

NOTA

FITOTOXICIDADE DE TRÊS ANTIBIÓTICOS NA CULTURA *IN VITRO* DE ABACATEIRO ⁽¹⁾

LUIZ ANTONIO BIASI ^(2,3)

RESUMO

Desenvolveram-se dois experimentos para verificar o efeito do ácido nalidixico, do cloranfenicol e da estreptomina sobre a cultura *in vitro* do abacateiro 'Ouro Verde'. No primeiro, testou-se a influência de diversas concentrações (0, 12,5, 25, 50, 100 e 200 mg/L) desses antibióticos sobre a calogênese de discos foliares e, no segundo, o efeito sobre a brotação de gemas de segmentos nodais. Enquanto a formação de calos foi reduzida à metade com o uso de 50 mg/L de cloranfenicol, sua massa foi drasticamente reduzida já na concentração de 12,5 mg/L. Restringiu-se o comprimento das brotações, adicionando os antibióticos ao meio de cultura, concluindo-se que os três foram tóxicos para o abacateiro, sendo recomendados apenas em casos de extrema necessidade, dependendo da suscetibilidade do microorganismo contaminante e da concentração necessária para seu controle.

Termos de indexação: antibióticos, abacateiro, *Persea americana*, fitotoxicidade, micropropagação.

ABSTRACT

PHYTOTOXICITY OF THREE ANTIBIOTICS TO AVOCADO TISSUE CULTURE

Two experiments were carried out in order to verify the toxicity of nalidixic acid, chloramphenicol and streptomycin to avocado 'Ouro Verde' *in vitro* culture. In the first experiment, it was tested the effect of the antibiotics to callus initiation on leaf explants, using a concentration range of 0, 12.5, 25, 50, 100 and 200 mg/L. In the second experiment, sprouting from nodal segments were tested. The

⁽¹⁾ Recebido para publicação em 14 de dezembro de 1994 e aceito em 11 de abril de 1995.

⁽²⁾ Departamento de Horticultura, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP. Caixa Postal 9, 13400-970 Piracicaba (SP).

⁽³⁾ Com bolsa de pesquisa do CNPq.

callus formation was reduced by 50% with 50 mg/L of chloramphenicol and the highest reduction in callus weight was observed with 12.5 mg/L. The length of sprouts was reduced by incorporating antibiotics into plant growth medium. Results showed that the three antibiotics were toxic to avocado, and they must be used only in real necessity cases, depending on the bacterial susceptibility and the adequate concentration to control the contaminants.

Index terms: antibiotics, avocado, *Persea americana*, phytotoxicity, micropropagation.

A contaminação bacteriana é bastante nociva para os cultivos realizados *in vitro*, principalmente quando a infecção ocorre por bactérias latentes ou endógenas, introduzidas sistemicamente com os explantes (Fisse et al., 1987; Cassels et al., 1988).

Para o controle das bactérias, diversos autores citam a inclusão de antibióticos ao meio de cultura, entre eles: Wilson & Power, 1989; Garcia & Rafael, 1990; Barros & Pasqual, 1991; Leifert et al., 1991.

Podem-se adicioná-los também ao meio de cultura por um período limitado, o necessário para a eliminação dos contaminantes (Kneifel & Leonhardt, 1992; Leifert et al., 1992) ou utilizá-los na forma de imersão antes do isolamento (Tanaka et al., 1983; Scortichini & Chiariotti, 1988).

Muitos antibióticos apresentam efeito fitotóxico para as plantas, alterando-lhes o crescimento *in vitro* (Dodds & Roberts, 1985). Entretanto, essa influência sobre a regeneração vegetal depende da concentração à qual o tecido foi exposto (Okkels & Pedersen, 1988).

Trabalhando com diversas espécies *in vitro* e quatro antibióticos, Leifert et al. (1992) definiram a seguinte ordem decrescente de fitotoxicidade: estreptomicina, polimixina, rifampicina e carbenicilina.

Os antibióticos do grupo dos aminoglicosídeos, tais como estreptomicina, neomicina, kanamicina, gentamicina, amikacina e tobromacina, são tóxicos aos vegetais, mesmo em baixas concentrações (Pollock et al., 1983; Okkels & Pedersen, 1988; Gratapaglia & Machado, 1990), o que não se verifica com outros antibióticos, como os betalactamos (ampicilina e carbenicilina), as cefalosporinas (cefotaxime, cefaloridina, cefalotina), piperacilina e

rifampicina (Pollock et al., 1983; Okkels & Pedersen, 1988; Poulsen, 1988; Leifert et al., 1992).

O objetivo deste trabalho foi verificar a fitotoxicidade de alguns antibióticos, utilizados no controle da contaminação bacteriana, na cultura *in vitro* do abacateiro 'Ouro Verde'.

Material e Métodos

Neste trabalho, desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Horticultura e Silvicultura da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, utilizaram-se dois tipos de explantes, segmentos nodais e discos foliares coletados de mudas enxertadas do abacateiro 'Ouro Verde', mantidas em casa de vegetação.

Empregaram-se o ácido nalidíxico, o cloranfenicol e a estreptomicina, selecionando os dois primeiros pela sua eficiência no controle de um contaminante específico em abacateiro (Biasi, 1993) e o último, para comparação, devido a sua toxicidade já verificada em outras culturas.

Para a assepsia, lavaram-se as folhas e as brotações em água corrente, desinfestando-as, depois, pela imersão em álcool 70% por um minuto, seguida de imersão em hipoclorito de sódio 1% por dez minutos e três lavagens em água deionizada e autoclavada (Biasi et al., 1994).

Os discos foliares com 0,5 cm² foram retirados da parte basal e nervura central das folhas, por meio de um vazador. Com os discos foliares, instalou-se um experimento com delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (3 x 6) com cinco repetições e dois frascos por parcela. Cada frasco, incubado no escuro, a 25°C, por 60

dias, recebeu três explantes. Os tratamentos resultaram da utilização dos três antibióticos: ácido nalidíxico, cloranfenicol e estreptomicina em seis concentrações: 0, 12,5, 25, 50, 100 e 200 mg/L.

Com os segmentos nodais, instalou-se outro experimento com delineamento inteiramente casualizado, com sete tratamentos, quinze repetições e dois frascos por parcela. Cada frasco, com quatro explantes, foi incubado à luz, a 25°C, por 53 dias.

Os tratamentos foram os seguintes:

- 1) Testemunha;
- 2) Ácido nalidíxico (50 mg/L);
- 3) Cloranfenicol (50 mg/L);
- 4) Estreptomicina (50 mg/L);
- 5) Ácido nalidíxico (25 mg/L) + cloranfenicol (25 mg/L);
- 6) Ácido nalidíxico (25 mg/L) + estreptomicina (25 mg/L);
- 7) Cloranfenicol (25 mg/L) + estreptomicina (25 mg/L).

Em ambos os experimentos, o meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige & Skoog, 1962) solidificado com 7 g/L de ágar e os frascos, com 200 mL de capacidade, receberam 30 mL de meio.

No experimento com os discos foliares, adicionaram-se 10 mg/L de ácido indolbutírico (AIB) e 1 mg/L de 6-benzilaminopurina (BAP) ao meio de cultura; com os segmentos nodais, somaram-se 3 mg/L de BAP, conforme Biasi (1993). Esterilizaram-se os antibióticos a frio, por meio de filtros de membrana ("millipore"), com 0,45 µm de diâmetro, adicionando-os ao meio de cultura, quando em resfriamento.

Para se proceder à análise da variância, os dados de massa dos calos foram transformados em $(X+1)^{1/2}$, pois verificou-se, pelo teste de Bartlett, que as variâncias dos tratamentos não eram homogêneas. Realizou-se a comparação entre os tratamentos pelo teste de Tukey para todas as variáveis, efetuando-se também a análise de regressão para as variáveis do experimento com discos foliares.

Resultados e Discussão

Houve interação significativa entre os antibióticos e concentrações utilizadas no experimento com discos foliares (Quadro 1). As análises de regressão entre as concentrações de cada antibiótico e as variáveis porcentagem de calogênese e massa dos calos, apresentaram, porém, significância apenas em graus muito elevados, com baixo coeficiente de determinação. Por isso, encontram-se, no quadro 3, apenas as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey.

Quadro 1. Resumo da análise da variância do efeito dos antibióticos e concentrações sobre a calogênese de discos foliares de abacateiro 'Ouro Verde' cultivados em meio de cultura MS por 60 dias

Causas de variação	GL	QM	
		Calo	Massa
		%	mg
Antibiótico	2	7.958,03***	543,01***
Concentração	5	18.240,26***	781,86***
Antib. x Concent.	10	2.949,15***	68,29***
Resíduo	72	38,74	14,38
Total	89		

*** Significância estatística ao nível de 0,1% de probabilidade de erro.

O cloranfenicol revelou maior efeito fitotóxico do que os demais antibióticos, reduzindo significativamente a formação de calos já na concentração de 50 mg/L e, com o uso de 100 mg/L, a calogênese foi nula, o que apenas aconteceu com a dose de 200 mg/L de estreptomicina. Já com o ácido nalidíxico, mesmo com o uso desta concentração, ainda houve a formação de calos em 33,2% dos explantes (Quadro 3). Phillips et al. (1981), trabalhando com explantes de *Helianthus tuberosus*, observaram uma redução no crescimento pela presença de 50 mg/L de cloranfenicol no meio de cul-

tura, o que não foi verificado com a mesma concentração de ácido nalidíxico.

O efeito tóxico do cloranfenicol é mais evidente quando se observa a massa média dos calos, que, já na concentração de 12,5 mg/L, foi drasticamente reduzida em relação à testemunha e aos outros antibióticos na mesma concentração (Quadro 3). Okkels & Pedersen (1988) também verificaram efeito tóxico do cloranfenicol sobre a cultura de tecidos de beterraba e cenoura nas concentrações de 8 e 25 mg/L respectivamente.

Quadro 2. Resumo da análise da variância do efeito dos antibióticos sobre a brotação de segmentos nodais de abacateiro 'Ouro Verde' cultivados por 53 dias em meio de cultura MS

Causas de variação	GL	QM	
		Gemas brotadas	Comprimento
		%	mm
Antibiótico	6	657,96ns	48,27***
Resíduo	98	419,75	4,95
Total	104	—	—

*** Significância estatística ao nível de 0,1%. ns: não significativo.

Quadro 3. Porcentagem de explantes calejados e massa média dos calos de discos foliares do abacateiro 'Ouro Verde' cultivados em meio de cultura MS por 60 dias com ácido nalidíxico (A), cloranfenicol (C) e estreptomicina (E)

Concentração	Calo			Massa		
	A	C	E	A	C	E
mg/L	%			mg		
0	100Aa	100Aa	100Aa	557Aab	530Aa	555Aa
12,5	100Aa	100Aa	100Aa	669Aa	51Bbc	464Aa
25	100Aa	100Aa	100Aa	343Abc	75Bb	383Aa
50	100Aa	49,8Bb	100Aa	154Acd	43Bbc	136ABb
100	100Aa	0Bc	100Aa	94Ad	0Bc	103Ab
200	33,2Ab	0Bc	0Bb	44Ad	0Ac	0Ac
C.V. (%)		8,1			30,0	

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quadro 4. Porcentagem de gemas brotadas e comprimento das brotações de segmentos nodais do abacateiro 'Ouro Verde' cultivados por 53 dias em meio de cultura MS com ácido nalidíxico, cloranfenicol e estreptomicina

Tratamentos	Gemas brotadas	Comprimento
	%	mm
Testemunha	93,7a	13,9a
Estreptomicina (50 mg/L)	82,3a	10,9ab
Cloranfenicol (50 mg/L)	77,4a	10,5b
Cloranfenicol (25 mg/L) + estreptomicina (25 mg/L)	95,3a	10,4b
Ácido nalidíxico (50 mg/L)	88,5a	9,9b
Cloranfenicol (25 mg/L) + ácido nalidíxico (25 mg/L)	87,5a	8,3b
Estreptomicina (25 mg/L) + ácido nalidíxico (25 mg/L)	90,3a	7,9b
C.V. (%)	24,0	29,9

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A ação do ácido nalidíxico e da estreptomicina foi muito semelhante quanto à massa dos calos, não diferindo estatisticamente em nenhuma concentração utilizada (Quadro 3).

No experimento com os segmentos nodais, não se verificou influência estatística significativa dos antibióticos para a porcentagem de gemas brotadas, mas, sim, para o comprimento das brotações (Quadro 2).

Todos os tratamentos provocaram uma redução do crescimento das brotações em relação à testemunha, não diferindo entre si (Quadro 4), fato semelhante ao observado por Biasi (1993) para o mesmo cultivar de abacateiro, com os antibióticos ácido nalidíxico e cloranfenicol. Pollock et al. (1983) também verificaram efeito tóxico desses antibióticos, na cultura de células da *Nicotiana plumbaginifolia*, apresentando o cloranfenicol efeito inibitório já na concentração de 1 mg/L.

A fitotoxicidade dos antibióticos depende da concentração à qual o tecido foi exposto e da tolerância da espécie tratada, conforme Okkels & Pedersen (1988). Esses autores verificaram que a concentração de cloranfenicol para inibir 50% da regeneração, na cultura de beterraba e cenoura *in vitro*, foi bem inferior à concentração de estrepto-

micina, e que a cenoura apresentou maior tolerância aos antibióticos do que a beterraba.

Esses fatos também foram observados em outras culturas por Scortichini & Chiariotti (1988), Wilson & Power (1989), Fiola et al. (1990), Mathews & Litz (1990), Leifert et al. (1991, 1992). Entretanto, para algumas espécies em determinadas formas de regeneração *in vitro*, certos antibióticos podem até mesmo estimular a proliferação e diferenciação celular, como verificado em cenoura (Chang & Schmidt, 1991) e painço (Eapen & George, 1990).

Conclusão

Os três antibióticos testados apresentaram efeito tóxico para o abacateiro, sendo recomendados apenas em casos de extrema necessidade, dependendo da suscetibilidade do microorganismo contaminante e da concentração necessária para seu controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARROS, I. de & PASQUAL, M. Contaminação fúngica, bacteriana e oxidação "in vitro" de explantes de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí LCH-2077-2-5-44. *Ciência e Prática*, Lavras, **15**(2):145-153, 1991.

- BIASI, L.A. *Micropropagação do abacateiro 'Ouro Verde' através da cultura de segmentos nodais e calogênese a partir de discos foliares*. Porto Alegre, 1993. 163p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - UFRGS, 1993.
- BIASI, L.A.; KOLLER, O.C. & KÄMPF, A.N. Micropropagação do abacateiro 'Ouro Verde' a partir de segmentos nodais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, **29**(7):1051-1058, 1994.
- CASSELLS, A.C.; CARNEY, B.F.; MCCARTHY, E.; MCHUGH, A. & HARMEY, M.A. Problems posed by cultivable bacterial endophytes in the establishment of axenic cultures of *Pelargonium x domesticum*: the use of *Xanthomonas pelargonii* - specific ELISA, DNA probes and culture indexing in the screening of antibiotic treated and untreated donor plants. *Acta Horticulturae*, Wageningen, (225):153-161, 1988.
- CHANG, C.C. & SCHMIDT, D.R. Initiation and proliferation of carrot callus using a combination of antibiotics. *Planta*, New York, **185**:523-526, 1991.
- DODDS, J.H. & ROBERTS, L.W. *Experiments in plant tissue culture*. 2.ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1985. 232p.
- EAPEN, S. & GEORGE, L. Influence of phytohormones, carbohydrates, aminoacids, growth supplements and antibiotics on somatic embryogenesis and plant differentiation in finger millet. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, **22**:87-93, 1990.
- FIOLA, J.A.; HASSAN, M.A.; SWARTZ, H.J.; BORS, R.H. & McNICOLS, R. Effect of thidiazuron, light fluence rates and kanamycin on in vitro shoot organogenesis from excised *Rubus* cotyledons and leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, **20**:223-228, 1990.
- FISSE, J.; BATALLE, A. & PERA, J. Endogenous bacteria elimination in ornamental plants. *Acta Horticulturae*, Wageningen, (212):87-90, 1987.
- GARCIA, E.G. de & RAFAEL, M. Control de la oxidación y contaminación en microesquejes de café (*Coffea arabica* 'Catimor') cultivados "in vitro". *Agro-nomia Tropical*, Maracay, **40**(4-6):281-290, 1990.
- GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S., eds. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília, ABCTP, EMBRAPA-CNPq, 1990. p.99-169.
- KNEIFEL, W. & LEONHARDT, W. Testing of different antibiotics against gram-positive and gram-negative bacteria isolated from plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, **29**:139-144, 1992.
- LEIFERT, C.; CAMOTTA, H. & WAITES, W.M. Effect of combinations of antibiotics on micropropagated *Clematis*, *Delphinium*, *Hosta*, *Iris* and *Photinia*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, **29**:153-160, 1992.
- LEIFERT, C.; CAMOTTA, H.; WRIGHT, S.M.; WAITES, B.; CHEYNE, V.A. & WAITES, W.M. Elimination of *Lactobacillus plantarum*, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus saprophyticus* and *Pseudomonas paucimobilis* from micropropagated *Hemerocallis*, *Chisya* and *Delphinium* cultures using antibiotics. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, **71**(4):307-330, 1991.
- MATHEWS, H. & LITZ, R. E. Kanamycin sensitivity of mango somatic embryos. *HortScience*, Alexandria, **25**(8):965-966, 1990.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, **15**:473-497, 1962.
- OKKELS, F.T. & PEDERSEN, M.G. The toxicity to plant tissue and to *Agrobacterium tumefaciens* of some antibiotics. *Acta Horticulturae*, Wageningen, (225):199-207, 1988.
- PHILLIPS, R.; ARNOTT, S.M. & KAPLAN, S.E. Antibiotics in plant tissue culture: rifampicin effectively controls bacterial contaminants without affecting the growth of short-term explant cultures of *Helianthus tuberosus*. *Plant Science Letters*, Amsterdam, **21**:235-240, 1981.
- POLLOCK, K.; BARFIELD, D.G. & SHIELDS, R. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. *Plant Cell Reports*, Berlin, **2**:36-39, 1983.
- POULSEN, G.B. Elimination of contaminating microorganisms from meristem culture of apple rootstock M26. *Acta Horticulturae*, Wageningen, (225):193-197, 1988.
- SCORTICHINI, M. & CHIARIOTTI, A. In vitro culture of *Prunus persica* var. Laevis Gray (nectarine): detection of bacterial contaminants and possibility of decontamination by means of antibiotics. *Acta Horticulturae*, Wageningen, (225):109-118, 1988.
- TANAKA, M.; KUMURA, M. & GOI, M. Surface-sterilization for in vitro culture of phalaenopsis flower-stalk cutting using antimicrobials. *Acta Horticulturae*, Wageningen, (131):321-328, 1983.
- WILSON, Z.A. & POWER, J.B. Elimination of systemic contamination in explant and protoplast cultures of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *Plant Cell Reports*, Berlin, **7**:622-625, 1989.