA, J. R. F. de. **Controle da morfogênese *in vitro* em algumas espécies de *Annonaceae***. 2003. 278 p. Tese. (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SOUZA, J. A.; DONINI, L. P.; SILVA, L. C.; CORRÊA, M. G. S.; SCHUCH, M.W. Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira – M9 em função da vedação, sacarose e material de suporte no meio de cultura. **Scientia Agrária**, Curitiba, v. 8, n. 2, p.161-164, 2007.

SHA, L.; MCCOWN, B. H.; PETERSON, L. A. Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot cultures. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 110, n. 5, p. 631-634, Sept. 1985.

ZOBAYED, S. M. A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Cauliflower shoot-culture: effect of different types of ventilation on growth and physiology. **Plant Science**, Clare, v. 141, n. 2, p. 209-217, 1999.

**CAPÍTULO III: ORGANOGÊNESE *IN VITRO* VISANDO
TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE BATATA (*Solanum tuberosum* L.)
cv. ATLANTIC VIA *Agrobacterium tumefaciens***

1 RESUMO

REZENDE, Rodrigo Kelson Silva. Organogênese *in vitro* visando à transformação genética de batata (*Solanum tuberosum* L.) cv. Atlantic via *Agrobacterium tumefaciens*. In: _____. **Organogênese *in vitro* de batata (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Atlantic visando transformação genética.** 2008. p. 46-75. Tese (Doutorado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Este trabalho foi realizado com o objetivo de determinar um protocolo eficiente para a transformação genética de batata cv. Atlantic. Plântulas foram micropropagadas em frascos, contendo meio WPM, vedados com tampa plástica associada a filme de PVC. Testou-se qual o tipo de explante é ideal para a organogênese *in vitro* de batata inoculando-se segmentos internodais e foliares em meio WPM contendo 30g L⁻¹ de sacarose, pH ajustado em 5,8±0,1 e geleificado com 6g L⁻¹ de ágar, suplementado com diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento (ANA e ZEA) combinados aleatoriamente. As variáveis analisadas foram as porcentagens de formação de calos, raízes e brotos. Segmentos internodais de batata cv. Atlantic apresentaram melhor capacidade organogênica que explantes foliares. O melhor meio para indução de brotos (MIB) é constituído por meio WPM + 1,0 mg L⁻¹ de ANA + 5,0 mg L⁻¹ de ZEA. Posteriormente, segmentos internodais foram co-cultivados no escuro em meio WPM líquido contendo *A. tumefaciens*, durante 48 horas. Os explantes foram lavados com água estéril e carbenicilina – Cb (500 mg L⁻¹), sendo secos em papel de filtro estéril. Os explantes foram inoculados em meio de indução de brotos (MIB), acrescidos de Cb (0, 100, 250, 500 mg L⁻¹), sendo incubados por um período de 30 a 60 dias. Avaliou-se a porcentagem do número de segmentos internodais que deram origem a brotações. As brotações foram transferidas para o meio de alongamento de brotos – WPM + Cb (0, 100, 250, 500 mg L⁻¹), incubados por mais 30 dias. As variáveis analisadas foram: altura de plantas, número de brotos e comprimento de raízes. O maior índice de segmentos internodais com brotos (72%) ocorreu aos 60 dias em cultura, utilizando-se o meio contendo 250 mg L⁻¹ de Cb. Concentrações crescentes de carbenicilina (100, 250 e 500 mg L⁻¹), adicionadas ao meio de alongamento de brotos, promovem diminuição na altura de plantas, no número de nós e no comprimento radicular. Após o co-cultivo de segmentos internodais, estas concentrações não são eficientes na eliminação de *A. tumefaciens*. Foi possível estabelecer um protocolo de organogênese *in vitro* de batata cv. Atlantic a partir de segmentos internodais não co-cultivados.

* Comitê Orientador: Dr. Moacir Pasqual– UFLA (Orientador), Dr. Luciano Vilela Paiva (Co-Orientador) – UFLA.

2 ABSTRACT

REZENDE, Rodrigo Kelson Silva. *In vitro* organogenesis of potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Atlantic for the genetic transformation using *Agrobacterium tumefaciens*. In: _____. ***In vitro* organogenesis of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Atlantic for the genetic transformation.** 2008. p. 46-75. Thesis (Doctor Program in Agronomy/Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

This work aimed to establish an efficient protocol for the genetic transformation of potato cv. Atlantic. Seedlings were micropropagated in vessels containing WPM medium containing plastic cap and PVC film. It was tested which the ideal type of explant for the potato *in vitro* organogenesis being inoculated shoots and leaf segments in WPM medium containing 30g L⁻¹ of sucrose, pH adjusted in 5,8 ± 0,1 and solidified with 6g L⁻¹ of agar, supplied with different types and diverse combinations of growth regulators (NAA and ZEA) combined at random. The analyzed variables were: % of formation of calluses, roots and shoots. Shoots segments of potato cv. Atlantic presented better organogenesis capacity than leaf explants. The best medium for induction of shoots (MIB) it is constituted for WPM medium + 1,0 mg L⁻¹ of NAA + 5,0 mg L⁻¹ of ZEA. In the next step, shoots segments were co-cultivated in the darkness in WPM liquid medium containing *A. tumefaciens* during 48h. The explants were washed with sterile water and carbenicilin - Cb (500 mg L⁻¹), being dried in sterile filter paper. The explants were inoculated in medium of induction of shoots (MIB) added of Cb (0, 100, 250, 500 mg L⁻¹) being incubated by a period from 30 to 60 days. There was evaluated % of the number of shoots segments that originate shoots. Shoots were transferred for the elongation shoots medium - WPM + Cb (0, 100, 250, 500 mg L⁻¹), incubated for more 30 days. The analyzed variables were: height of plants, number of shoots and length of roots. The largest index of shoots segments with shoots (72%) it happened to the 60 days in culture, being the medium containing 250 mg L⁻¹ of Cb. Growing concentrations of carbenicilin (100, 250 and 500 mg L⁻¹) added to the enlarge shoots medium promote a decrease in the height of plants, number of shoots and length roots. After the co-cultivation of shoots segments these concentrations are not efficient in the elimination of *A. tumefaciens*. It was possible to establish a protocol of *in vitro* organogenesis of potato cv. Atlantic starting from shoots segments not co-cultivated.

* Guidance Committee: Dr. Moacir Pasqual – UFLA (Adviser), Dr. Luciano Vilela Paiva (Co-Adviser) – UFLA.

3 INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos de plantas vem sendo aplicada como alternativa importante e essencial para o estabelecimento de protocolos que visam à transformação genética de diversas espécies, incluindo a batata.

Para se obter uma planta contendo um gene exógeno, é necessário regenerar plantas a partir de células transformadas. Para tanto, um protocolo de regeneração deve ser estabelecido para o particular genótipo de interesse (Visser, 1991).

Contudo, os resultados são, muitas vezes, divergentes e, nem sempre, é possível a reprodução dos mesmos porque a cultura de tecidos, como técnica de propagação vegetativa, necessita ser adaptada às necessidades de cada espécie e cultivar. Isso porque estas diferem entre si, podendo apresentar resultados diferentes sob as mesmas condições de cultivo, o que indica que, provavelmente, a regulação fisiológica do processo de regeneração é cultivar dependente (Pereira & Fortes, 2003).

Uma das possíveis causas nas diferenças de resultados obtidos, além da diferença genética entre as cultivares, para variáveis como capacidade de regeneração e multiplicação das espécies *in vitro*, pode ser o tipo de explante utilizado (Pierik, 1990).

A determinação do meio de cultura a ser utilizado, o tipo e a concentração de fitormônios e de antibióticos, o tipo e o tamanho de explantes, as condições e o tempo de cultivo *in vitro* destacam-se como fatores de grande relevância para um protocolo de transformação genética de plantas.

Dessa maneira, objetivou-se estabelecer um protocolo eficiente para a transformação genética de batata cultivar Atlantic.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM-UFLA), em parceria com o Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, do setor de Fisiologia Vegetal, no Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG.

4.1 Material botânico

Os experimentos foram conduzidos utilizando-se plantas de batata (*Solanum tuberosum* L.) cv. Atlantic, oriundas do cultivo *in vitro* de meristemas, cedidas pela empresa Multiplanta Tecnologia Vegetal, localizada em Andradas, MG.

4.1.1 Plantas doadoras de explantes

As plantas de batata cv. Atlantic, oriundas da cultura de meristemas, foram repicadas a partir de segmentos nodais contendo gemas apicais ou axilares. Utilizaram-se frascos de 250mL, contendo 40mL de meio de cultura WPM (Lloyd & McCown, 1980), sem suplementação hormonal, contendo 30g L⁻¹ de sacarose (Sigma[®]), pH ajustado em 5,8±0,1 e geleificado com 6g L⁻¹ de ágar (Sigma[®]). Cada frasco continha 5 explantes e foi vedado com tampa plástica associada com filme de PVC, e foi mantido em sala de crescimento com temperatura de 23°C±1°C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de fótons de 43μmol m⁻² s⁻¹.

4.1.2 Tipo de explantes

Foram utilizados como explantes segmentos internodais (sem gemas laterais) medindo 0,7-0,8cm de comprimento e também explantes foliares de 0,8-1,0cm² contendo a nervura central, oriundos de plantas pré-estabelecidas *in vitro*, com 3-4 semanas de idade (Figura 1). Os explantes foram excisados em placas de Petri, com auxílio de lâmina de bisturi e pinça, devidamente esterilizadas.

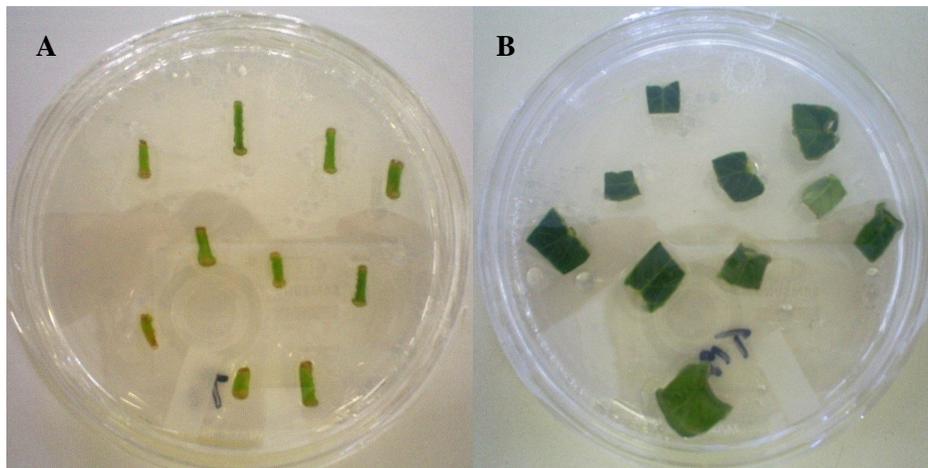


FIGURA 1 Aspectos dos explantes obtidos de plantas de batata cv. Atlantic cultivadas *in vitro*. A – segmentos internodais; B – explantes foliares. UFLA, Lavras, MG, 2008.

4.2 Meios de cultura

Para regenerar brotos em segmentos internodais e explantes foliares de batata cv. Atlantic utilizou-se o meio de cultura WPM (Lloyd & McCown,

1980) contendo 30g L^{-1} de sacarose (Sigma[®]), pH ajustado em $5,8\pm 0,1$ e geleificado com 6g L^{-1} de ágar (Sigma[®]), suplementado com diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento (ácido naftaleno-acético - ANA, ácido indol-3-acético - AIA e zeatina ribosídeo, ZEA) combinados aleatoriamente, resultando em diferentes tratamentos, conforme mostrado na Tabela 1. Cada tratamento consistiu de 3 repetições (placas), com 10 explantes cada.

A esterilização dos meios de cultura foi feita em autoclave, à temperatura de 121°C e pressão de $1,05\text{ kg.cm}^{-2}$, durante 20 minutos.

A ZEA foi filtro-esterilizada em câmara de fluxo laminar, com auxílio de seringa descartável e filtro Millipore[®] ($0,22\ \mu\text{m}$ de diâmetro) e adicionada ao meio de cultura (temperatura próxima de 50°C), após o processo de autoclavagem do mesmo.

Após a inoculação dos explantes, incubaram-se as placas, durante 30 dias, em sala de crescimento, com temperatura de $23^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de fótons de $43\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$. As variáveis estudadas, após 30 dias, foram: porcentagem de formação de calos, porcentagem de formação de raízes e porcentagem de formação de brotos.

TABELA 1. Tratamentos obtidos por meio da interação entre diferentes concentrações de ANA, AIA e ZEA. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Tratamento	ANA (mg L^{-1})	AIA (mg L^{-1})	ZEA (mg L^{-1})
T1	0	0	0
T2	0,1	0	0,1
T3	0,1	0	1,0
T4	0,1	0	5,0
T5	1,0	0	0,1
T6	1,0	0	1,0
T7	1,0	0	5,0

Tabela 1. Cont.

T8	0	0,1	0,1
T9	0	0,1	1,0
T10	0	0,1	5,0
T11	0	1,0	0,1
T12	0	1,0	1,0
T13	0	1,0	5,0

4.3. Doses do antibiótico carbenicilina sobre a taxa de regeneração de brotos e plântulas normais

Este experimento foi realizado com o objetivo de testar a influência da suplementação do antibiótico carbenicilina (Cb) ao melhor meio de indução de brotos (MIB), obtido no experimento anterior (T7), sobre a taxa de regeneração direta e, posteriormente, verificar o comportamento destas brotações na regeneração de plântulas normais.

Utilizaram-se segmentos internodais obtidos das plantas doadoras, os quais foram cultivados em meio WPM contendo 30g L⁻¹ de sacarose (Sigma[®]), pH ajustado em 5,8±0,1 e geleificado com 6g L⁻¹ de ágar (Sigma[®]), suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de ANA + 5,0 mg L⁻¹ de ZEA, e Cb (0, 100, 250, 500 mg L⁻¹). Foram colocados 10 explantes por placa de Petri contendo 30 mL de meio de cultura, com cinco repetições por tratamento. Os explantes permaneceram incubados, durante 30 dias, em sala de crescimento, sob as condições já descritas no item anterior.

Após este período, os segmentos internodais foram transferidos para frascos de vidro (com capacidade de 250 mL) contendo 40mL do meio MIB suplementado com Cb (0, 100, 250, 500 mg L⁻¹), nos quais permaneceram por mais 30 dias. Após 60 dias em cultura, todos os explantes foram

individualmente observados e, com auxílio de estereomicroscópio, efetuou-se a contagem (%) do número de segmentos internodais que deram origem a brotações.

A partir dessas brotações, excisaram-se segmentos nodais de 0,8-1,0cm de comprimento, apresentando uma única gema axilar. Estes foram inoculados em tubo de ensaio, contendo o meio WPM sólido, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose e suplementado com Cb (0, 100, 250, 500 mg L⁻¹). Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado. Cada tratamento foi repetido 12 vezes, cultivando-se apenas 1 explante/tubo de ensaio.

Os tubos foram incubados em sala de crescimento sob condições controladas de luminosidade, temperatura e fotoperíodo. Após período de 30 dias, as plantas crescidas a partir de gemas axilares foram observadas quanto à altura, ao número de nós e ao comprimento de raízes, sendo os dados submetidos à análise de variância, com a realização do teste de F, utilizando-se o software Sisvar[®]. Em caso de observação de diferenças significativas, efetuaram-se análises de regressão.

4.4 Transformação genética de batata cv. Atlantic por *Agrobacterium tumefaciens*

4.4.1 Condições de crescimento das plantas micropropagadas

Para os experimentos de transformação, os segmentos internodais foram obtidos de plantas doadoras, multiplicadas somente a partir de gemas apicais, pelo fato de elas apresentarem elevado potencial de desenvolvimento *in vitro*. As plantas foram mantidas por 3-4 semanas em frasco de vidro, contendo meio WPM, vedados com tampa plástica + PVC e incubados nas condições já citadas.

4.4.2 Cepa de bactéria e vetor

A cepa desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105, transformada com o vetor pCG1X, que contém o gene da gomesina sob o controle do promotor 35S CaMv duplicado, que foi usada nos ensaios de transformação, foi cedida pelo Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Brasília, DF.

Este vetor contém entre as fronteiras do T-DNA, o gene que codifica para o peptídeo antimicrobiano gomesina sob o controle do promotor 35S CaMV duplicado (Figura 2).

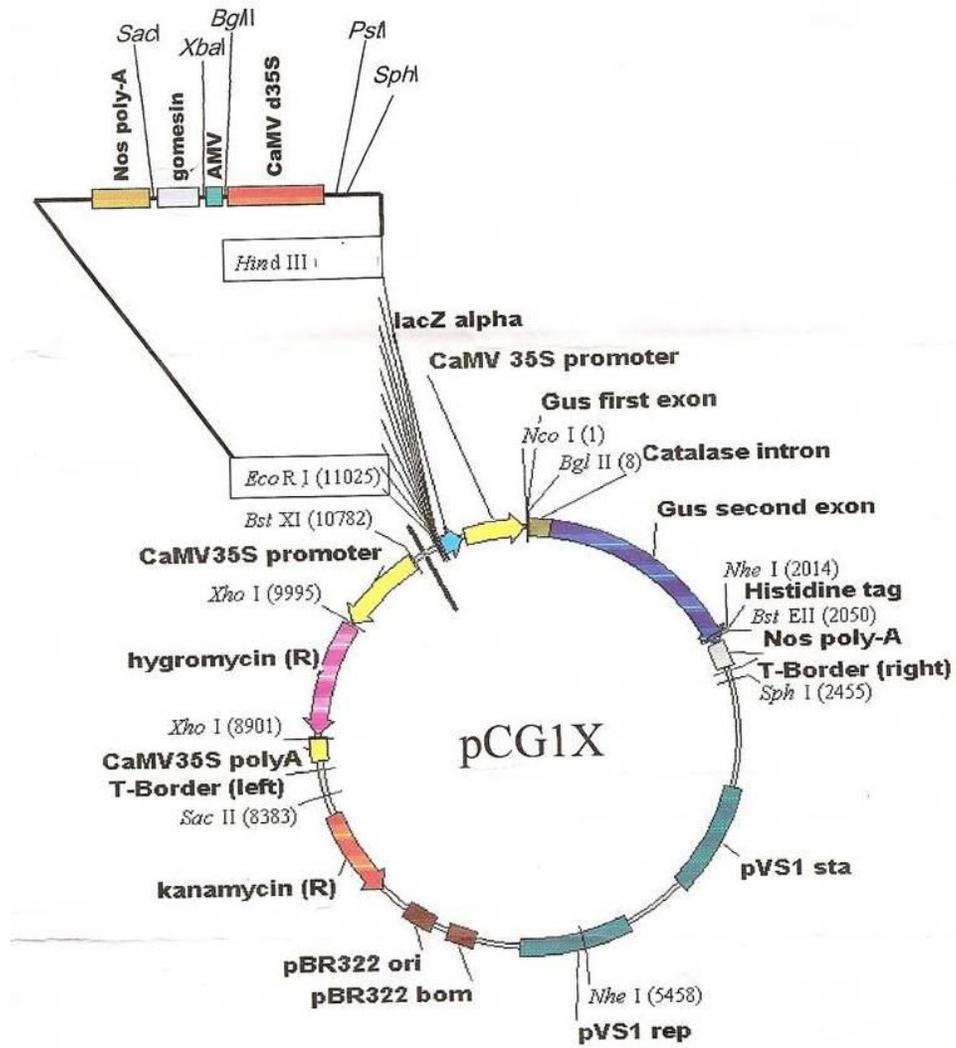


FIGURA 2 Plasmídeo pCG1X que contém o gene da gomesina. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Culturas de EHA 105 foram crescidas em meio LB (Miller, 1972), pH ajustado para 7,5 e geleificado com 1,6% de ágar, contendo antibióticos apropriados: rifampicina (Rf) e canamicina (Kan), ambos em concentração de 100 mg L⁻¹, a 28°C, durante 48 horas.

Posteriormente, 2-3 colônias da cultura anterior foram repicadas em Erlenmeyers (capacidade 50 mL), contendo 15 mL do mesmo meio, líquido e suplementado com Rf e Kan (100 mg L⁻¹), e cultivadas sob agitação de 80 rpm, no escuro, a 28°C, durante 48 horas.

4.4.3 Co-cultivo

Utilizou-se o método de co-cultivo em meio líquido descrito por Trinca et al. (1991), com algumas modificações.

Segmentos internodais de batata cv. Atlantic foram excisados de plantas crescidas *in vitro*, de acordo com o item 4.4.1, sendo imersos numa diluição 10⁻¹ da cultura da bactéria em meio WPM líquido. Foram co-cultivados 30 segmentos internodais por placa de Petri, com células de *A. tumefaciens* EHA-105 (O.D._{600nm} = 1,0), por 48 horas, em placas vedadas com parafilme, a 28±1°C, no escuro, sob agitação de 80 rpm.

Após a co-cultivação, os segmentos internodais foram lavados por três vezes em água estéril, durante cinco minutos, tendo, na última lavagem, sido adicionados 500 mg L⁻¹ de Cb. Em seguida, os explantes foram secos em papel de filtro estéril, para remover o excesso de bactéria, e inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura para a indução de brotos, suplementado com carbenicilina (0,100, 250 e 500mg L⁻¹), para eliminar a *Agrobacterium* do meio de cultura. Explantes controles foram submetidos ao mesmo procedimento, entretanto, sem adicionar bactéria.

As placas foram incubadas, por 30 dias, em sala de crescimento sob condições controladas de luminosidade, temperatura e fotoperíodo, descritas anteriormente. Avaliou-se a eficiência da carbenicilina em eliminar a *Agrobacterium* do meio de cultura, bem como a capacidade de formação e de desenvolvimento de brotos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Indução de regeneração

Observou-se que a porcentagem de calos e de brotos formados variou de acordo com a fonte de explante, bem como com o tratamento empregado (Figura 3, A e B). A utilização de segmentos internodais possibilitou a formação de calos e raízes em todos os tratamentos, exceto o controle (T1). As brotações foram formadas nos tratamentos T2 a T7 (Figura 3A). O tratamento T7 apresentou o melhor resultado, pois proporcionou 100% de calogênese e a maior formação de brotos (55%). Não houve formação de brotos no tratamento controle (T1) e nos tratamentos em que se utilizou a combinação de AIA e ZEA (T8 à T13).

Quando se utilizaram explantes foliares, houve formação de calos e raízes em todos os tratamentos (exceto T1 – controle), sem, no entanto, ocorrer a formação de brotações (Figura 3B).

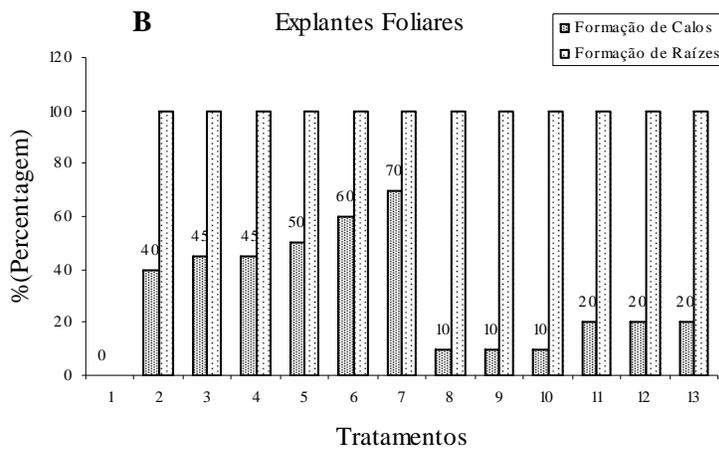
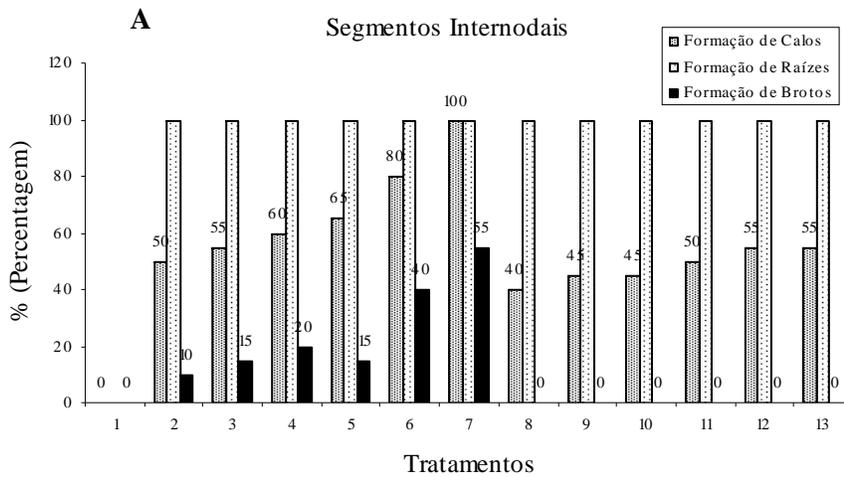


FIGURA 3 Percentagem de formação de calos, brotos e raízes em segmentos internodais (A) e em explantes foliares (B) de batata cv. Atlantic, após 30 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Os aspectos qualitativos dos calos, brotos e raízes formados a partir de segmentos internodais podem ser visualizados na Figura 4.

A percentagem de formação de calos em explantes foliares foi inferior em todos os tratamentos, em comparação com a utilização de segmentos internodais. O tratamento T7 se mostrou mais eficiente para a formação de calos em explantes foliares. Grande parte dos explantes foliares sofreu oxidação, possivelmente por ocasião do manuseio dos mesmos, originando calos de aspecto amarronzado e sem a capacidade de formar brotos (Figura 5).

Os resultados mostram que segmentos internodais são explantes ideais para a organogênese indireta (com formação de calos) em batata cv. Atlantic, devendo-se utilizar o meio WPM suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA + $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ZEA (T7).

Os detalhes da organogênese indireta a partir de segmentos internodais de batata cv. Atlantic submetidos ao tratamento T7, o qual propiciou a obtenção de plantas morfológicamente normais, encontram-se na Figura 6.

De maneira geral, a suplementação do meio de cultura com diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento tem influência direta no processo de morfogênese *in vitro* (Grattapaglia & Machado, 1998).

Segundo Skoog & Miller (1957), níveis mais elevados de citocininas em relação aos de auxinas induzem a formação de brotos. Isso pode ser observado, por exemplo, para o tratamento T7, no qual a concentração de ZEA (citocinina) foi de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ e a de ANA (auxina) foi de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$.

A morfogênese de calos nem sempre leva à formação de brotações viáveis. Embora brotos e raízes possam ser emitidos, pode não ocorrer uma conexão vascular entre eles, o que é de extrema necessidade para a viabilização da plântula (Wetmore & Rier, 1963).



FIGURA 4 Aspectos qualitativos da formação de calos, raízes e brotos em segmentos internodais de batata cv. Atlantic. A – 15 dias e B – 30 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 2008.

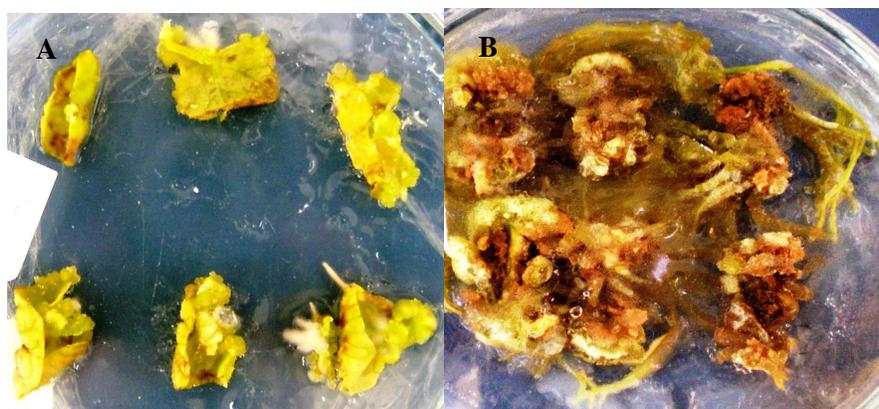


FIGURA 5 Aspectos qualitativos da formação de calos e raízes em explantes foliares de batata cv. Atlantic. A – 15 dias e B – 30 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 2008.

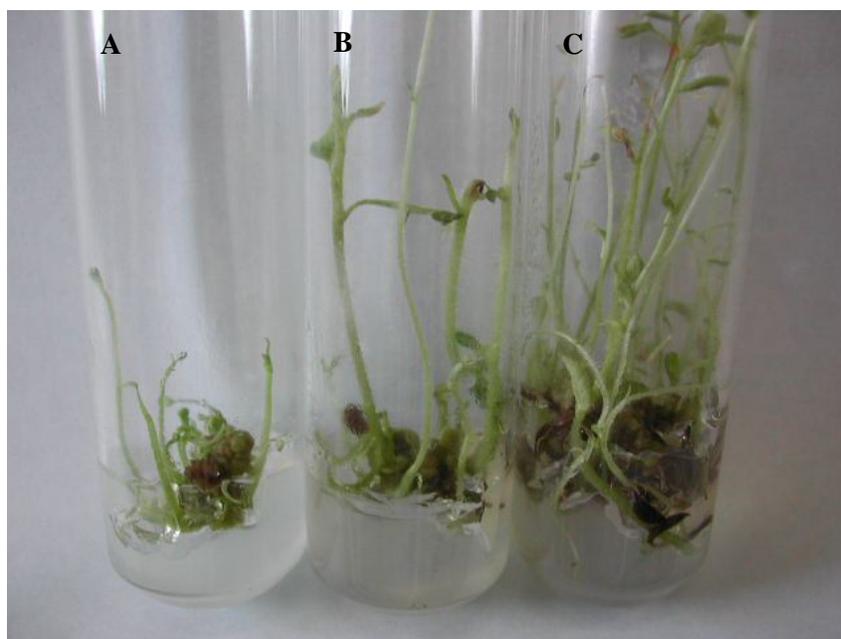


FIGURA 6 Organogênese indireta a partir de segmentos internodais de batata cv. Atlantic submetidos ao tratamento T7 ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA + $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ZEA). A – 30 dias; B – 45 dias; C – 60 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Wordragen & Dons (1992); Torres et al. (2000) verificaram que, na regeneração de plantas de batata cultivares Baronesa e Macaca, os entrenós utilizados como explantes apresentaram número maior de brotações do que os explantes foliares.

Os meios de cultura descritos para regenerar os diferentes explantes de batata apresentam, basicamente, a composição do meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com combinações hormonais, principalmente auxina e citocinina.

Campos (1995), trabalhando com batata cv. Baronesa, obteve 80% de explantes com formação de calos e 46% de formação de brotos utilizando

diferentes meios de cultura, propostos por Trinca et al. (1991). As combinações de ZEA de 1,0 a 3,0 mg L⁻¹ e AIA de 0,01 a 0,02 mg L⁻¹ ou de BAP – benzilaminopurina (citocinina) de 2,0 a 3,0 mg L⁻¹ e ANA – ácido naftalenoacético (auxina) de 0,01 a 0,2 mg L⁻¹ produziram bons resultados na regeneração de plantas de batata cv. Baronesa.

Torres et al. (2003), baseado no protocolo de Trinca et al. (1991), utilizaram o meio MS suplementado com 2,0 mg L⁻¹ de ZEA, 3,0 mg L⁻¹ de AIA e 0,05 mg L⁻¹ de GA₃ (ácido giberélico) para as cultivares Baronesa e Macaca, obtendo resultados semelhantes para as duas cultivares.

Gustafson et al. (2006), realizando experimentos com a cultivar Shepody, utilizaram combinações de ANA nas concentrações de 0; 0,1 e 1,0 mg L⁻¹ e ZEA nas concentrações de 0; 0,1; 1,0; 5,0 mg L⁻¹ para o meio de indução de calos. Para o meio de regeneração, utilizaram-se as mesmas concentrações do meio de indução de calos acrescido de 1,0 mg L⁻¹ de ZEA.

Banerjee et al. (2006), em experimentos de transformação de batata via *Agrobacterium tumefaciens*, utilizaram, na composição do meio de indução de calos, 5,0 mg L⁻¹ de ANA e 0,1 mg L⁻¹ de BAP. Para o meio de regeneração, foram utilizados 2,2 mg L⁻¹ de ZEA, 0,02 mg L⁻¹ de ANA e 0,15 mg L⁻¹ de GA₃.

Campos (2007), trabalhando com batata cv. Monalisa, obteve 100% de formação de calos e brotos a partir de segmentos internodais, utilizando meio MS suplementado com 0,05 mg L⁻¹ de ANA, 0,1 mg L⁻¹ de GA₃ e 3,0 mg L⁻¹ de ZEA.

5.2 Efeito de diferentes concentrações de carbenicilina sobre a taxa de regeneração de brotos e desenvolvimento de plântulas normais

A carbenicilina é um antibiótico que tem sido usado com frequência para eliminar *A. tumefaciens* de células e tecidos vegetais após o co-cultivo em

experimentos de transformação. Mas, poucos são os relatos, na literatura, a respeito dos eventuais efeitos do mesmo sobre as respostas *in vitro* das espécies de plantas transformadas.

Pelos dados da Tabela 2 verifica-se que, aos 30 dias de cultivo, os segmentos internodais tratados com antibióticos (100, 250 e 500 mg L⁻¹) formaram menos brotos, quando comparados ao tratamento controle (MIB).

Observou-se também que, de 30 para 60 dias em cultura, houve um incremento no percentual de regeneração de segmentos internodais. Supõe-se que um incremento de 30 dias no tempo de cultivo tenha favorecido a diferenciação de um maior número de células em brotos.

TABELA 2 Percentagem de formação de brotos em segmentos internodais de batata cv. Atlantic aos 30 e 60 dias, em função de diferentes doses de carbenicilina. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Meios de indução	Nº total de segmentos internodais	% de formação de brotos	
		Aos 30 dias	Aos 60 dias
MIB	50	56	58
MIB + Cb (100 mg L ⁻¹)	50	38	66
MIB + Cb (250 mg L ⁻¹)	50	44	72
MIB + Cb (500 mg L ⁻¹)	50	36	60

O maior índice de segmentos internodais com brotos (72%) ocorreu aos 60 dias em cultura, utilizando-se o meio contendo 250 mg L⁻¹ de Cb.

O efeito de crescentes concentrações de carbenicilina (0, 100, 250 e 500 mg L⁻¹) sobre o desenvolvimento *in vitro* de plântulas normais de batata cv.

Atlantic, a partir de gemas axilares, foi avaliado por meio das médias de altura de plântulas (cm), número de brotos e comprimento der raízes (cm).

A análise de regressão polinomial para as variáveis altura de plantas, número de nós formados e comprimento de raízes em relação às concentrações de Cb foi expressa por meio de regressões lineares (Figura 7). Os resultados ilustrados na Figura 7A indicam que a altura de plantas foi reduzida de acordo com o aumento da concentração de Cb. Uma completa inibição do desenvolvimento das plântulas não foi observada em nenhuma das concentrações utilizadas. O coeficiente de determinação (R^2) de 99% indica um ótimo ajuste do modelo aos dados observados.

Quanto às variáveis número de nós formados e comprimento de raízes, verificou-se que as análises de regressão polinomial também expressaram um elevado coeficiente de determinação (96%). Conforme a Figura 7B, o número de nós formados nas plantas foi decrescente em relação à concentração de Cb.

Verificou-se que o desenvolvimento de raízes foi afetado pela presença da carbenicilina no meio de cultura, obtendo-se comprimentos menores aumentando-se a concentração de Cb (Figura 7C).

Os efeitos de diferentes concentrações de carbenicilina sobre o desenvolvimento de plântulas de batata cv. Atlantic oriundas do cultivo *in vitro* são mostrados na Figura 8. O aspecto de uma plântula de batata morfológicamente normal, evidenciando o comprimento radicular, pode ser visto na Figura 9.

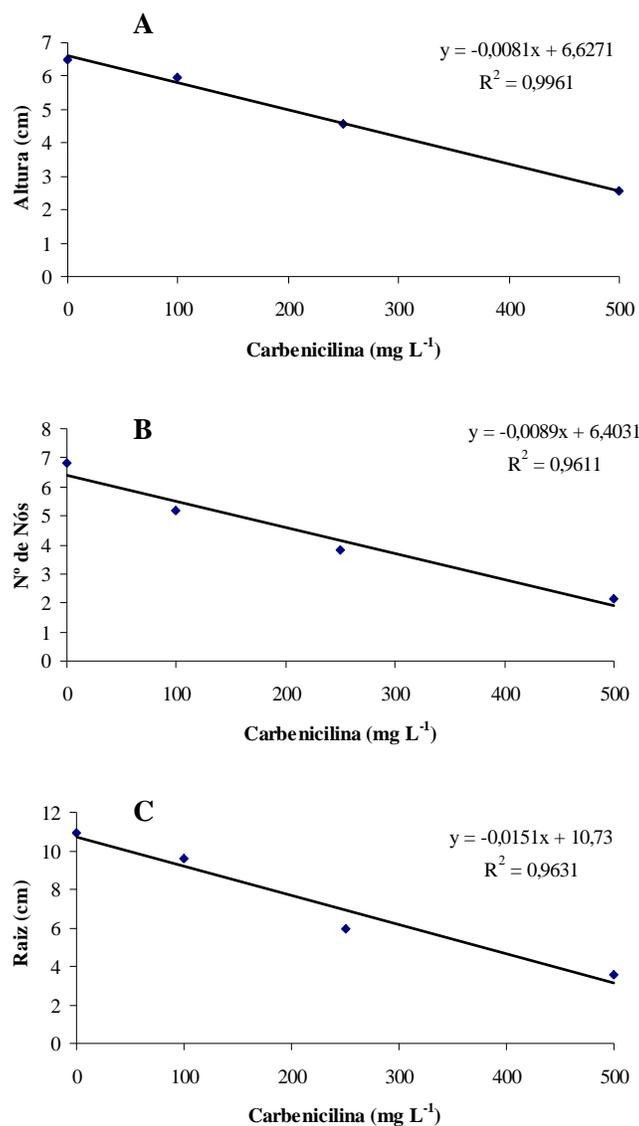


FIGURA 7 Efeito de diferentes concentrações de carbencilina (0, 100, 250 e 500 mg L⁻¹) sobre a altura de plantas (A), número de nós formados (B) e comprimento de raízes (C) da cv. Atlantic, após 30 dias em cultura. UFLA, Lavras, MG, 2008.

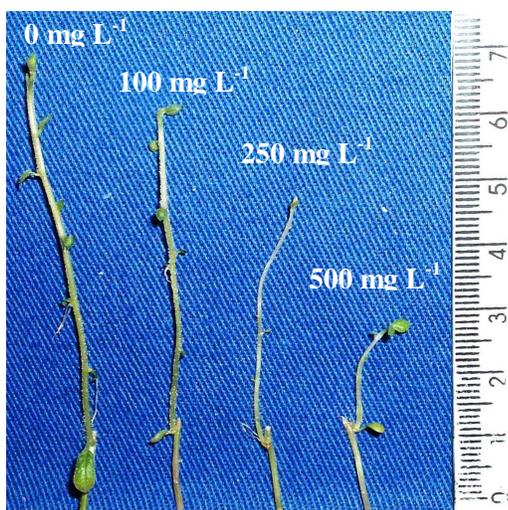


FIGURA 8 Efeito de diferentes concentrações de carbenicilina, em meio WPM, sobre o desenvolvimento de plântulas de batata cv. Atlantic, após 30 dias em cultura UFLA, Lavras, MG, 2008.

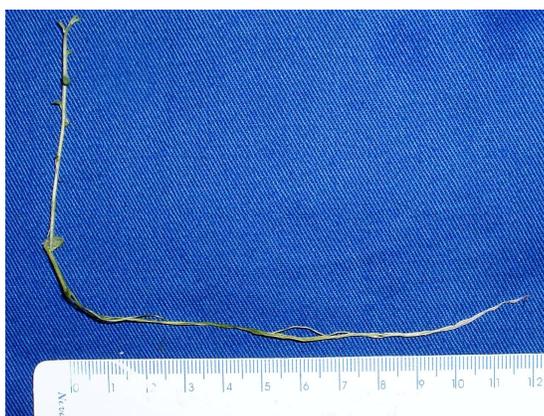


FIGURA 9 Aspecto de uma plântula morfológicamente normal de batata cv. Atlantic, evidenciando o comprimento radicular após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio WPM + 100 mg L⁻¹ de carbenicilina. UFLA, Lavras, MG, 2008.

Aparentemente, a adição de carbenicilina ao meio de indução de brotos potencializou a regeneração dos explantes após 60 dias de cultivo.

Pollock et al. (1983), também observaram um incremento no crescimento de colônias de cloroplastos de *Nicotiana plumbaginifolia*, proporcionado pelas penicilinas, a ampicilina e a carbenicilina. Nesse sentido, Nickell (1952), citado por Pollock et al. (1983), já havia observado a habilidade das penicilinas em agir como substância reguladora do crescimento de plantas.

Campos (1995) encontrou respostas semelhantes quando da adição de 300 mg L⁻¹ de Cb ao meio de indução de brotos, obtendo, aproximadamente, 77% de formação de brotos, em segmentos internodais de batata cv. Baronesa, após 30 dias. Na ocasião, foram encontrados efeitos semelhantes para as variáveis altura de plantas, número de nós e comprimento de raízes, tendo os valores dessas variáveis diminuído com doses crescentes de antibiótico suplementado ao meio para alongamento de brotos.

5.3 Transformação genética de batata cv. Atlantic por *Agrobacterium tumefaciens*

Não foi possível a formação de brotos em segmentos internodais de batata cv. Atlantic, co-cultivados com *A. tumefaciens* EHA 105, segundo descrições do item 4.4.3. Isso ocorreu devido ao fato de as dosagens de 100, 250 e 500 mg L⁻¹ de carbenicilina não terem sido eficientes para a eliminação da bactéria. O contato da bactéria com os explantes conferiu aos mesmos uma coloração esbranquiçada, contribuindo para a sua perda qualitativa.

Nos tratamentos controle também não foi possível a formação de brotos em segmentos internodais de batata.

Uma possível explicação para estes resultados está no vedamento das placas com parafilme, durante o co-cultivo, o que pode ter dificultado as trocas

gasosas, favorecendo o acúmulo de etileno e ocasionando perdas qualitativas dos explantes.

Campos (1995), em experimentos de transformação genética, também encontrou dificuldades na regeneração e na sobrevivência de explantes controles de batata cv. Baronesa, os quais se apresentaram, muitas vezes, aclorofilados ou oxidados. No entanto, foi obtido sucesso com explantes co-cultivados com LBA 4404/pBi-PVY. Uma possível explicação para este fato é o fato de existir algum fator relacionado com a presença da bactéria influenciando essas respostas. Segundo Alt-Moerbe et al. (1988), a trans-zeatina é secretada pela bactéria durante o seu crescimento, cuja expressão é constitutiva em pH neutro. Outra explicação seria uma elevada interação entre *A. tumefaciens* LBA 4404/pBI-PVY e este genótipo, visto que a sobrevivência e a viabilidade dos explantes co-cultivados não foram afetadas pela presença da bactéria na concentração utilizada.

Spychalla & Bevan (1993) regeneraram brotos diretamente a partir de segmentos internodais transformados de batata cv. Desirée, sob meio de cultura contendo 3,0 mg L⁻¹ de BAP + 0,01 mg L⁻¹ de ANA + 500 mg L⁻¹ de Cb + 100 mg L⁻¹ de Kan, porém, as brotações foram observadas somente aos 40 dias em cultura.

Banerjee et al. (2006), em experimentos de transformação de batata (*S. tuberosum* L. ssp. *andigena*), obtiveram sucesso na formação de brotações e eliminação de *A. tumefaciens* GV2260 do meio de cultura, utilizando 250 mg L⁻¹ do antibiótico cefotaxima + 50 mg L⁻¹ de canamicina.

Para Gustafson et al. (2006), este sucesso foi obtido com a utilização de 300 mg L⁻¹ de cefotaxima + 100 mg L⁻¹ de canamicina, em experimentos de transformação com a cultivar Shepody.

Para o controle de bactérias no cultivo *in vitro*, normalmente, são utilizadas substâncias antibióticas que são incorporadas ao meio de cultura ou

usadas diretamente sobre os explantes contaminados (Salehi & Khosh-Khui, 1997).

Mesmo que se utilizem antibióticos de amplo espectro, o controle bacteriano na cultura de tecidos é problemático. Na maioria dos trabalhos *in vitro*, a frequência de descontaminação não é total, pois os tecidos vegetais podem interferir no controle por meio da destoxificação dessas substâncias ou servindo como hábitat para os contaminantes que se translocam por seus tecidos. É comum que as concentrações de antibióticos devam ser elevadas quando estes são adicionados ao meio nutritivo juntamente com o explante, no entanto, a fitotoxicidade dessas substâncias é fator limitante dessas concentrações.

Uma das alternativas para se evitar o efeito tóxico dos antibióticos sobre os explantes é reduzir ao máximo o tempo do tratamento (contato) dos explantes com o agente antimicrobiano. No entanto, esta técnica, muitas vezes, causa efeitos apenas bacteriostáticos, constituindo uma ação paliativa frente ao principal objetivo, que é a eliminação por completo do organismo contaminante. Em virtude da fitotoxicidade e do alto custo do tratamento, os antibióticos devem ser utilizados apenas em contaminantes específicos das culturas, pois, somente as bactérias que estiverem dentro do espectro de ação de cada antibiótico serão controladas (Leifert & Woodward, 1998; Teng & Nicholson, 1997).

Nesse sentido, torna-se interessante testar outros antibióticos e diferentes concentrações que possam vir a eliminar a *A. tumefaciens* do meio de cultura, sem, no entanto, influenciar na organogênese *in vitro*. Esta determinação é um ponto crucial para a continuidade desse sistema de transformação genética.

6 CONCLUSÕES

A eficiência da organogênese *in vitro* é influenciada pelo tipo de explante e pelo tipo e concentração do regulador de crescimento utilizado.

Segmentos internodais de batata cv. Atlantic apresentam melhor capacidade organogénica em relação aos explantes foliares.

Recomenda-se utilizar o meio WPM suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de ANA + 5,0 mg L⁻¹ de ZEA (meio MIB) para se obter brotações em segmentos internodais de batata cv. Atlantic.

A carbenicilina adicionada ao meio MIB potencializa a formação de brotos em segmentos internodais de batata cv. Atlantic, após 60 dias.

Concentrações crescentes de carbenicilina (100, 250 e 500 mg L⁻¹) adicionadas ao meio de alongamento de brotos promovem uma diminuição na altura de plantas, número de nós e comprimento radicular.

Após o co-cultivo de segmentos internodais, estas concentrações não foram eficientes na eliminação de *A. tumefaciens*.

Foi possível estabelecer um protocolo de organogênese *in vitro* de batata cv. Atlantic, a partir de segmentos internodais não co-cultivados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALT-MOERBE, J.; NEDDERMANN, P.; LINTIG, J. von ; WEILER, E. W.; SCHRÖDER, J. Temperature-sensitive tep in Ti plasmid vir-region induction and correlation with cytokinin secretion by *Agrobacterium*. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 213, n. 1, p. 1-8, July 1998.

BANERJEE, A. K.; PRATA, S.; HANNAPPEL, D. J. Efficient production of transgenic potato (*S. tuberosum* L. ssp. *andigena*) plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Plant Science**, Limerick, n.170, n. 3, p. 732-738, Apr. 2006.

CAMPOS, M. A. **Sistema de transformação de batata (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Baronesa mediado por *Agrobacterium tumefaciens***. 1995. 93 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitomelhoramento) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

CAMPOS, N. A. **Embriogênese somática e regeneração eficiente de batata (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Monalisa *in vitro***. 2007. 58 p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

EVANS, D. A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. **Handbook of plant cell culture**. Toronto: Macmillan, 1983. v. 2, 970 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPQ, 1998. v. 1, p. 183-260.

GUSTAFSON, V.; MALLUBHOT, S.; MACDONNELL, J.; SANYAL-BAGCHI, M.; CHAKRAVARTY, B.; WANG-PRUSKI, G.; ROTHWELL, C.; AUDY, P.; DEKOEYER, D.; SIAHBAZI, M.; FLINN, B.; REGAN, S. Transformation and plant regeneration from leaf explants of *Solanum tuberosum* L. cv. Shepody. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 85, n. 3, p. 361-366, June 2008.

LEIFERT, C.; WOODWARD, S. Laboratory contamination management: the requirement for microbiological quality assurance. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 52, n. 1/2, p. 83-88, 1998.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Internacional Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.

MILLER, J. H. **Experiments in molecular genetics**. New York: Cold Spring Harbor, 1972.

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, Mar. 1962.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Protocolo para a produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 9, p.1035-1043, set. 2003.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madri: Mundi Prensa, 1990. 326 p.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultures *in vitro*. **Symposium Society Experimental Biology**, Columbus, v. 11, p.118-131, 1957.

POLLOCK, K.; BARFIELD, D. G.; SHIELDS, R. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. **Plant Cell Reports**, New York, v. 2, n. 1, p. 36-39, 1983.

SALEHI, H.; KHOSH-KHUI, M. A simple procedure for disinfection of “baby masquerade” miniature rose explants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 68, n.1/4, p. 145-148, Mar. 1997.

TENG, W. L.; NICHOLSON, L. Pulse treatments of penicillin-G and streptomycin minimize internal infections and have post-treatment effects on the morphogenesis of ginseng root culture. **Plant Cell Reports**, New York, v. 16, n. 8, p. 531-535, 1997.

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

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; WIDHOLZER, C. F. N.; ROMANO, E.; PETERS, J. A. Expressão eficiente do gene reporter b-glucuronidase nos tecidos vasculares de batata (*Solanum tuberosum L.*) utilizando de um promotor específico (BRA3) de *Agrobacterium rhizogenes*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p.177-180, jun. 2003.

TRINCA, S.; DE PACE, C.; CACCIA, R.; SCARASCIA-MUGNOZZA, G.; DODDS, J. H.; JAYNES, J. Transformation of potato (*Solanum tuberosum L.*) leaf disc using *A. tumefaciens* mediated transfer of DNA sequences coding for lytic peptides. In: **Molecular methods for potato improvement**. Lima: CIP, 1991. p. 85-95. Report of the Planning Conference on Application of Molecular Techniques to Potato Germplasm Enhancement, Lima, Peru, 1990.

VISSER, R.G.F. Regeneration and transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens*. In: LINDSEY, K. **Plant tissue culture manual**. New Delhi: Springer, 1991. p. 1-9.

WETMORE, R. H.; RIER, J. P. Experimental induction of vascular tissues in callus of angiosperms. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 50, n. 5, p. 418-430, May 1963.

WORDRAGEN, M. F. V.; DONS, H. J. M. *Agrobacterium tumefaciens*: mediated transformation of recalcitrant crops. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 10, p. 12-36, 1992.