



## INFLUÊNCIA DA CEFOTAXIME NA REGENERAÇÃO DE ENTRENÓS DE BATATA (*Solanum tuberosum* L. cv. Macaca)

BARBOSA, Leticia Mascarenhas Pereira<sup>1</sup>; RODRIGUES, Isabel Corrêa da Silva<sup>2</sup>; COUTINHO, Guilherme Spezia<sup>1</sup>; PETERS, José Antonio<sup>2</sup>; BRAGA, Eugenia Jacira Bolacel<sup>2</sup>; NORA, Leonardo<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial – FAEM/UFPel

<sup>2</sup>Departamento de Botânica - Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas-IB/UFPel  
Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900. leticiampb@yahoo.com.br

### 1. INTRODUÇÃO

A transformação genética de plantas mediada por *Agrobacterium* é uma técnica bem estabelecida para introdução do DNA nos tecidos vegetais. O processo envolve a infecção de explantes por co-cultivo em *Agrobacterium* desarmada carregando o gene de interesse. Entretanto, após a transferência da informação genética, é necessária a eliminação da bactéria, pois sua presença pode interferir no crescimento e desenvolvimento das plantas transformadas, podendo causar a morte das culturas (Cooke et al., 1992; Mayolo et al., 2003). Para isso, os tecidos de planta usualmente são transferidos para meios de cultivo contendo antibióticos, tanto para seleção de transformantes quanto para eliminação de *Agrobacterium* das culturas, quando sua presença não é mais requerida.

De acordo com Wiebke (2006), o sucesso na utilização do antibiótico depende de vários fatores, incluindo a cepa de *Agrobacterium* utilizada, a densidade da suspensão bacteriana, o tempo de co-cultivo, tipo e concentração do agente bactericida e duração do tratamento.

Na escolha do antibiótico empregado para a eliminação de *Agrobacterium* nos protocolos de transformação genética, deve-se levar em consideração que o mesmo não promova a inibição do crescimento e a organogênese de brotos ou raízes, não tenha custo elevado, seja estável quando em cultura e, principalmente, promova a eficiente eliminação da agrobactéria. Entre os antibióticos mais utilizados em trabalhos de transformação, está a cefotaxime, que é utilizada com sucesso na transformação genética mediada por *Agrobacterium* de diversas espécies vegetais, sendo reportado como o mais efetivo na eliminação da cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* em *Nicotiana tabacum* (Shackelford e Chlan, 1996) e *Fragaria vesca* (Alsheikh et al., 2002).

A concentração de antibiótico requerida para eliminação da *Agrobacterium* é geralmente elevada, podendo interferir no desenvolvimento, pela promoção ou inibição do crescimento, na regeneração do explante. Em *Triticum aestivum*, a presença de cefotaxime estimula o crescimento inicial de calo e estes são mais organogênicos (Raymond e Lesley, 1986). Pius et al. (1993) observaram estímulo no

crescimento de calo e regeneração de plantas de *Pennisetum americanum*, em presença de cefotaxime. d'Utra Vaz et al. (1993) constataram que a presença de cefotaxime foi indispensável para sustentar a divisão celular em protoplastos de maracujazeiro. Por outro lado, em embriões somáticos de soja, este antibiótico causa morte de considerável extensão de tecido (Wiebke, 2006).

Neste contexto, o presente estudo tem por objetivo avaliar a influência do uso de cefotaxime na regeneração de entrenós de batata (*Solanum tuberosum* L. cv. Macaca) a serem utilizados em futuros experimentos de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

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

Plantas de batata (*Solanum tuberosum* L. cv. Macaca), procedentes do Laboratório de Cultura de Tecidos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Clima Temperado - Pelotas/RS, foram utilizadas como fonte de explantes. As plantas foram mantidas *in vitro* em sala de crescimento a  $26 \pm 2$  °C, sob fotoperíodo de 16 h e irradiância  $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (2 lâmpadas fluorescentes, Luz do Dia Especial, 20W, Osram, Brasil), mediante subcultivos mensais em meio com sais e vitaminas de Murashige e Skoog (1962), MS, acrescido de  $25 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de mio-inositol e  $6,5 \text{ g L}^{-1}$  de ágar.

Entrenós com 20 dias de subcultivo foram individualizados e cultivados em placas de Petri contendo 20mL de meio MS, acrescido de sacarose ( $25 \text{ g L}^{-1}$ ), mio-inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), gelrite ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ), dos reguladores de crescimento zeatina ribosídeo ( $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), ácido giberélico ( $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) e ácido indol acético ( $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ ) e do antibiótico cefotaxime (0, 100, 150 e  $200 \text{ mg L}^{-1}$ ). Os meios tiveram o pH ajustado para 5,8, antes da adição de ágar ( $7 \text{ g L}^{-1}$ ), e foram autoclavados a  $121^\circ\text{C}$  por 20min.

A unidade experimental consistiu em uma placa de Petri com 8 explantes. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 4 tratamentos e 4 repetições por tratamento. Os dados foram submetidos ao teste F para análise de variância e ao teste de Tukey para comparação de médias entre os tratamentos a 5% de probabilidade, calculados pelo Sistema para Análise Estatística – SAEG 9.1.

A cada 20 dias, os explantes eram transferidos a um novo meio e, ao final do experimento (50 dias), foram feitas avaliações quanto à percentagem de explantes com brotações.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito da cefotaxime na frequência de regeneração da batata (*Solanum tuberosum* L. cv. Macaca) são apresentados na Fig. 1.

O comportamento dos explantes de batata 'Macaca', frente a diferentes concentrações de cefotaxime no meio de cultivo, pode ser observado na Tabela 1.

Houve redução significativa na sobrevivência dos explantes apenas quando se utiliza doses de  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de cefotaxime. Em concentrações menores, o uso deste antibiótico não tem efeito significativo na sobrevivência. A utilização de cefotaxime no meio favoreceu para a diminuição da percentagem de oxidação e não influenciou na perda de clorofila dos explantes. Na concentração de  $200 \text{ mg L}^{-1}$ ,

observa-se um pequeno aumento da taxa de oxidação dos explantes, coincidindo com o menor número de explantes regenerados.

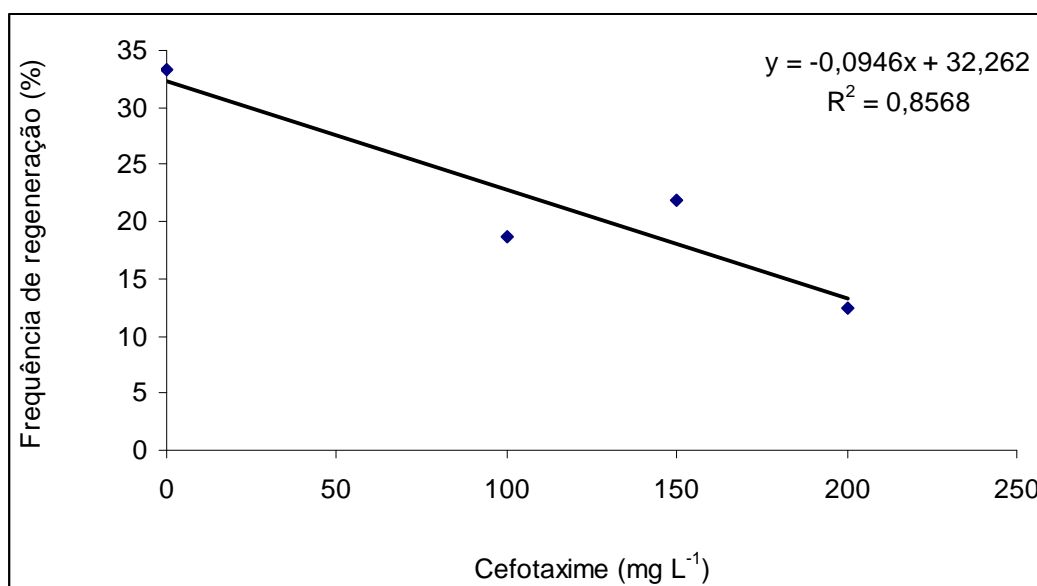


Figura 1. Efeito do antibiótico cefotaxime na frequência de regeneração de entrenós de batata (*Solanum tuberosum* L. cv. Macaca), após 40 dias de cultivo.

Tabela 1 Respostas de entrenós de batata (*Solanum tuberosum* L. cv. Macaca) cultivados *in vitro* sob diferentes concentrações de cefotaxime

Cefotaxime (mg L <sup>-1</sup> )	Explantes regenerados (%)	Explantes amarelados (%)	Explantes oxidados (%)
0	33,3 a	0	7,3 a
100	18,8 a	0	1,8 b
150	21,9 a	0	1,0 b
200	12,5 b	0	3,8 a b

#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados permitem concluir que o antibiótico cefotaxime pode ser utilizado até a concentração de 150mg L<sup>-1</sup> no meio de regeneração, para entrenós de batata (*Solanum tuberosum* L. cv. Macaca), sem influenciar na sobrevivência dos explantes;

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alsheikh, M.K., Suso, H.P., Robson, M., Battey, N.H. & Wetten, A. Appropriate choice of antibiotic and *Agrobacterium* strain improves transformation of antibiotic-sensitive *Fragaria vesca* and *F. v. semperflorens*. **Plant Cell Reports** v.20, p.1173-1180. 2002.

Cooke, D. L.; Waites, W. M.; Leifert, C. Effects of *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas campestris* on plant tissue cultures of *Aster*, *Cheiranthus*, *Delphinium*, *Iris* and *Rosa*; disease development *in vivo* as a result of latent infection *in vitro*. **Journal of Plant Diseases and Protection**. v.99, p.469-481. 1992.

d'Utra Vaz, F. B.; Santos, A. V. P. ; Manders, G. **et al.** Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of the tropical woody plant, passion fruit (*Passiflora edulis* fv. flavicarpa Degener): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. **Plant Cell Reports**. v.12, p.220-225, 1993.

Manolo, G. A.; Maximota, S. N.; Piskak, S.; Guiltinan, M. J. Moxalactam as a counter-selection antibiotic for *Agrobacterium*-mediated transformation and its positive effects on *Theobroma cacao* somatic embryogenesis. **Plant science**. v. 164, p. 607-615. 2003.

Murashige, T. & Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**. v.15, 473-497. 1962.

Pius, J.; George, L.; Eapen, S.; Rao, P.S. Enhanced plant regeneration in pearl millet (*Pennisetum americanum*) by ethylene inhibitors and cefotaxime. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.32, p.91-96. 1993.

Raymond, J. M.; Lesley, A. B. Cefotaxime stimulates callus growth, embryogenesis and regeneration in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum* L. Em. Thell). **Plant science**. v. 46, p.217-223. 1986. 1986

Shackelford, N. J.; Chlan, C. A. Identification of antibiotics that are effective in eliminating *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant molecular biology reporter**. v.14, p.50-57. 1996)

Wiebke B. **Transformação genética de embriões somaáticos de soja [*Gycine max* (L.) Merr.] utilizando o bombardeamento e sistema *Agrobacterium* de maneira integrada**. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2005.