

CULTURA IN VITRO DE *Solanum paludosum*: REGENERAÇÃO

Annie Elisabeth Santiago Beltrão

Pesquisador, UFPB, Laboratório de tecnologia Farmacêutica, CEP 58.051-907, Joaoa Pessoa-PB
E-mail: annie@lft.ufpb.br

Romulo Marino Lamoca-Zarate

Prof. Adjunto, UFPB, Departamento de Biologia molecular, CEP 58.051-907, Joaoa Pessoa-PB
E-mail: llamazaro@dbm.ufpb.br

Fabiana Augusta Santiago Beltrão

Aluna de Mestrado, PPGZ/CCA/UFPB, Programa de Pos-Graduação em Zootecnia, CEP 58.397-000, Areia –PB
E-mail: fabianasantiagobeltrao@yahoo.com.br

Resumo – *Solanum paludosum*, vulgarmente conhecida como Jurubeba roxa é uma espécie da família solanácea encontrada no Nordeste Brasileiro e rica em moléculas de interesse farmacológico. Entre estas moléculas destaca-se a solasodina que é um alcalóide esteroide que se apresenta in natura na forma glicosídica e constitui-se em matéria prima para a semi-síntese dos hormônios adrenocorticais e glicocorticais, usados como agentes contraceptivos e anti-inflamatórios. Neste trabalho mostram-se os resultados de regeneração a partir de explantes de folhas, fragmentos de hipocótilo e raiz cultivados em meios MS acrescido de diferentes reguladores de crescimento. Foram obtidas plantas em meios de cultura contendo diferentes combinações em reguladores de crescimento sendo a combinação mais eficiente àquela que continha o ácidoindlicoacético (AIA 10^{-6}) e benzilaminapurina (BAP 10^{-5} M).

Palavras-chave: *Solanum paludosum*, hipocótilo, regeneração

CULTURE IN VITRO OF *Solanum paludosum*: REGENERATION

Abstract – *Solanum paludosum*, vulgarly known as purple Jurubeba is a species of the found in the Brazilian Northeast and rich solanácea family in molecules of farmacológico interest. Among these molecules it is distinguished solasodina that it is an esteroide alkali that if presents in nature in the glicosídica form and consists in substance cousin for the half-synthesis of adrenocorticais and glicocorticais, used hormones as contraceptive and anti-inflamatórios agents. In this work they show if the cultivated results of regeneration from explantes of leaves, fragments of hypocotyls and root in half MS increased of different regulators of growth. Most efficient that one had been gotten plants in ways of culture contends different combinations in growth regulators being the combination that contained the ácidoindlicoacético (AIA 10^{-6}) and benzilaminapurina (BAP 10^{-5} M).

Key Words: *Solanum paludosum*, hypocotyls, regeneration

INTRODUÇÃO

Solanum paludosum é uma solanácea popularmente conhecida como Jurubeba Roxa, Jurubeba Brava ou jubeba (PIO CORREA, 1965). Apresenta flores roxas, isoladas e pouco freqüentes, frutos em pequenas quantidades e em pequenos grupos. É uma planta nativa do Nordeste do Brasil, muito comum no estado da Paraíba. Não é utilizada na medicina popular, já foi estudada do ponto de vista fitoquímico e farmacológico, produz a solasodina, glicoalcaloide de estrutura esteroide (BHATTACHARIYYA, 1984; BARBOSA et al., 1991; NAIK et al., 199; VALVERDE et al., 1993). Esta molécula assim como a diosgenina, produzida por plantas do gênero Dioscorea, pode servir de base para a hemi-síntese de hormônios contraceptivos. O objetivo final do nosso trabalho é definir as condições de regeneração in vitro. A regeneração ou organogênese pode ser definida como a multiplicação direta de gemas adventícias (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990). É um

processo de multiplicação vegetativa que implica na obtenção de um vegetal completo a partir de uma única célula. Neste trabalho apresentamos as condições ideais para a organogênese de *Solanum paludosum* a partir de explantes de folhas e hipocótilo.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de tecnologia Farmacêutica, setor de Biotecnologia Vegetal. As sementes utilizadas foram coletadas de frutos sadios de plantas cultivadas em canteiros no horto de plantas medicinais. A desinfecção das sementes foi realizada utilizando-se solução de hipoclorito de sódio na concentração de 2%, sob capela e fluxo laminar contínuo. As sementes foram dispostas na solução por 20 minutos e em seguida lavadas em três banhos de água destilada estéril. Utilizou-se o meio de cultura de MURASHIGE, T & SKOOG (1962), acrescido de agar na concentração de 7,5 g/L e de sacarose na concentração de 20 g/L, o pH foi ajustado a 5.7 com solução de KOH 0.1M.

O meio foi acondicionado em potes de vidro do tipo “Nescafé”, contendo cada um 25 mL do meio e tampados com papel alumínio, a esterilização do meio de cultura foi feita por autoclavagem a 120⁰ C sob pressão de 1 atm . A inoculação nos meios foi realizada sob capela de fluxo laminar horizontal contínuo, em cada pote foram inoculadas doze sementes com auxílio de uma pinça, após a germinação as culturas foram levadas para a sala de crescimento, a intensidade luminosa foi de 25 μmol. cm⁻².s⁻¹ de irradiância.

Para a regeneração foram utilizadas como explantes, folhas, raízes e hipocótilo de plantas germinadas *in vitro*. Para a indução de plântulas fragmentos de folhas de 1 cm²

foram cortados e postos em contato com os meios, os explantes de hipocótilo mediram 1cm de comprimento, como os explantes de raiz. Para a regeneração utilizou-se o meio de base MS MURASHIGE, T & SKOOG (1962), acrescido de Agar 8g/L e sacarose 30 g/L, neste meio foram adicionados os reguladores de crescimento, três auxinas (ácidoindolacético (AIA), ácidonaftalenoacético (ANA) e ácidoindolbutírico (AIB)) e duas citocininas (6-benzilaminopurina (BAP) e zeatina (ZEA)) em diferentes concentrações e combinações de uma auxina e de uma citocinina por tratamento variando em 10⁻⁵, 10⁻⁶ e 10⁻⁷ M para cada regulador conforme Tabela 1.

Tabela 1: Concentrações de uma auxina e de uma citocinina por tratamento variando em 10⁻⁵, 10⁻⁶ e 10⁻⁷ M.

AIA.10 ⁻⁵ =1,64 mg/L	ANA,10 ⁻⁵ =1,84 mg/L	AIB,10 ⁻⁵ =2 mg/L
AIA.10 ⁻⁶ =0,164 mg/L	ANA,10 ⁻⁶ =0,184 mg/L	AIB,10 ⁻⁶ =0,2 mg/L
AIA.10 ⁻⁷ =0,0164 mg/L	ANA,10 ⁻⁷ =0,184 mg/L	AIB,10 ⁻⁷ =0,02 mg/L
BAP,10 ⁻⁵ =2,24 mg/L	ZEA,10 ⁻⁵ =2,188 mg/L	

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de germinação de sementes foi de 75,21% de um total de 200 sementes inoculadas. Caracterizou-se como tal àquelas que tiveram um bom desenvolvimento de raiz, caule e folhas. Resultados semelhantes também foram observados para outras solanáceas como *S. paraibanum* (DA COSTA et al., 1997) e *S. baturitense* (HOLANDA et al., 1997).

No experimento de regeneração, observou-se a formação de calos de diversos tamanhos em todas as concentrações e combinações de hormônios usados. Todos os explantes de folhas, hipocótilo e raiz deram origem a calos que variaram de tamanho dependendo do meio que estava sendo utilizado.

Obtivemos resultados de regeneração positivo a partir dos três tipos de explantes utilizados raiz, hipocótilo e folha. A frequência de regeneração no entanto é maior em explantes de hipocótilo em meio contendo BAP 2,24

mg/L) e AIA (0,164 mg/L). O quadro 1 traz resultados brutos de regeneração considerando os diferentes explantes e hormônios indutores empregados.

A indução de calos em todos os tratamentos também foi encontrado em experimentos de Chandler & Dodds (1983) com *S. Laciniatum*, esses autores encontraram calogênese em todos os tratamentos mas com diferentes intensidades de indução o que não foi observado no nosso caso.

El Badaoui et al (1996), também trabalhando com *Solanum paludosum*, obteve resultados de regeneração satisfatória a partir de calos em suspensão empregando ZEA 10⁻⁶ e AIA 10⁻⁶ como reguladores confirmando nossa concentração ideal para a auxina em explantes de folhas.

Quanto ao tempo de regeneração, nossos resultados se assemelham aos de Jan et al (1996) cujos tempo de regeneração a partir de folhas em *S. chalconense* é de seis semanas.

Quadro 1. Porcentagem de regeneração de *Solanum paludosum* a partir do cultivo *in vitro* de folhas, hipocótilo e raiz em meio MS acrescido de diferentes reguladores de crescimento.

Reguladores	Explantes	Regeneração %	Calos %	% raiz
ZEA 10 ⁻⁵ +ANA 10 ⁻⁵	Folha	20	100	40
	Hipocótilo	0	100	0
	Raiz	0	100	0
ZEA 10 ⁻⁵ +ANA 10 ⁻⁶	Folha	16,7	100	0
	Hipocótilo	100	100	0
	Raiz	0	100	0
ZEA 10 ⁻⁵ +ANA 10 ⁻⁷	Folha	0	100	0
	Hipocótilo	100	100	0
	Raiz	0	100	0

Continuação Quadro 1.				
BAP 10 ⁻⁵ +AIA 10 ⁻⁵	Folha	5	100	0
	Hipocótilo	62,5	100	37,5
	Raiz	0	100	0
BAP 10 ⁻⁵ +AIA 10 ⁻⁶	Folha	40,9	100	0
	Hipocótilo	100	100	10
	Raiz	0	100	0
BAP 10 ⁻⁵ +AIA 10 ⁻⁷	Folha	11,1	100	0
	Hipocótilo	100	100	0
	Raiz	0	100	50
BAP 10 ⁻⁵ +ANA 10 ⁻⁵	Folha	3,7	100	51,9
	Hipocótilo	0	100	28,6
	Raiz	0	100	0
BAP 10 ⁻⁵ +ANA 10 ⁻⁶	Folha	7,7	100	7,7
	Hipocótilo	83,3	100	8,3
	Raiz	0	100	0
BAP 10 ⁻⁵ +ANA 10 ⁻⁷	Folha	6,3	100	0
	Hipocótilo	100	100	7,7
	Raiz	0	100	0
BAP 10 ⁻⁵ +AIB 10 ⁻⁶	Folha	18,2	100	12,1
	Hipocótilo	61,5	100	15,4
	Raiz	0	100	0
BAP 10 ⁻⁵ +AIB 10 ⁻⁷	Folha	0	100	0
	Hipocótilo	76,9	100	0
	Raiz	0	100	0
ZEA 10 ⁻⁵ +AIA 10 ⁻⁵	Folha	16,7	100	0
	Hipocótilo	100	100	0
	Raiz	0	100	0
ZEA 10 ⁻⁵ +AIA 10 ⁻⁶	Folha	0	100	0
	Hipocótilo	100	100	0
	Raiz	0	100	0
ZAE 10 ⁻⁵ +AIA 10 ⁻⁷	Folha	20	100	0
	Hipocótilo	100	100	0
	Raiz	100	100	0

CONCLUSÕES

Podemos concluir, com o experimento realizado, que *Solanum paludosum* germina *in vitro* em meio MS sem reguladores de crescimento e em condições de iluminação de 16 horas de luz.

O meio ideal para a regeneração *in vitro* de *Solanum paludosum* é o MS adicionado de AIA 10^{-6} e BAP 10^{-5} M. Nestas condições, regenera-se até 40% dos fragmentos de folhas e 100% dos fragmentos de hipocótilo utilizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRATTACHARYYA, J. Isolation of solanodine from fruits of *Solanum asperum* and *Solanum paludosum*. J. Nat. Prod., 47: 1059, 1984.

BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; OLIVEIRA, R.A.G.; PAULO, M.Q.; TROLIN, G.; CUNHA, E.U.L.; & BRATTACHARYYA, J. Chemical and pharmacological investigation of *Solanum* species of Brasil. Men. Inst. Oswaldo Cruz, 86:89-91, 1991,

CHANDLER S.F.; DODDS, J.M. Adventitious shoot initiation in serially subcultures callus cultures of *Solanum laciniatum*. Z. Pflanzenphysiol, Bd 111, s115-121, 1993.

POI CORREA, M. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil. IBDF, Rio de Janeiro, IV: 559, 1969.

DAVIES, M. E. ;DALE, M.M. Fatores affecting *in vitro* shoot regeneration on leaf discs of *Solanum laciniatum* AIT. Z. Pflanzenphysiol BD 92 S 51-60, 1979.

DA COSTA, R.G.; SANTIAGO-BELTRÃO, A.E.; AGRA, M.F.; MARINHO, P. "Indução de calos e resultados preliminares de regeneração *in vitro* de *Solanum paraibanum*". Trabalho apresentado no Congresso Nacional de Botânica, Crato-CE, 1997.

EL BADAOU, H.; MARINHO, P. Production of solamargine by *in vitro* culture of *Solanum paludosum*. Plant Cell, and Organ Culture, 45:123*127, 1996.

GALLOIS, P.; MARINHO, P. Leaf disc transformation using *Agrobacterium tumefaciens* expression of heterologous genes in tobacco methods in *Molecular Biology*, vol XX: Plant Molecular Biology Protocols, chapter 3. ed. H. Jones, Humana Press Inc., Totowa, NJ. 1995.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropopagação. In: Técnicas e Avaliações da Cultura de Tecidos de Plantas. ABCTP/ EMBRAPACNPH, Parte II p. 99-117, 1990.

HOLANDA, K. A.; VIANA, F.; ALENCAR, G. S.; AGRA, M.F.; MARINHO, P. "Indução de calos em *Solanum baturitense*". Trabalho apresentado no Congresso Nacional de Botânica, Crato-CE, 1997.

JAN, V.V.S.; LAMBLIN, G.; BIRHMAN, R.K.; CAPPADOCIA, M. Genetic analysis of leaf regenerability in *Solanum chacoense*. Plant Cell, and Organ Culture, 74:9-13, 1996.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiol, 15: 473-497, 1962.

VALVERDE, M; LAVAND, C.; BOUSTIE, J.; EL BDAOUI, H.; MUGUET, B. ; HENRY, M. Solamargine: The main glycoalkaloid from the fruits of *Solanum paludosum*. Plant Med., 59:391-484, 1993,

ROTINO, G.L.; GLEDDIES, S. Transformation of eggplant (*Solanum melongena* L) using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. Plant Cell Reports, 9:26-29, 1990.