

INFLUÊNCIA DO ANTIBIÓTICO CEFOTAXIMA NA CULTURA DE PROTOPLASTOS DERIVADOS DE MESÓFILO DE *Passiflora incarnata* L.¹

Wagner Campos Otoni²
Vicente Wagner Dias Casali³
Paulo Roberto Cecon⁴
José Maria³
John Brian Power⁵
Michael Raymond Davey⁵

1. INTRODUÇÃO

Tanto fungicidas como antibióticos têm sido amplamente empregados na cultura de tecidos no sentido de prevenir a proliferação, nas culturas, de contaminantes sistêmicos ou superficiais aos explantes (1, 14, 18). A utilização de antibióticos na cultura *in vitro* tem sido crescente com o advento dos vários sistemas de transformação genética de plantas, em especial nos trabalhos envolvendo a transformação indireta, mediada pelo vetor *Agrobacterium tumefaciens*, atuando tanto como componentes de meios seletivos quanto na eliminação das bactérias, após a etapa de co-cultivo dos explantes (1, 2, 11, 12, 14, 18). Nesse particular, antibióticos do grupo das cefalosporinas, dentre eles cefotaxima e carbenicilina, destacam-se por possuírem amplo espectro de ação, baixa toxicidade a células eucarióticas, sendo eficientes em baixas concentrações e, por isso, utilizados

¹ Apresentado no XVI ERBOT, Viçosa, MG, 1994.

Aceito para publicação em 15.12.1994.

² Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa. 36571-000 Viçosa, MG.

³ Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa.

⁴ Departamento de Informática, Universidade Federal de Viçosa.

⁵ Life Science Department, University of Nottingham, Nottingham NG7 2RD, U K.

preferencialmente na cultura de tecidos e células vegetais (2, 11, 12, 14).

A presença do antibiótico cefotaxima no meio de cultura foi citada como fator estimulador do aumento na frequência de ocorrência de organogênese e embriogênese em calos derivados de embriões imaturos foliares e na divisão celular de protoplastos (4, 11, 12, 14).

Com base no recente relato da regeneração de plantas a partir de protoplastos isolados de mesófilo de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener (4), o presente trabalho teve como objetivo o estudo da influência do antibiótico cefotaxima na cultura de protoplastos de mesófilo de *P. incarnata* L.

P. incarnata L. acha-se listada entre as espécies que produzem frutos comestíveis, apesar de não ser explorada comercialmente. Essa espécie é conhecida, nos Estados Unidos, como "May Pops" ou "May Apple", e há relatos de sobrevivência dessa espécie a invernos rigorosos, sendo, juntamente com *Passiflora* sp. (Mburucuya), as duas únicas espécies com adaptabilidade a regiões temperadas (5, 17). Segundo Purss (1958), citado por OLIVEIRA e FERREIRA (15), e Cox e Kiely (1961), citados por FERREIRA e OLIVEIRA (5), plantas de *P. incarnata*, dentre outras espécies, mostraram alto grau de resistência à murcha incitada por *Fusarium*. A espécie tem sido destacada pela sua aplicação farmacológica em razão da elevada produção de alcalóides dos grupos harmana, maltol e etil-maltol, os quais possuem propriedades anticonvulsivas, sedativas e tranqüilizantes, sendo empregada, desde 1904, no tratamento da neurastenia e insônia (6, 17).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolamento de Protoplastos

Folhas novas recém-expandidas de *Passiflora incarnata* L., obtidas de plântulas com 45 a 60 dias de germinação e mantidas em casa de vegetação, foram desinfestadas pela imersão, por 10 minutos, em solução de "Domestos" (Lever Bros, Kingston-upon-Thames, U.K.), a 5% (v/v), seguida de quatro lavagens com água destilada e autoclavada.

Após o tratamento de desinfestação, as margens, bem como as nervuras centrais das folhas, foram removidas de forma que as lâminas foliares remanescentes fossem seccionadas, transversalmente, em tiras de 1 a 2 mm, as quais foram imediatamente transferidas para placas de Petri (Sterilin, Hownslow, U.K.) de 9,0 cm de diâmetro, contendo 15 ml de meio CPW 13M (16), composto dos sais do meio CPW e manitol a 13% (p/v). Os tecidos foram mantidos em pré-plasmólise, durante 60 minutos, e, em seguida,

descartado o meio CPW 13M, sendo então adicionados 15 ml da mistura enzimática, constituída de Celulase-R10 (Yakult Honsha Co. R10 Ltd., Japan) a 1,0% (p/v); Macerozyme-R10 (Yakult Honsha Co. Ltd., Japan) a 0,2% (p/v); Driselase (Kiyiwa Hakko Kogyo Co., Japan) a 0,1% (p/v); 5,0 mM de tampão MES (Sigma Chem. Co., USA); e PVP-10 (Sigma Chem. Co., USA) a 1,0% (p/v). A mistura enzimática foi preparada pela diluição com o meio CPW 13M, sendo o pH corrigido para 5,6; a esterilização se deu pela filtro-esterilização da mistura; e alíquotas de 15 ml foram armazenadas a -20°C . A digestão enzimática dos tecidos se processou pela incubação durante 12 a 14 horas, no escuro, sob agitação orbital de 40 rpm, e à temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Após a fase de incubação, os tecidos em suspensão foram passados por uma peneira plástica e estéril, com malha de náilon de $64 \mu\text{m}$, disposta sobre uma placa de Petri de 9,0 cm, sendo o filtrado coletado por pipetagem com pipetas Pasteur e transferido para tubos com tampa rosqueada de 16 ml de capacidade. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 800 rpm, durante 5 minutos, por três vezes consecutivas, sendo o sobrenadante descartado após cada etapa e o precipitado ressuspendido em, aproximadamente, 15 ml de meio CPW 13M. Após a terceira etapa de centrifugação, avaliaram-se a viabilidade e o rendimento dos protoplastos isolados. A viabilidade dos protoplastos foi determinada pela utilização de uma solução-estoque de diacetato de fluoresceína (Sigma Chem. Co., USA), de $5,0 \text{ mg.ml}^{-1}$, em acetona, segundo descrito por LARKIN (10).

2.2. *Cultivo de Protoplastos e Regeneração de Plantas*

A densidade de plaqueamento de protoplastos utilizada foi de $1,5 \times 10^5$ protoplastos. ml^{-1} , em meio KM8p (9) e gotas de agarose "SeaPlaque" (FMC, Rockland, USA) a 0,6% (p/v). O método de cultivo empregado foi gotas de agarose, sendo os protoplastos cultivados em placas de Petri (Sterilin, Howslow, U.K.) de 5,5 cm, em ausência de luz, e à temperatura de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 28 a 30 dias, até que as microcolônias atingissem a fase de calos de 1 a 2 mm de diâmetro. Foi adotada a redução da pressão osmótica do meio, mediante a substituição, a intervalos de 5 dias, do meio KM8p, pelo meio KM8 (8), a razões de volumes KM8p:KM8 (ml) de 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 e 0:1, segundo adotado por GILMOUR *et alii*. (7), d'UTRA VAZ *et alii* (4) e DORNELAS e VIEIRA (3). A partir de solução-estoque (250 mg.ml^{-1}) de cefotaxima (Claforan, Roussel Lab. Ltd., Uxbridge, U.K.), preparada pela diluição do antibiótico em água bidestilada e autoclavada e filtro-esterilizada em membrana millipore de $0,2 \mu\text{m}$ (Sigma Chem. Co, USA), as seguintes concentrações foram incorporadas ao meio de cultivo dos protoplastos: 0, 50, 100, 250, 300 e 400 mg.l^{-1} .

Na fase de enverdecimento, ao final de 28 a 30 dias de cultivo,

pequenos calos (2 a 3 mm) foram transferidos para o meio MS (13), suplementado por 2,5 mg.l⁻¹ ANA, 0,25 ou 0,50 mg.l⁻¹ de BAP, 0,2 mg.l⁻¹ de tiamina.HCl, 1,0 mg.l⁻¹ de piridoxina, 1,0 mg.l⁻¹ de ácido nicotínico, 50 mg.l⁻¹ de cisteína, 50 mg.l⁻¹ de glutamina, 0,5 mg.l⁻¹ de biotina, 0,5 mg.l⁻¹ de ácido fólico e 3% (p/v) de sacarose e solidificado pela adição de ágar a 0,7% (p/v). Nesta fase as culturas foram mantidas sob intensidade luminosa de 1,5 W.m⁻², fotoperíodo contínuo, e temperatura de 27 ± 2 °C, permanecendo nessa condição durante 25 a 30 dias.

Na fase de regeneração, os calos desenvolvidos e enverdecidos foram recultivados em meio básico de MS (13) suplementado de 0,001 mg.l⁻¹ de ANA e 1,0 mg.l⁻¹ de BAP, sacarose a 3% (p/v), solidificado pela adição de ágar a 0,7% (p/v). O enraizamento dos ramos se deu pela transferência dos ramos alongados em meio MS suplementado com 1,0 mg.l⁻¹ de zeatina, para a fase de indução das raízes, em meio MS suplementado de 2% (p/v) de sacarose, metade da concentração de sais e 1,0 mg.l⁻¹ de AIB; os ramos permaneceram nesse meio durante 12 dias, quando então foram transferidos para a fase final de alongamento das raízes, em meio de composição similar ao anterior, porém na ausência de reguladores de crescimento.

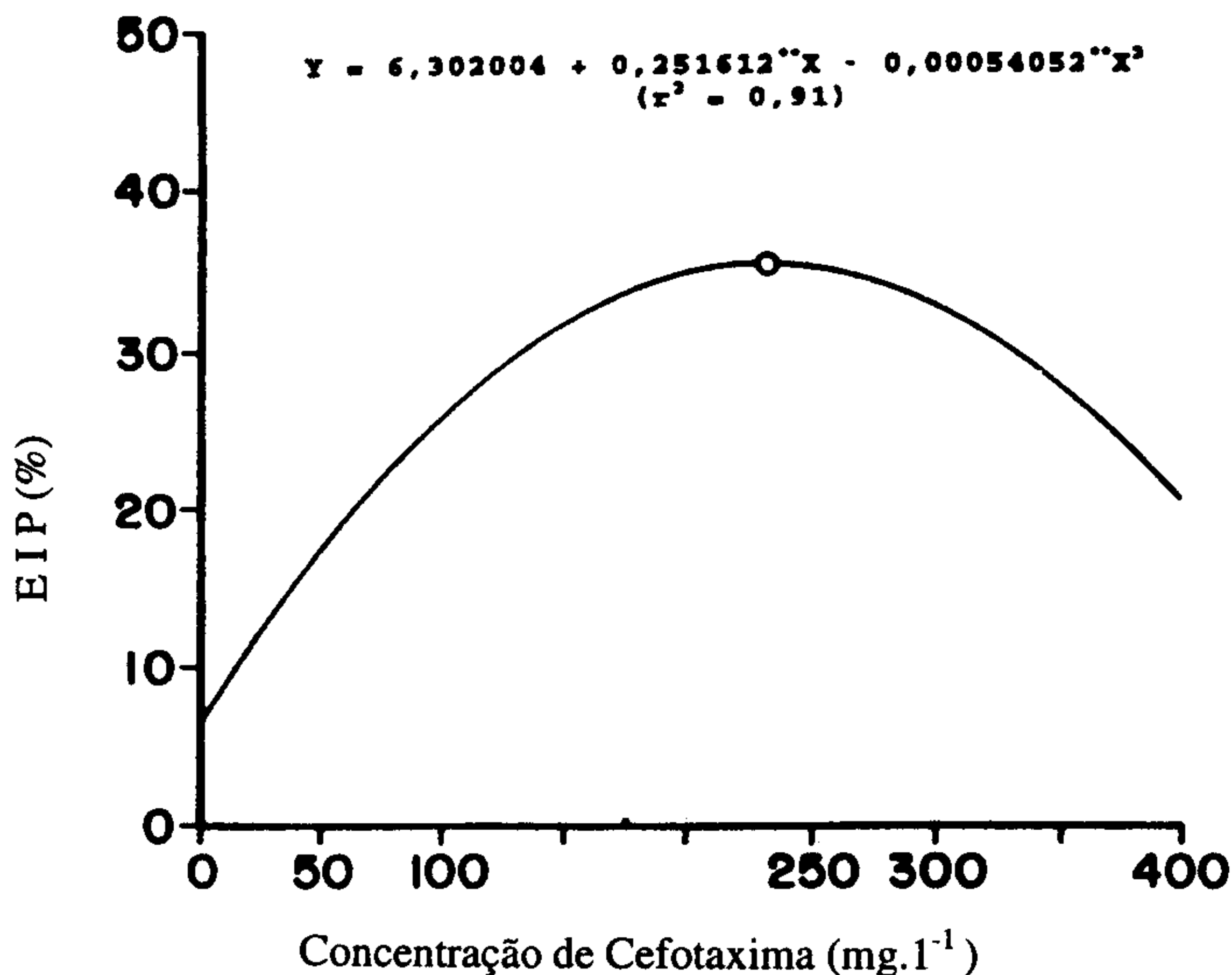
Os regenerantes enraizados foram transferidos para casa de vegetação para a aclimatação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença do antibiótico no meio foi essencial no incremento das eficiências inicial (EIP) e final (EFP) de plaqueamento no sistema de protoplastos utilizado. Na ausência do antibiótico no meio de cultivo dos protoplastos, foram obtidos valores de eficiências médias de plaqueamento muito baixos, de 7,96% e 0,056%, para EIP e EFP, respectivamente. Na análise de regressão, observou-se que o modelo quadrático foi o que apresentou melhor ajuste aos dados obtidos. O ponto de máximo para a variável EIP foi obtido para concentração do antibiótico de 232,76 mg.l⁻¹ (Figura 1), ao passo que, para a variável EFP, o ponto de máximo foi obtido para a concentração de 235,41 mg.l⁻¹ (Figura 2). Considerando os diferentes níveis do antibiótico avaliado, observou-se crescente resposta para EIP e EFP, a partir do nível zero, culminando em valores de EIP, de 35,06%, e de EFP, 0,308%, nos pontos de máximo das equações de regressão.

O efeito estimulatório de cefotaxima no gênero *Passiflora* foi, pela primeira vez, relatado por d'UTRA VAZ *et alii* (4). Esses autores avaliaram o efeito do antibiótico sobre a eficiência inicial de plaqueamento de protoplastos de *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener e obtiveram, em média, maior frequência de divisões celulares iniciais, quando o composto foi incorporado ao meio na concentração de 250 mg.l⁻¹. Foi observado o valor de EIP de,

aproximadamente, 30 e 37% para as concentrações de 100 e 250 mg.l⁻¹, respectivamente; não foi observada, entretanto, nenhuma divisão celular na ausência do antibiótico. Os autores não estudaram a influência desse composto na eficiência final de plaqueamento dos protoplastos.



** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste t.

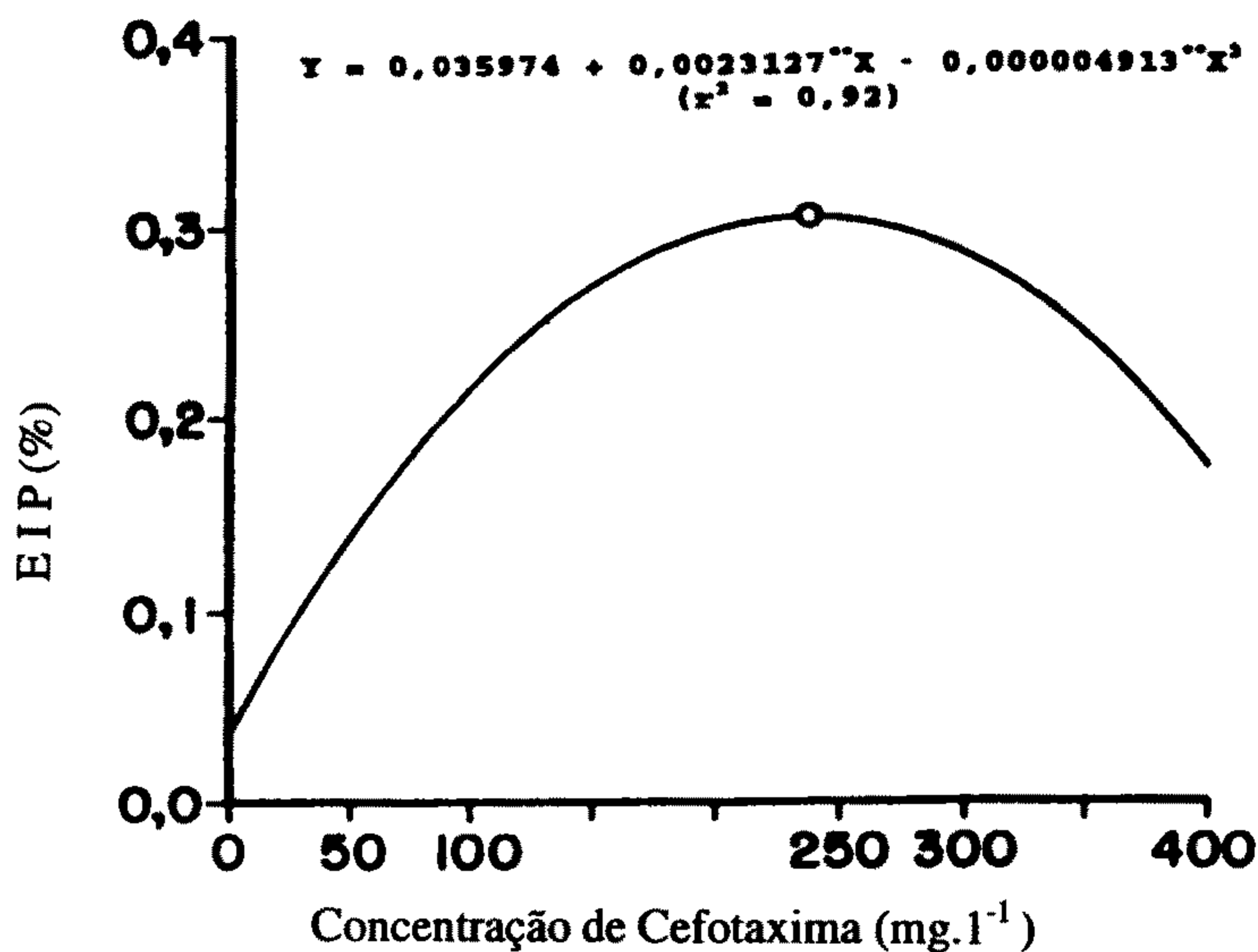
° Ponto de máximo para a equação.

FIGURA 1 - Estimativas da eficiência inicial de plaqueamento de protoplastos mesófilo de *P. incarnata*, em função de concentrações de cefotaxima.

Todavia, DORNELAS e VIEIRA (3) não utilizaram o antibiótico em sistemas de protoplastos derivados de cotilédones de plântulas de *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. amethystina* e *P. cincinnata*, germinadas em condições *in vitro*.

Segundo os autores, para a densidade de plaqueamento de $1,5 \times 10^5$ protoplastos.ml⁻¹, em gotas de agarose, foram obtidas eficiências iniciais de plaqueamento de $40,1 \pm 8,5$, $27,2 \pm 6,3$, e $15,7 \pm 5,1\%$ para as referidas espécies, respectivamente.

MATHIAS e BOYD (11) relataram que a inclusão de cefotaxima no meio de cultura, nas concentrações de 60 ou 100 mg.l⁻¹, incrementou a



** Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste t.

° Ponto de máximo para a equação.

FIGURA 2 - Estimativas da eficiência final de plaqueamento de protoplastos de mesófilo de *P. incarnata*, em função de concentrações de cefotaxima.

proliferação de calos a partir de embriões imaturos de *Triticum aestivum* L., com considerável aumento na frequência de calos organogênicos. A presença do composto no meio contribuiu para o aumento no rendimento dos ramos regenerados em calos individuais, quando comparado com os tecidos cultivados na ausência de cefotaxima.

Em quatro cultivares de cevada (*Hordeum vulgare* L.) foram observados aumentos no crescimento de calos, bem como na frequência regenerativa de plantas a partir de calos, quando da presença do composto no meio (12). Ainda neste sentido, OKKELS e PEDERSEN (14) relataram o efeito positivo do antibiótico no estímulo à organogênese de ramos em calos de cenoura (*Daucus carota* L.).

O efeito desse antibiótico no controle de contaminantes sistêmicos aos tecidos cultivados não parece ser a causa responsável por respostas superiores dos tecidos ou células, quando em presença deste, uma vez que, no presente experimento, não foram observadas contaminações sistêmicas no tratamento

que envolver a ausência desse composto no meio de cultivo dos protoplastos. Fato semelhante foi observado por MATHIAS e MUKASA (12), em calos derivados de embriões imaturos de *Hordeum vulgare* e em colônias derivadas de protoplastos de *P. edulis* f. *flavicarpa* (4).

O antibiótico pertence ao grupo das cefalosporinas, possuindo largo espectro de ação, tanto em bactérias gram-positivas como gram-negativas, atuando em sítios específicos da parede celular das bactérias, reconhecidos como sítios de proteínas ligantes à penicilina (PBPs), relacionados com a síntese de peptídeo-glicano da parede celular. Desde que a configuração química do antibiótico não tenha semelhanças a de nenhum regulador de crescimento, torna-se difícil especular os possíveis efeitos desse composto sobre a divisão celular dos protoplastos. No entanto, MATHIAS e BOYD (11) sugeriram que o metabolismo desse antibiótico estaria, de alguma forma, relacionado com esterases nas células vegetais, resultando na produção de metabolitos de atividades semelhantes às de reguladores de crescimento.

Apesar de este trabalho confirmar o efeito promotor desse composto na divisão de protoplastos derivados de mesófilo de *P. incarnata*, relatado originalmente por d'UTRA VAZ *et alii* (4), em protoplastos de maracujá-amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa*), necessário se faz a extensão de estudos dessa natureza para outras espécies de interesse do gênero *Passiflora*.

4. RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do antibiótico cefotaxima nas eficiências inicial (EIP) e final (EFP) de plaqueamento de protoplastos derivados de mesófilo de *Passiflora incarnata* L. Folhas novas, recém-expandidas, de plantas obtidas a partir da germinação de sementes e anteriormente à emissão das gavinhas, foram utilizadas como fonte de explantes. Os protoplastos foram cultivados a uma densidade de plaqueamento de $1,5 \times 10^5$ protoplastos.ml⁻¹ em meio KM8p e gotas de agarose "SeaPlaque" (FMC, Rockland, USA) a 0,6% (p/v); as seguintes concentrações de cefotaxima foram adicionadas ao meio: 0, 50, 100, 250, 300 e 400 mg.l⁻¹. A presença do antibiótico no meio foi essencial no incremento das eficiências de plaqueamento de protoplastos de *P. incarnata*. Na análise de regressão foi adotado o modelo quadrático, e, em função dos níveis do antibiótico avaliados, observou-se crescente resposta para EIP e EFP, a partir do nível zero, culminando em valores de EIP, de 35,06%, e de EFP, 0,308%, nos pontos de máximo das equações de regressão, com as respectivas concentrações de cefotaxima de 232,76 e 235,41 mg.l⁻¹.

Regenerantes foram obtidos pelo cultivo dos calos em meio MS suplementado de 0,001 mg.l⁻¹ de NAA e 1,0 mg.l⁻¹ de BAP. Os ramos

regenerados foram alongados pela alternância, a cada 30 dias, entre os meios MS suplementado de $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de zeatina e meio MS na ausência de reguladores de crescimento.

O enraizamento dos ramos deu-se pela transferência dos ramos alongados para meio MS suplementado de sacarose a 2% (p/v), metade da concentração dos sais e $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de AIB. Os ramos permaneceram nesse meio durante 12 dias, quando foram transferidos para a fase final de alongamento das raízes, em meio de composição similar, porém na ausência de reguladores de crescimento. As plantas foram transferidas para casa de vegetação e aclimatizadas com sucesso.

5. SUMMARY

(INFLUENCE OF THE ANTIBIOTIC CEFOTAXIME ON THE CULTURE OF MESOPHYLL-DERIVED PROTOPLASTS OF *Passiflora incarnata* L.)

The aim of this work was to evaluate the influence of the antibiotic cefotaxime at both initial (IPE) and final (FPE) plating efficiencies of *Passiflora incarnata* L. mesophyll-derived protoplasts. Newly-expanded leaves of seedlings, obtained prior to the formation of tendrils, were used as a source of mesophyll protoplasts. Protoplasts were plated at a density of 1.5×10^5 protoplasts. ml^{-1} in agarose-solidified droplets of KM8p medium, with several cefotaxime concentrations added to the culture medium: 0; 50; 100; 250; 300; and 400 mg.l^{-1} . The inclusion of cefotaxime to the protoplast culture medium was essential for inducing and sustaining cell division in isolated protoplasts. The analysis of variance showed a significant effect of the antibiotic concentration on IPE and FPE. A quadratic regression model was applied and optimum IPE and FPE values were obtained at cefotaxime concentration of 232.76 and 235.41 mg.l^{-1} , respectively. Protoplast-derived calli were cultured on agar-solidified MS medium with 0.001 mg.l^{-1} NAA and 1.0 mg.l^{-1} BAP. Regenerated shoots were elongated by subculturing between MS medium with 1.0 mg.l^{-1} zeatin and MS medium lacking growth regulators, and rooted on a half-strength MS-based medium, supplemented with 1.0 mg.l^{-1} IBA, for 12 days, followed by the transference to the same medium lacking growth regulators. Rooted plants were successfully acclimatized under greenhouse conditions.

6. LITERATURA CITADA

1. CASSELS, A.C. Problems in tissue culture: culture contamination. In: DEBERGH, P.C. & ZIMMERMAN, R.H. (ed.). *Micropropagation: Technology and Application*. Dordrecht, Kluwer, 1991. p.31-34.

2. COLBY, S.M. & MEREDITH, C.P. Kanamycin sensitivity of cultured tissues of *Vitis*. *Plant Cell Rep.*, 9:237-240, 1990.
3. DORNELAS, M. & VIEIRA, M.L.C. Plant regeneration from protoplast cultures of *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg., *P. amethystina* Mikan. and *P. cincinnata* Mast. *Plant Cell Rep.*, 13:103-106, 1993.
4. d'UTRA VAZ, F.B.; SANTOS, A.V.P. dos; 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* fv. *flavicarpa* Degener): the importance of the antibiotic cefotaxime in the culture medium. *Plant Cell Rep.*, 12: 220-225, 1993.
5. FERREIRA, F.R. & OLIVEIRA, J.C. Germoplasma de *Passiflora*. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R. & VAZ, R.L. (coord.). *A cultura do maracujá no Brasil*. Jaboticabal, FUNEP, 1991. p. 187-200.
6. FREITAS, P.C.D. de. Possibilidades farmacológicas. In: RUGGIERO, C. (ed.). *Cultura do maracujazeiro*. Ribeirão Preto, Legis Summa, 1987. p. 210-217.
7. GILMOUR, D.M.; DAVEY, M.R. & COCKING, E.C. Production of somatic hybrid tissues following chemical and electrical fusion of protoplasts from albino cell suspensions of *Medicago sativa* and *M. borealis*. *Plant Cell Rep.*, 8: 29-32, 1989.
8. KAO, K.N. Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soyabean-*Nicotiana glauca* L. *Mol. Gen. Genet.*, 150:225-230, 1977.
9. KAO, K.N. & MICHAYLUK, M. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfafa. *Z. Pflanzenphysiol.*, 96:135-141, 1980.
10. LARKIN, P.J. Purification and viability determination of plant protoplasts. *Planta*, 128:213-216, 1976.
11. MATHIAS, R.J. & BOYD, L.A. Cefotaxime stimulates callus growth, embryogenesis and regeneration in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum* L. Em. Thell). *Plant Sci.*, 46:217-223, 1986.
12. MATHIAS, R.J. & MUKASA, C. The effect of cefotaxime on the growth and regeneration of callus from four varieties of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Rep.*, 6:454-457, 1987.
13. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15:473-479, 1962.
14. OKKELS, F.T. & PEDERSEN, M.G. The toxicity to plant tissue and to *Agrobacterium tumefaciens* of some antibiotics. *Acta Hort.*, 225:199-207, 1988.
15. OLIVEIRA, J.C. & FERREIRA, F.R. Melhoramento genético do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R. & VAZ, R.L. (coord.). *A cultura do maracujá no Brasil*. Jaboticabal, FUNEP, 1991. p. 211-239.
16. POWER, J.B.; DAVEY, M.R.; McLELLAN, M. & WILSON, D. *Laboratory manual: plant tissue culture*. Nottingham, University of Nottingham, 1989. 138 p.
17. VANDERPLANK, J. *Passion flowers*. London, Cassel Publishers, 1991. 176 p.
18. YOUNG, P.M.; HUTCHINS, A.S. & CANFIELD, M.L. Use of antibiotics to control bacteria in shoot cultures of wood plants. *Plant Sci. Let.*, 34:203-209, 1984.