

# Regeneração de brotos a partir de folhas de Mirtilo cultivadas *in vitro*

Francine Ferreira Cassana<sup>1</sup>, Luciano da Silva Pinto<sup>2</sup>, Simone Pohl<sup>3</sup>, Valmor João Bianchi<sup>4</sup>, Eugenia Jacira Bolacel Braga<sup>4</sup> e José Antonio Peters<sup>4</sup>

## Introdução

Espécies de mirtilo (*Vaccinium sp.*) são fontes ricas em flavonóides (antocianidinas), sendo suas frutas reconhecidas pela alta capacidade antioxidante e pela presença de ácido ascórbico (vitamina C) prevenindo, assim, o risco de acidentes cardiovasculares [1, 2, 3, 4]. Além disso, podem ser responsáveis pela inibição de células tumorais [5].

Processos de regeneração em tecidos diferenciados e indiferenciados são potencialmente aplicados como ferramenta para a propagação de plantas e para a engenharia genética [6]. Contudo, segundo Song & Sink [4], o mirtilo está ainda entre as plantas hortícolas particularmente recalcitrantes para transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Desta maneira, o estabelecimento de protocolos eficientes de regeneração, quer sejam por organogênese ou embriogênese serão de vital importância para a inserção de genes de interesse nesta espécie.

A regeneração de estruturas organogênicas ou de embriões somáticos difere de acordo com a espécie e com diversos fatores endógenos e exógenos, entre os quais o balanço hormonal [7]. As citocininas podem induzir diferentes respostas celulares e seus efeitos diferem de acordo com a sensibilidade do genótipo à especificidade e atividade destes fitorreguladores [8]. Assim, desde que citocininas são frequentemente aplicadas em combinação com auxinas, a resposta final dos processos de regeneração difere de acordo com a razão citocinina/auxina e da atividade biológica da citocinina utilizada [9].

Considerando o exposto acima, o presente trabalho teve como objetivo a otimização do processo de regeneração de *Vaccinium corymbosum* L., em função do tempo de exposição dos tecidos ao escuro e concentração de thidiazuron (TDZ), visando sua aplicação na transformação genética.

## Material e métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas.

Folhas provenientes da cultura *in vitro* de mirtilo

(*Vaccinium corymbosum* L., cv. Georgia Gem) foram excisadas, removendo-se os pecíolos e escarificadas em duas regiões da nervura central e, em seguida, submetidas a um pré-tratamento em meio líquido, constituído pelos sais minerais e vitaminas do meio WPM [10] suplementado com 2 mg L<sup>-1</sup> de TDZ e 0,2 mg L<sup>-1</sup> de ácido  $\alpha$  naftaleno acético (ANA), por 16 horas, a 125–130 rpm, temperatura de 25±°C e no escuro.

Posteriormente, as folhas foram colocadas sobre papel filtro estéril para a retirada do excesso de meio líquido e então transferidas para placas de Petri contendo meio WPM com 3% de sacarose e suplementado com 0,2 mg L<sup>-1</sup> de ANA e diferentes concentrações de TDZ. O pH do meio foi ajustado para 5,4 e solidificado com 6 g L<sup>-1</sup> de ágar, antes da autoclavagem (121°C e 1,5 atm por 20 minutos).

Os tratamentos consistiram de três meios de cultivo conforme descrito acima e suplementados com 2, 3 e 4 mg L<sup>-1</sup> de TDZ, (constituindo os meios A, B e C, respectivamente), duas posições do explante no meio de cultura (abaxial e adaxial) e três períodos de escuro (cinco, seis e sete semanas, denominados escuro 1, 2 e 3, respectivamente). Os explantes foram acondicionados em câmara escura a 25 ± 1°C e, posteriormente, transferidos para luz sob densidade de fluxo de fótons de 21  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , com fotoperíodo de 16 horas e mesma temperatura.

Para a variável número de estruturas organogênicas ou embriogênicas por explante, as avaliações foram realizadas ao final do período escuro e uma semana após a transferência para a luz.

Após dez semanas da instalação dos tratamentos, os explantes foram transferidos para um meio de desenvolvimento de brotações, constituído do meio básico de WPM semi-sólido, suplementado com 5 mg L<sup>-1</sup> de isopenteniladenina (2iP) e mesmas concentrações de sacarose e ágar. Em três semanas de cultivo neste meio, foram avaliadas as percentagens de explantes com brotos e o número médio de brotos por explante.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x2x3 com três repetições por tratamento. Cada repetição foi constituída por dez explantes.

A análise estatística foi realizada pelo Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores – SANEST

1. Mestranda do PPG em Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário, Pelotas-RS, CEP 96010-900. E-mail: frafc@ibest.com.br

2. Doutorando do PPG em Biotecnologia Agrícola, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas. Campus universitário, Pelotas-RS, CEP 96010-900.

3. Mestranda do PPG em Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário, Pelotas-RS, CEP 96010-900.

4. Professor Adjunto do Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas. Campus universitário, Pelotas-RS, CEP 96010-900.

Apoio financeiro: CAPES.

[11], e as médias comparadas pelo teste de Tukey, com 5% de probabilidade de erro.

## Resultados e Discussão

Após três semanas no meio de cultura, as folhas já apresentavam intumescimento próximo às nervuras centrais, principalmente nas regiões escarificadas. Em geral, os calos, quando presentes, apresentavam coloração amarelo-pálido. Observou-se, também, que a maioria dos explantes submetidos a cinco e seis semanas de escuro apresentava calos incipientes nas regiões escarificadas das folhas, principalmente quando a parte adaxial estava em contato com o meio. No entanto, quando submetidos a sete semanas de escuro, houve maior formação de calos friáveis, independente do lado do explante em contato com o meio de cultura (abaxial ou adaxial) e dos meios utilizados.

As avaliações realizadas ao final dos períodos de escuro revelaram interação entre todos os fatores, sendo que sete semanas de escuro proporcionaram maior indução de estruturas embriogênicas ou organogênicas nos meios utilizados, exceto para o lado adaxial que não diferiu significativamente dentro dos meios B e C, entre seis e sete semanas e em todos os períodos de escuro, respectivamente (Tab. 1, Fig. 1A, 1B, 1C). O lado abaxial diferiu significativamente do adaxial, principalmente quando submetidos a sete semanas de escuro. O meio B tendeu a induzir maior número de estruturas embriogênicas ou organogênicas em todos os períodos de escuro, embora não tenha ocorrido diferença estatística significativa em relação aos demais meios de cultura em sete semanas de escuro, independentemente do lado foliar (Tab. 1).

Com relação ao número de estruturas embriogênicas ou organogênicas, as avaliações realizadas ao final de uma semana de exposição à luz confirmaram as observações acima, indicando que o lado foliar abaxial foi significativamente diferente em todos os períodos de escuro e meios utilizados, com exceção do meio A e cinco semanas no escuro, no qual não ocorreu variação significativa entre os lados expostos aos meios de cultura. O lado abaxial dos explantes em contato com o meio B apresentou maior número de estruturas em relação aos demais meios, quando submetidos a cinco ou seis semanas de escuro (Tab. 2, Fig. 1D), enquanto que com sete semanas, os meios A e B não diferiram entre si, entretanto o meio B continuou induzindo maior formação de estruturas embriogênicas ou organogênicas (Tab. 2).

Para a percentagem de explantes com brotos e número de brotos formados por explante não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos. Entretanto, após três semanas no meio de desenvolvimento das brotações (Fig. 1F), verificou-se que a percentagem de explantes com brotos tendeu a ser maior quando o lado abaxial dos explantes foi colocado em contato com os meios, variando entre 76,67 a 100% em todos os períodos de escuro (Tab. 3). Em relação ao número de brotações por explante, o meio B tendeu a induzir maior resposta, com 5,07 brotos nos tratamentos com sete semanas de escuro e lado abaxial da folha (Tab. 3, Fig. 1E).

Tais resultados demonstram que o processo de indução de estruturas organogênicas ou embriogênicas em mirtilo requer um período de escuro maior do que cinco semanas, visto que estudos preliminares (dados não mostrados) indicaram que períodos de escuro menores ou até mesmo a incubação direta em luz, leva a oxidação dos explantes. Observou-se, também, que a maioria das estruturas induzidas nos explantes, ocorria no lado adaxial, sendo, portanto, indicado colocar o lado abaxial em contato com o meio de cultura.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

## Referências

- [1] KALT, W.; MCDONALD, J.E. & DONNER, H. 2000. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity of processed lowbush blueberry products. *Journal of Food Science and Technology*, 65: 390-393.
- [2] KANDIL, F.E.; SMITH, M.A.L.; ROGERS, R.B.; PEPIN, M.F.; SONG, L.L.; PEZZUTO, J.M. & SEIGLER, D.S. 2002. Composition of a chemopreventive proanthocyanidin-rich fraction from cranberry fruits responsible for the inhibition of 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA)-induced ornithine decarboxylase (ODC) activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1063-1069.
- [3] SMITH, M.A.L.; MARLEY, K.A.; SEIGLER, D.; SINGLETARY, K.W. & MELINE, B. 2000. Bioactive properties of wild blueberry fruits. *Journal of Food Science and Technology*, 65: 352-356.
- [4] SONG, G.Q. & SINK, K.C. 2004. *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Plant Cell Reports*, 23: 475-484.
- [5] BOMSER, J.; MADHAVI, D.L.; SINGLETARY, K. & SMITH, M.A. 1996. *In vitro* anticancer activity of fruit extracts from *Vaccinium* species. *Planta Medica*, 62: 212-216.
- [6] KHACHATOURIANS, G.G.; MCHUGHEN, A.; SCORZA, R.; NIP, W. & HUI, Y.H. 2002. Transgenic plants and crops. New York: Dekker. p. 327-449.
- [7] D'ONOFRIO, C. & MORINI, S. 2006. Somatic embryo, adventitious root and shoot regeneration *in vitro* grown quince leaves as influenced by treatments of different length with growth regulators. *Scientia Horticulturae*, 107: 194-199.
- [8] KHANAM, N.; KHOO, C. & KHAN, A.G. 2000. Effects of cytokinin/auxin combination on organogenesis, shoot regeneration and tropane alkaloid production in *Duboisia myoporoides*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 62: 125-133.
- [9] D'ONOFRIO, C. & MORINI, S. 2005. Development of adventitious shoots from *in vitro* grown *Cydonia oblonga* leaves as influenced by different cytokinins and treatment duration. *Biologia Plantarum*, 49: 17-21.
- [10] LLOYD, E. & MCCOWN, B. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Proceedings International Plant Propagators Society*, 30: 421-427.
- [11] ZONTA, E.P. & MACHADO, A.A. 1987. SANEST – Sistema de análise estatística para microcomputadores. Pelotas: DMEC/IFM/UFPel, 138p.

**Tabela 1.** Número de estruturas embriogênicas ou organogênicas formadas em folhas de *Vaccinium corymbosum*, cv. Georgia Gem, ao final do período de escuro.

Meio de cultura	Período escuro					
	Escuro 1		Escuro 2		Escuro 3	
	Lado Foliar					
	Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial
A	1.76 bB $\infty$	1.97 bB $\infty$	2.30 bB $\infty$	2.63 bB $\infty$	8.09 aA $\infty$	5.42 aA $\beta$
B	5.29 aB $\infty$	2.16 abB $\beta$	5.22 aB $\infty$	4.70 aA $\infty$	8.35 aA $\infty$	4.52 aA $\beta$
C	2.72 bC $\infty$	3.36 aA $\infty$	5.55 aB $\infty$	3.93 abA $\beta$	7.40 aA $\infty$	3.89 aA $\beta$

Letra maiúscula compara o efeito dos períodos de escuro em relação a cada nível dos fatores meio e lado foliar. Letra minúscula compara o efeito do meio de cultura em relação a cada nível dos fatores período de escuro e lado foliar. Letra grega compara o efeito do lado foliar em relação a cada nível dos fatores escuro e meio. Médias seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

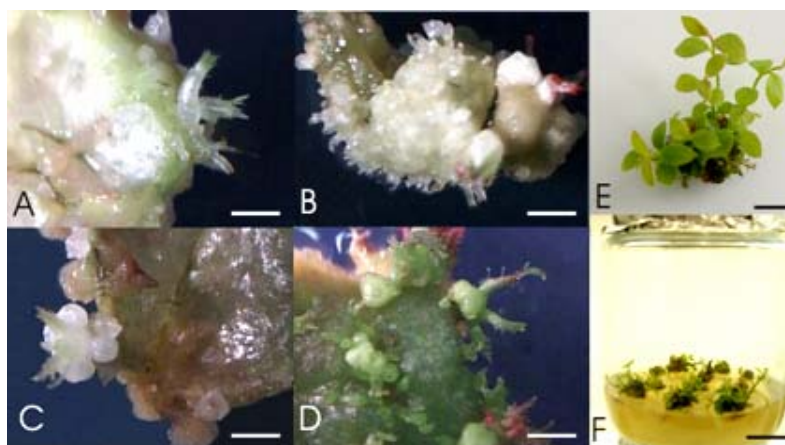
**Tabela 2.** Número de estruturas embriogênicas ou organogênicas formadas em folhas de *Vaccinium corymbosum*, cv. Georgia Gem, ao final de uma semana de luz, após o período de escuro.

Meio de cultura	Período escuro + 1 semana de luz					
	Escuro 1		Escuro 2		Escuro 3	
	Lado Foliar					
	Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial	Abaxial	Adaxial
A	3.23 cC $\infty$	3.60 aB $\infty$	6.83 bB $\infty$	3.25 bB $\beta$	13.20 aA $\infty$	8.57 aA $\beta$
B	7.86 aB $\infty$	3.89 aB $\beta$	8.93 aB $\infty$	5.95 aA $\beta$	13.56 aA $\infty$	6.57 bA $\beta$
C	6.14 bB $\infty$	4.43 aB $\beta$	8.50 abA $\infty$	6.26 aA $\beta$	8.92 bA $\infty$	5.56 bA $\beta$

Letra maiúscula compara o efeito dos períodos de escuro em relação a cada nível dos fatores meio e lado foliar. Letra minúscula compara o efeito do meio de cultura em relação a cada nível dos fatores período de escuro e lado foliar. Letra grega compara o efeito do lado foliar em relação a cada nível dos fatores escuro e meio. Médias seguidas pela mesma letra não apresentaram diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

**Tabela 3.** Percentagem de explantes com brotos e número médio de brotos por explante, ao final de três semanas em meio de desenvolvimento de brotações, a partir de folhas de *Vaccinium corymbosum*, cv. Georgia Gem, submetidas a diferentes tratamentos.

Meio de cultura	Lado foliar	Período escuro		Escuro 2		Escuro 3	
		% Explantes com brotos	Nº brotos por explante	% Explantes com brotos	Nº brotos por explante	% Explantes com brotos	Nº brotos por explante
A	Abaxial	80,00	3,30	76,67	3,30	86,67	3,13
	Adaxial	73,33	3,53	73,33	2,63	80,00	3,37
B	Abaxial	86,67	3,57	80,00	3,47	100,00	5,07
	Adaxial	66,67	3,47	70,00	2,40	86,67	3,49
C	Abaxial	80,00	2,70	90,00	2,07	83,33	3,30
	Adaxial	80,00	2,67	43,33	1,97	80,00	2,40



**Figura 1.** Regeneração de gemas ou brotos a partir de folhas de mirtilo cultivadas *in vitro*. A) WPM 2 mg L<sup>-1</sup> TDZ e 0,2 mg L<sup>-1</sup> ANA, adaxial, cinco semanas de escuro; B) WPM 4 mg L<sup>-1</sup> TDZ e 0,2 mg L<sup>-1</sup> ANA, abaxial, cinco semanas de escuro; C) WPM 4 mg L<sup>-1</sup> TDZ e 0,2 mg L<sup>-1</sup> ANA, adaxial, seis semanas de escuro; D) WPM 3 mg L<sup>-1</sup> TDZ e 0,2 mg L<sup>-1</sup> ANA, abaxial, uma semana de luz, após cinco semanas de escuro; E) Meio de desenvolvimento das brotações: WPM 5 mg L<sup>-1</sup> 2iP; F) Brotos ao final de três semanas de cultivo no meio com 5 mg L<sup>-1</sup> 2iP, provenientes do meio B, lado foliar abaxial, 7 semanas de escuro. Barras = 1 mm (A,B,C,D), 5 mm (E), 15 mm (F).