



ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PRESENTES EM EXPLANTES CULTIVADOS *IN VITRO* DO CLONE FDR5865 DE SERINGUEIRA

RAFAELA NOGUEIRA MALVEIRA DA SILVA; JANAÍNA MEDEIROS VASCONCELOS; RENATA BELTRÃO TEIXEIRA; ANDREA RAPOSO;
EMBRAPA ACRE, RIO BRANCO, AC, BRASIL;
rafaelamalveira@hotmail.com

Resumo: A seringueira é a fonte natural da borracha e sua cultura é explorada mundialmente. É uma planta alógama, suas sementes são recalcitrantes e a propagação vegetativa é o método mais recomendado. Com o preço elevado do petróleo, a borracha sintética, apesar de ser mais barata que a natural, fica menos competitiva, além disso, tem-se a pressão pelo uso de produtos naturais. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar isolados bacterianos oriundos de explantes de seringueira cultivados *in vitro* e testar a sua sensibilidade à antibióticos. Após desinfestação segmentos nodais do clone FDR5865 foram inoculados em meio de cultura WPM e mantidos em sala de crescimento. Após 30 dias, o material que apresentou contaminação bacteriana visível foi selecionado e os contaminantes foram purificados utilizando o método de esgotamento por estrias. Posteriormente, os isolados foram testados quanto a sua sensibilidade à antibióticos e caracterizados morfológicamente. Foram encontrados dois tipos de bactérias, que foram nomeadas de isolados 1 e 2, estas foram caracterizadas como Gram negativas e apresentaram forma de cocos. O isolado 1 foi a mais resistente, apresentando resistência a 19 dos 20 antibióticos testados. Este trabalho tem caráter pioneiro, visto que a utilização de explantes de plantas oriundas do campo é pouco relatada na literatura e apresenta um grau de dificuldade muito maior do que a utilização de material provindo de casa de vegetação.

Palavras-chave: antibiograma, coloração de Gram, cultivo *in vitro*, *Hevea sp*

Introdução

A seringueira é uma espécie de grande importância econômica. Planta alógama com alto grau de segregação, suas sementes são recalcitrantes, mesmo em condições adequadas de armazenamento. Tendo-se deste modo dificuldades na obtenção de mudas em grande quantidade. Portanto, a propagação vegetativa é o método mais recomendado, além de manter a integridade genotípica dos clones estabelecidos (MARTINS et al., 2000). Diante do exposto, o desenvolvimento de técnicas que permitam a propagação em massa de indivíduos selecionados desta espécie torna-se indispensável para a viabilidade desta cultura.

Por ser uma planta de clima tropical, a principal limitação para seu cultivo *in vitro* esta na presença de contaminação por bactérias e fungos sistêmicos. Vários estudos têm sido realizados



focalizando a efetiva desinfestação de explantes desta planta (ENJARILIC et al., 1987; ASOKAN et al., 1988). O objetivo deste trabalho foi caracterizar isolados bacterianos oriundos de explantes de seringueira cultivados *in vitro* e testar a sua sensibilidade à antibióticos.

Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular do Centro de Pesquisa Agroflorestal do Acre (CPAFAC). Foram utilizados como explantes segmentos nodais de plantas localizadas no jardim clonal (Clone FDR5865). Após desinfestação os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura WPM (Wood Plant Médium), suplementado com sacarose (30 g.L^{-1}), carvão ativado (0,3%) e solidificado com Ágar (6 g.L^{-1}). As culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, dispondo de lâmpadas fluorescentes Philips TDL ($30 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$), expostas ao fotoperíodo de 16 horas de luz.

Após 30 dias o material propagativo que apresentava somente contaminação bacteriana visível foi selecionado. Os contaminantes foram purificados em Ágar Nutriente (AN), inicialmente ocorreu o crescimento das colônias, e em seguida, estas foram então transferidas para novos meios AN até a purificação, utilizando o método de esgotamento por estrias. Para a caracterização dos isolados obtidos foi realizado o teste de coloração de Gram e avaliação morfológica. Os parâmetros de avaliação morfológica foram: cor, textura, borda, forma, tamanho, cheiro e crescimento de colônias a olho nu. Posteriormente, os isolados selecionados foram testados quanto a sua sensibilidade à antibióticos (Tabela 1) por meio da prova de sensibilidade por difusão, usando discos de papel impregnados com antibióticos, experimento feito em duplicata. A sensibilidade do isolado bacteriano ao antibiótico teste foi avaliado após 48 horas de incubação, onde foi determinado o halo de inibição formado, considerando suscetíveis ao antibiótico os isolados que apresentaram formação de halo de inibição mínimo de 8 mm, conforme metodologia descrita por Wilson e Power (1989).

Resultados e Discussão

A micropropagação de espécies lenhosas tem sido um dos grandes desafios para a área da Biotecnologia, principalmente na fase inicial do estabelecimento do cultivo *in vitro*. Tem-se dificuldades na obtenção de tecidos livres de contaminações provocadas por fungos, bactérias e também a oxidação provocada pelos compostos fenólicos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Foram observados nos isolados dos explantes, dois tipos de bactérias que foram denominadas isolados



1 e 2. Os quais foram morfológicamente caracterizados. O isolado 1 apresentou bordas lisas, com textura leitosa, coloração amarela, cheiro forte e crescimento de colônias homogêneas a olho nu, já o isolado 2 apresentou bordas enrugadas, com textura pastosa, cor esbranquiçada, sem cheiro e crescimento de colônias dispersas a olho nu. Com relação à coloração de Gram, ambos os isolados apresentaram parede celular delgada, com a segunda membrana lipídica diferente da membrana plasmática, ambos isolados foram caracterizados com Gram negativos e apresentaram morfologia de cocos.

No Tabela 1 tem-se o resultado do teste de sensibilidade à antibióticos, verifica-se que o isolado 2 apresentou maior sensibilidade aos antibióticos do que o isolado 1, que foi sensível somente a Gentamicina. De acordo com Scherwinski-Pereira et al. (2003), 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, por isso a importância deste teste que permitirá a seleção dos antibióticos para a determinação da concentração mínima inibitória (CBMI) para realização do teste de fitotoxicidade, que irá verificar qual a concentração ideal do antibiótico que deverá ser adicionado ao meio de cultura para promover a inibição de crescimento bacteriano dos dois isolados e não ser tóxico para os explantes, facilitando assim o estabelecimento *in vitro* desta espécie.

Tabela 1 – Resultado do teste de sensibilidade aos antibióticos. São consideradas sensíveis as bactérias os que apresentarem halo de inibição igual ou maior que 8 milímetros (mm). * Medida em milímetros (mm).

Antibióticos	Concent. µg/mL	Isolado 1 Crescimento bacteriano*	Isolado 2 Crescimento bacteriano*
Cefalotina (CFL)	30	0	13
Gentamicina (GEN)	10	8	3,5
Rifampicina (RIF)	5	0	6
Vancomicina (VAN)	30	0	10
Penicilina (PEN)	10	0	0
Cloranfenicol (CLO)	30	0	12,5
Ampicilina (AMP)	10	0	15
Cefotaxina (CTX)	30	0	0
Estreptomicina (EST)	10	3	17,5
Novobiocina (NOV)	5	0	10
Ác.nalidixico (NAL)	30	0	4,5
Amoxicilina (AMO)	10	0	11,5
Eritromicina (ERI)	15	0	15
Sulfonamida (SUL)	300	0	8
Cefalexina (CFE)	30	0	12
Cefoxitina (CFO)	30	0	0



Oxacilina (OXA)	1	0	4,5
Amicacina (AMI)	30	0	9,5
Tetraciclina (TET)	30	4	9
Cefaclor (CFC)	30	0	0

Conclusão

Foram isoladas dois tipos de bactérias presentes em explantes de seringueira após seu estabelecimento *in vitro*, estes foram caracterizados como Gram negativos, com aspectos de cocos, sendo que um deles mostrou grande resistência aos antibióticos testados.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Fundo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Processo TO 010/2010) e à Embrapa Acre pelo apoio financeiro. Ao CNPq e CAPES pelas bolsas de PIBIC e mestrado.

Referências Bibliográficas

- ASOKAN, M. P., SOBHANA, P., SUSHAMAKUMARI, S. AND SETHURAJ, M. R. Tissue culture propagation of rubber (*Hevea brasiliensis* Willd ex Adrg. De Juss. Muell. Arg) Clone GT1. **Indian Journal of Natural Rubber Research**, v.1, p.10-12, 1988;
- ENJALRIC, F. AND CARRON, M. P. Microbouturage *in vitro* de jeunes plants d' *Hevea brasiliensis*. **CR Academic Science Paris**, v.295, p.259-264, 1982;
- GRATTAPAGLIA, D. ; MACHADO, M. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. [e.d.]. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998, p.183-260. v.1;
- MARTINS, A.L.M.; NILZA, P.R.; GONÇALVES, P.S.; VAL, K.S. Influência de porta-enxertos no crescimento de clones de seringueira no estado de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.9, p.1743-1759, 2000;
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. de L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 827-834, 2003;
- WILSON, Z.; POWER, J. B. Elimination of systemic contamination in explants and protoplast cultures of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). **Plant Cell Reports**, New York, v. 7, p. 622-625, 1989.