

Efeitos dos Antibióticos Rifampicina e Cefotaxima no Desenvolvimento de Calos de Maracurá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*)

Daniela B. Lopes^[1], Diego de M. Bento^[2]; Paulo V. Barroso^[3]; Cristiane E. C. Macedo^[4]
e Magdy A.I. Alloufa²

Introdução

A seleção *in vitro* de clones de maracujá resistentes à fusariose tem sido considerada uma estratégia promissora no melhoramento da espécie, já que a variabilidade genética disponível para os programas de melhoramento ainda é limitada, assim como informações sobre caracterização e avaliação de germoplasma (Cunha, 1998; Ferreira, 1998). Esta estratégia depende da ocorrência de variação somaclonal durante a passagem *in vitro* do material vegetal.

Neste caso, altas taxas de contaminação bacteriana observadas em experimentos preliminares tornaram necessário o uso de antibióticos na indução de calos de maracujá a partir de explantes colhidos de plantas cultivadas em casa de vegetação. Desconfia-se da presença de bactérias endógenas nas plantas, pois em muitos casos a contaminação bacteriana só foi detectada nos calos após meses de cultivo *in vitro*.

Este trabalho teve como objetivo verificar o efeito de antibióticos adicionados ao meio de cultura ou em banho de imersão dos explantes no controle da contaminação e no desenvolvimento dos calos de maracujá-amarelo.

Material e Métodos

Um experimento fatorial (2 x 3) foi conduzido tendo como fatores o tipo de banho de imersão aplicado aos explantes (a presença ou não do antibiótico rifampicina no banho) e a adição de antibióticos ao meio de cultura (sem antibiótico, com rifampicina ou com cefotaxima) em três blocos casualizados no tempo, com 9 repetições.

Os explantes utilizados foram caules nodais retirados de plantas de maracujá com 1 a 2 meses de idade, obtidas de sementes plantadas em solo autoclavado. Metade dos explantes foi imersa em água esterilizada por 20 h e a outra metade ficou imersa em rifampicina (500mg.L⁻¹) pelo mesmo período. Realizou-se então uma desinfestação superficial dos explantes com etanol 70% (1 min.), hipoclorito de cálcio 3% (3 min.) e 3 lavagens com água esterilizada (10 min. cada), e procedeu-se a inoculação dos mesmos em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) básico suplementado com 2,5mg.L⁻¹ de cinetina e 2mg.L⁻¹ de 2,4-D) sem antibiótico, com 50mg.L⁻¹ de rifampicina ou 50 mg.L⁻¹ de cefotaxima. Os tratamentos, então, foram os seguintes: T1=banho de imersão sem antibiótico, meio sem antibiótico; T2=banho sem antibiótico, meio com rifampicina; T3=banho sem antibiótico, meio com cefotaxima; T4=banho com antibiótico, meio sem antibiótico; T5=banho com antibiótico, meio com rifampicina; T6=banho com antibiótico, meio com cefotaxima.

Os frascos, com um explante cada, foram incubados à temperatura de 25 a 28 °C, sob luz fluorescente, com 12 horas de fotoperíodo. Os mesmos foram observados diariamente no início do

experimento para se determinar a taxa de contaminação inicial e a data de aparecimento de calos em cada repetição. Aos 30 dias avaliou-se a taxa de conversão dos explantes em calo, ou seja, porcentagem de calos formados por número de explantes inoculados. Os calos formados foram subcultivados 3 ou 4 vezes, a intervalos variáveis em cada bloco. A cada subcultivo, o peso fresco de cada calo foi determinado, em condições assépticas. A sobrevivência dos calos foi determinada após 100 dias da inoculação dos explantes em cada bloco e calos que se desenvolveram pouco e apresentaram alto grau de oxidação nesta avaliação foram considerados mortos.

Resultados e Discussão

Não houve efeito do banho de imersão dos explantes em antibiótico no intervalo entre inoculação e o aparecimento de calos ($p=0,21$). No entanto, a adição de rifampicina (50mg.L^{-1}) ao meio de cultura retardou significativamente ($p=0,007$), em um ou dois dias, o aparecimento dos calos.

Na ausência de antibióticos no banho ou no meio (T1), houve altas taxas de contaminação inicial e os calos não sobreviveram aos subcultivos (Fig. 1). A imersão em rifampicina, quando não associada à adição de antibiótico no meio (T4), reduziu parcialmente a contaminação inicial. A taxa de contaminação inicial foi bastante reduzida quando o banho com a rifampicina foi aliado à adição dos antibióticos no meio (T5 e T6). A taxa de conversão dos explantes em calos foi bastante afetada quando a contaminação inicial do tratamento era alta (T1 e T4). Nos tratamentos em que a contaminação inicial foi controlada, a conversão foi alta e não foi afetada pela presença dos antibióticos no meio. Os tratamentos que continham rifampicina no meio de cultura (T2 e T5) de modo geral apresentaram baixa contaminação inicial, mas não foram capazes de aumentar a taxa de sobrevivência dos calos formados com relação à testemunha T4. Nos tratamentos que continham cefotaxima no meio de cultura (T3 e T6) foram observadas as maiores taxas de sobrevivência.

O desenvolvimento dos calos formados foi avaliado pelas curvas de ganho de peso dos mesmos. A imersão dos explantes em rifampicina não aumentou significativamente o peso dos calos ($p=0,36$) avaliado entre 60 e 70 dias após a inoculação, nos três blocos; a adição de antibióticos ao meio de cultura proporcionou maior ganho de peso dos calos medido entre 60 e 70 dias ($p=0,03$). Os tratamentos que continham cefotaxima no meio (T3 e T6) induziram um maior ganho de peso da matéria fresca dos calos nesta avaliação ($p=0,029$, teste de Tukey) que os tratamentos com rifampicina ou sem antibiótico, e proporcionaram, de modo geral, um maior peso final dos calos (Fig. 2).



Fig. 1. Porcentagens de contaminação inicial, conversão de explantes em calos e de sobrevivência após 100 dias (média dos três blocos). T1=banho de imersão sem antibiótico, meio sem antibiótico; T2=banho sem antibiótico, meio com rifampicina; T3=banho sem antibiótico, meio com cefotaxima; T4=banho com antibiótico, meio sem antibiótico; T5=banho com antibiótico, meio com rifampicina; T6=banho com antibiótico, meio com cefotaxima.

O efeito de cefotaxima como estimulante de crescimento de calos já foi descrito para outras espécies de plantas, como trigo (Mathias & Boyd, 1986), sorgo (Rao et al. 1995) e cevada (Mathias & Mukasa, 1987). Em maracujá, d'Utra Vaz et al. (1993) e Otoni et al. (1995) relataram que o cefotaxima, na dosagem de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, aumentou a eficiência de plaqueamento de protoplastos derivados de mesófilo de *Passiflora edulis* f *flavicarpa* e *P. incarnata*, respectivamente. O antibiótico, segundo estes autores, foi essencial para uma maior frequência de divisões celulares iniciais.

O cefotaxima é um antibiótico de amplo espectro, que inibe tanto bactérias gram-positivas quanto gram-negativas; no entanto, o mecanismo pelo qual este antibiótico atua em células vegetais ainda não está esclarecido. Apesar da configuração química do antibiótico não ter semelhança com nenhum fitorregulador, Mathias & Boyd (1987) sugeriram que a metabolização do cefotaxima pelas esterases vegetais possa gerar compostos com atividades semelhantes às de reguladores de crescimento. Outra hipótese para explicar o efeito do antibiótico como promotor de regeneração é pela sua ação, já conhecida, na inibição da produção de etileno (Rao et al. 1995). No presente trabalho, não foi possível separar um provável efeito estimulante deste antibiótico de sua ação na eliminação ou inibição de contaminações bacterianas endógenas, já que a presença bacteriana no material vegetal disponível era comprovadamente elevada.

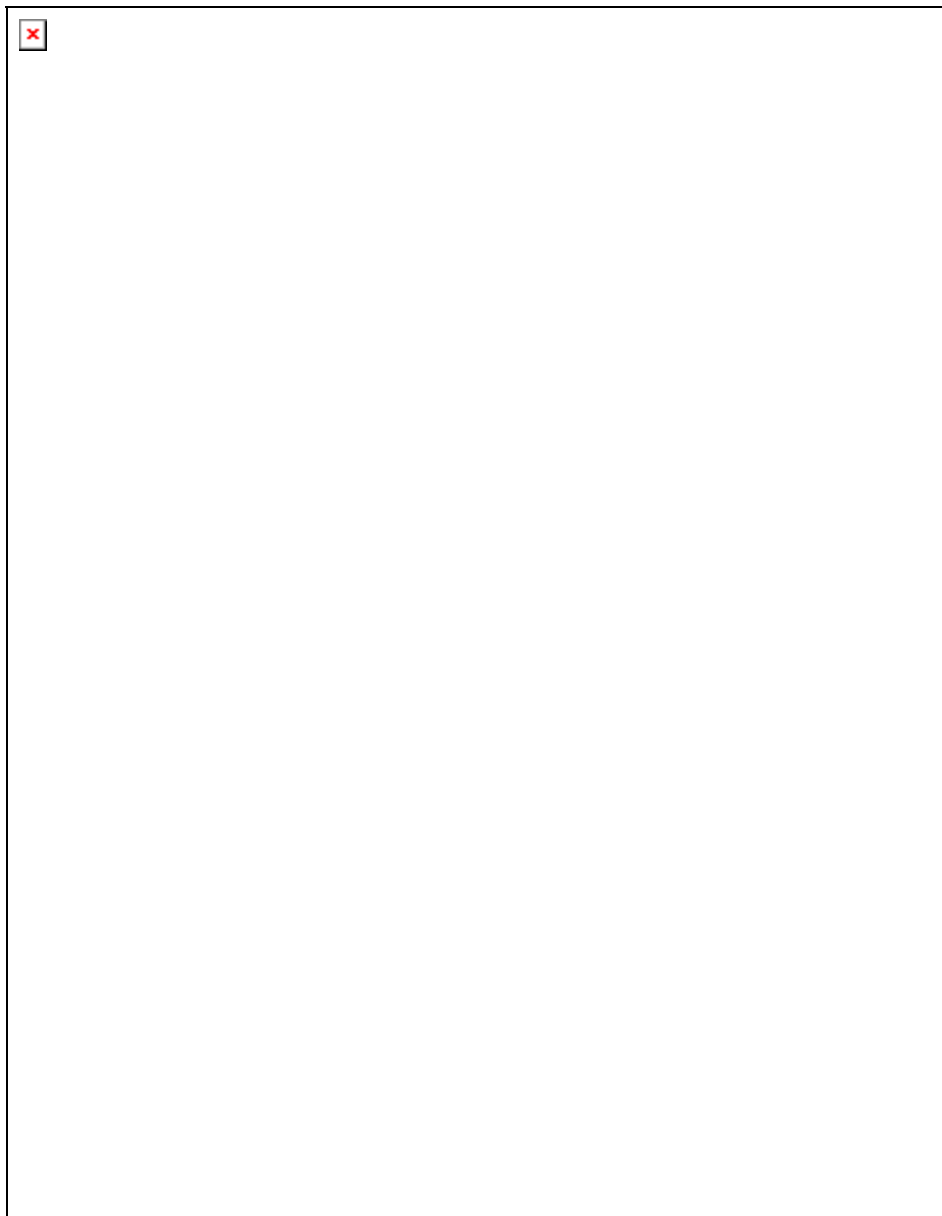


Fig. 2. Peso médio da matéria fresca dos calos nos três blocos, a cada subcultivo. T1=banho de imersão sem antibiótico, meio sem antibiótico; T2=banho sem antibiótico, meio com rifampicina; T3=banho sem antibiótico, meio com cefotaxima; T4=banho com antibiótico, meio sem antibiótico; T5=banho com antibiótico, meio com rifampicina; T6=banho com antibiótico, meio com cefotaxima.

Conclusões

Sem a adição de antibióticos em banho de imersão de explantes ou no meio de cultura, não foi possível obter calos de maracujá-amarelo que sobrevivesse a vários subcultivos. O banho de imersão de explantes com o antibiótico rifampicina reduziu parcialmente os níveis de contaminação inicial. Quando aliado à presença de rifampicina ou cefotaxima no meio, o banho dos explantes foi mais eficiente no controle da contaminação e no aumento das taxas de sobrevivência de calos. A presença

de antibióticos no meio proporcionou altas taxas de conversão de explantes em calos; no entanto, a dosagem de rifampicina utilizada retardou em alguns dias o aparecimento dos calos e não foi capaz de aumentar a taxa de sobrevivência dos mesmos, em relação à testemunha.

O melhor tratamento foi o uso de cefotaxima no meio aliado à prévia imersão dos explantes em rifampicina, pois além de controlar eficientemente a contaminação, promoveu maior ganho de peso dos calos e favoreceu a sobrevivência dos mesmos

Referências Bibliográficas

CUNHA, M.A.P. Banco ativo de germoplasma de maracujá. In: CUNHA, M.A.P. (Org.) **Reunião técnica: pesquisa em maracujazeiro no Brasil**. Cruz das Almas: Embrapa-CNPMPF, 1998. p. 15-23. (Embrapa-CNPMPF.Documentos,77)

D'UTRA VAZ, F.B.; SANTOS, A.V.P.; MANDERS, G.; COCKING, E.C.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of the tropical woody plant, passionfruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.): the importance of the antibiotic cefotaxima in the culture medium. **Plant Cell Reports**, v.12, p. 220-225, 1993.

FERREIRA, F.R. Germoplasma de maracujá. In: CUNHA, M.A.P. (Org.) **Reunião técnica: pesquisa em maracujazeiro no Brasil**. Cruz das Almas: Embrapa-CNPMPF, 1998. p. 48-53. (Embrapa – CNPMPF. Documentos,77)

MATHIAS, R.J.; BOYD, L.A. Cefotaxima stimulates callus growth, embryogenesis and regeneration in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum* L. Em. Thell). **Plant Science**, v.46, p. 217-223, 1986.

MATHIAS, R.J.; MUKASA, C. The effect of cefotaxima on the growth and regeneration of callus from four varieties of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Cell Reports**, v. 6, p. 454-457, 1987.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v.15, p.473-479, 1962.

OTONI, W.C.; CASALI, V.W.D.; CECON, P.R.; MARIA, J.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Influência do antibiótico cefotaxima na cultura de protoplastos derivados de mesófilo de *Passiflora incarnata* L. **Revista Ceres**, v. 42, p.507-515, 1995.

RAO, A.M.; PADMA SREE, K.; KISHOR, P.B.K. Enhanced plant regeneration in grain and sweet sorghum by asparagine, proline and cefotaxima. **Plant Cell Reports**, v. 15, p.72-75, 1995.

[1] Embrapa Semi-Árido, C.P. 23, Petrolina-PE, 56300-970; daniela@cpatsa.embrapa.br

[2] UFRN, Departamento de Bot., Ecol. e Zool., Natal-RN, Campus Universitário, 59072-970; alloufa@digi.com.br

[3] Embrapa Algodão, Caixa Postal 174, 58107 720 Campina Grande-PB; pbarroso@cnpa.embrapa.br

[4] UFRN, Departamento de Biologia Celular e Genética, Natal-RN, Campus Universitário, 59072-970; cristianemacedo.costa@bol.com.br