



EFEITO DA CANAMICINA NA REGENERAÇÃO DE ENTRENÓS DE BATATA (*Solanum tuberosum* L. cv. MACACA)

**BARBOSA, Leticia Mascarenhas Pereira¹; RODRIGUES, Isabel Corrêa da Silva²;
SCHEMELING, Daiane Martins¹; DANIELOWSKI, Rodrigo²; PETERS, José
Antonio²; BRAGA, Eugenia Jacira Bolacel²; NORA, Leonardo¹.**

¹Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial – FAEM/UFPel

²Departamento 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 tecnologia do DNA recombinante, associada a técnicas de cultura de tecidos, tem sido usada com sucesso para introdução de genes exógenos no genoma de várias espécies (Vayda & Belknap, 1992; Torres et al., 2000; Romano *et al.*, 2001). Isto possibilita diversos estudos pelo controle da expressão gênica e o desenvolvimento de cultivares melhoradas em prazos mais curtos.

A transformação 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. Antibióticos são amplamente para seleção de tecidos transgênicos e/ou para eliminar o *Agrobacterium* de tecidos vegetais, quando sua presença não é mais requerida. Canamicina é um dos mais amplamente utilizados agentes de seleção para transformação de plantas. O gene que corresponde à resistência (*nptII*) codifica para um aminoglicosídeo 3-fosfotransferase, que inativa canamicina por fosforilação (Bowen, 1993). Entretanto, a severidade de seleção de brotos transgênicos com este antibiótico é altamente dependente da espécie, estando a regeneração de escapes (brotos falso-positivos), entre os maiores problemas (Estopà, 2001; Wiebke, 2006).

Diante do exposto, o presente estudo tem por objetivo avaliar a influência do uso de canamicina na regeneração de entrenós de batata (*Solanum tuberosum* L. cv. Macaca).

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.

Foram utilizadas 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 e mantidas *in*

in vitro, em sala de crescimento a $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 h e irradiância de $36\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (2 lâmpadas fluorescentes, Luz do Dia Especial, 20W, Osram, Brasil), mediante subcultivos mensais em meio com sais e vitaminas de MS acrescido de 25g L^{-1} de sacarose, 100mg L^{-1} de mio-inositol e $6,5\text{g L}^{-1}$ de ágar.

Entrenós com 20 dias de subcultivo foram individualizados e transferidos para placas de Petri contendo 20mL de meio MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de 25g L^{-1} de sacarose, 100mg L^{-1} de mio-inositol, $2,0\text{g L}^{-1}$ de gelrite e dos reguladores de crescimento zeatina ribosídeo ($3,0\text{mg L}^{-1}$), ácido giberélico ($3,0\text{mg L}^{-1}$) e ácido indol acético ($0,05\text{mg L}^{-1}$). Para os testes de sobrevivência dos explantes ao antibiótico, foram adicionados ao meio de regeneração, diferentes concentrações de canamicina (0, 50, 100 e 200mg L^{-1}).

A unidade experimental consistiu em uma placa de Petri com 8 explantes cada. 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 ou amarelados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando o efeito de canamicina na freqüência de regeneração, verificou-se que o modelo de regressão linear apresentou melhor ajuste aos dados obtidos, até 100mg L^{-1} de canamicina (Figura 1).

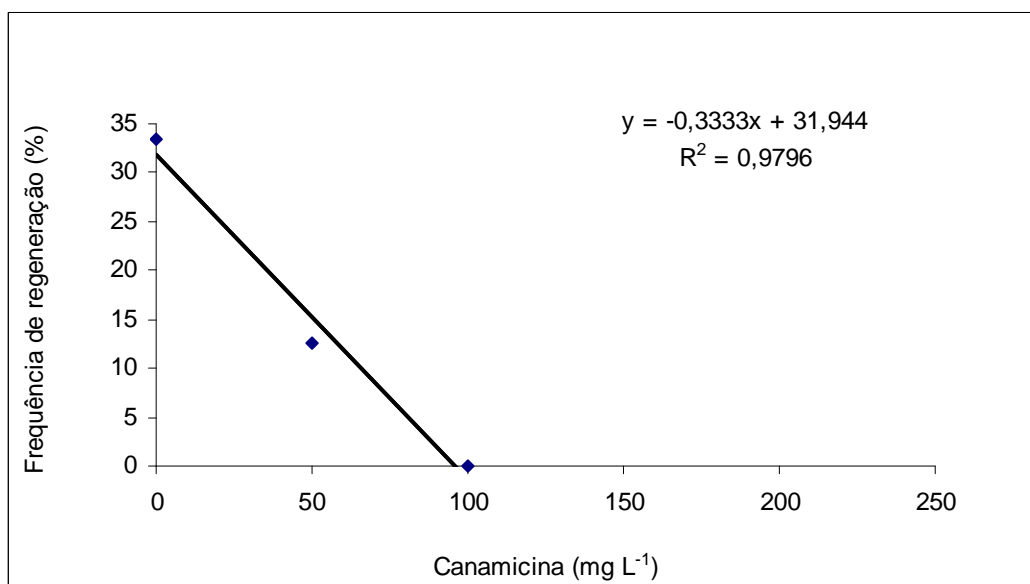


Figura 1. Efeito do antibiótico canamicina na freqüência de regeneração de entrenós de batata (*Solanum tuberosum* L. cv. Macaca), após 40 dias de cultivo.

Nas condições estabelecidas, ocorreu uma drástica redução na sobrevivência dos explantes já na menor concentração de canamicina utilizada (50mg L^{-1}), com apenas 12,5% de explantes sobreviventes, representando redução de 50% da regeneração obtida sem utilização de antibiótico. Porém, essa concentração do antibiótico foi insuficiente para eliminar completamente a

diferenciação de gemas. No entanto, concentrações de canamicina iguais ou superiores a 100mg L⁻¹ determinaram morte total dos explantes (Figura 1 e Tabela 1).

A concentração de 50mg L⁻¹ de canamicina no meio de regeneração de *S. tuberosum* foi utilizada por Torres et al. (2003), enquanto que concentração de 100mg L⁻¹ foi utilizada por McCormick et al. (1986), Fillatti et al. (1987) e Patil (1994), para a seleção de brotos de tomateiro transformados.

Tabela 1 Resposta de entrenós de batata (*Solanum tuberosum* L. cv. Macaca) cultivados *in vitro* e submetidos a diferentes concentrações de canamicina em meio de regeneração

Canamicina (mg L ⁻¹)	Explantes regenerados (%)	Explantes amarelados (%)
0	33,3 a	0,0 b
50	12,5 b	58,3 a
100	0,0 c	71,9 a
200	0,0 c	81,3 a

Também foi observado, à medida que se aumentou a concentração de canamicina, um acréscimo na percentagem de explantes amarelados, indicando uma perda crescente nos teores de clorofila dos explantes (Figura 2). Resultados semelhantes foram obtidos por Costa et al. (2000) em variedades de tomate cultivados em meio contendo doses crescentes de canamicina.

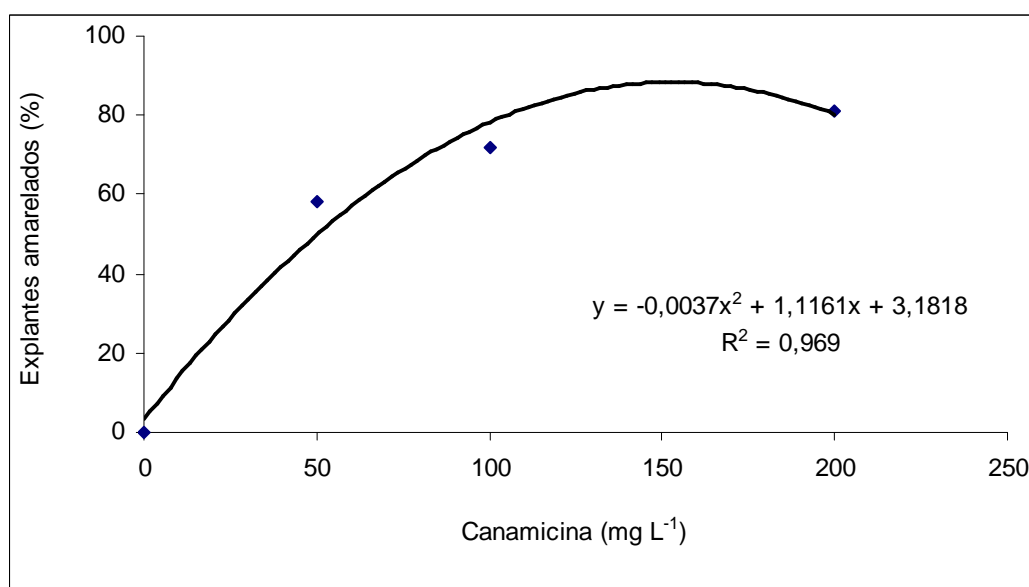


Figura 2. Efeito do antibiótico canamicina sobre a frequência de entrenós de batata (*Solanum tuberosum* L. cv. Macaca), amarelados, após 40 dias de cultivo.

4. CONCLUSÃO

Concentrações iguais ou superiores a 100mg L⁻¹ de canamicina levam a 100% de morte dos explantes, diminuindo a possibilidade de regeneração de explantes que não expressam o gene de resistência à canamicina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Banerjee, A. K.; Prat, S.; Hannapel, D. J. Efficient production of transgenic potato (*S. tuberosum* L. ssp *andigena*) plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. **Plant Science**. v.170, p.732-738. 2006.
- Bowen, B. A. Markers for plant gene transfer. In: Kung, S.; Wu, R. (Eds.). **Transgenic plants**. San Diego: Academic Press, v.1, p. 89-123. 1993.
- Cardi, T.; Iannamico, V.; D'Ambrosio, F.; Filippone, E.; Lurquin, P. F. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Solanum commersonii* Dun. **Plant science**, v.87, n.2, p.179-189, 1992.
- Costa, M. G. C.; Nogueira, F. T. S.; Otoni, W. C.; Brommonschenkel, S. H. Transformação genética de cultivares de tomateiro industrial mediada por *Agrobacterium tumefaciens* http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-31312000000200002-back1#back1. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v.12, n.2. 2000.
- Estopà, M.; Marfà, V.; Melé, E.; Messeguer, J. Study of different antibiotic combinations for use in the elimination of *Agrobacterium* with kanamycin selection in carnation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.65, p.211-220. 2001.
- Fillatti, J. J.; Kiser, J.; Rose, R.; Comai, L. Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. **Biotechnology**. v.5, p.726-730. 1987.
- McCormick, S.; Niedermeyer, J.; Fry, J.; Barnason, A.; Horsch, R.; Fraley, R. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Reports**. v.5, p.81-84. 1986.
- Murashige, T. & Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**. v.15, 473-497. 1962.
- Patil, R. S. **Genetic manipulation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) for crop improvement**. Ph.D. Dissertation, University of Nottingham, Nottingham, 1994. 253 p
- Romano, E.; Ferreira, A. T.; Dusi, A. N.; Prite, K.; Ávila, A. C.; Nishijima, M.; Nascimento, A. S.; Bravo-Almonacid F., Mentaberry, A.; Monte, D.; Campos, M. A.; Melo, P. E.; Cattony, M. K.; Torres, A. C. Extreme resistance to two Brazilian strains of Potato virus Y (PVY) in transgenic potato, cv. Achat, expressing the PVY coat protein. **Horticultura Brasileira**. v.19, p.118-122. 2001.
- Torres, A. C.; Ferreira, A. T.; Romano, E.; Cattony, M. K. Nascimento, A. S. Transformação genética da batata cultivar Achat via *Agrobacterium tumefaciens*. **Horticultura Brasileira**. v.18, n.1, p.41-45. 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**, v.21, n.2, p.176-179, 2003.
- Vayda, M. E.; Belknap, W. R. The emergence of transgenic potatoes as commercial products and tools for basic science. **Transgenic Research**. v.1, p.149-163. 1992.

Wiebke B. **Transformação genética de embriões somáticos de soja [*Glycine 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, Porto Alegre. 2005. 81p.