

ANTIBIÓTICOS E BENOMYL NO CONTROLE DE CONTAMINANTES EM SEGMENTOS NODAIS DE CAFEIEIRO CULTIVADOS *IN VITRO*¹

Cláudia Alencar Vanetti²
José Rogério de Oliveira³

RESUMO

Bactérias e fungos associados com o cafeeiro, no campo ou sob ripados, geralmente são capazes de crescer e contaminar explantes desta planta cultivados *in vitro*. Procedeu-se ao isolamento e à identificação do gênero destes microrganismos à seleção de antibióticos e diferentes concentrações do fungicida benomyl, visando ao controle dos mesmos. De nove isolados bacterianos, quatro pertenciam ao gênero *Bacillus* e cinco ao gênero *Erwinia*. Todos os isolados fúngicos pertenciam ao gênero *Rhizoctonia*. Realizou-se um antibiograma com os nove isolados bacterianos e 35 diferentes antibióticos. Destes, os mais eficientes foram o ácido nalidíxico, o ácido oxilínico, a cefotaxima e o sulfazotrin, aos quais todos os isolados se mostraram sensíveis. Os isolados de *Rhizoctonia* foram sensíveis ao benomyl, em todas as dosagens testadas. O efeito dos pesticidas sobre o desenvolvimento dos explantes não pode ser observado devido à alta taxa de oxidação fenólica (75 a 100%).

Palavras-chaves: *Coffea arabica*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Rhizoctonia*, cultura de tecidos.

ABSTRACT

ANTIBIOTICS AND BENOMYL FOR CONTAMINATION CONTROL OF COFFEE NODAL SEGMENTS CULTIVATED *IN VITRO*

Bacteria and fungi associated with field or nursery grown coffee plants can contaminate coffee explants *in vitro*. Out of nine bacterial isolates obtained from such

¹ Aceito para publicação em 11.07.2002. Realizado com auxílio financeiro da FAPEMIG.

² Dept. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000 Viçosa, MG. E-mail: cvanetti@ufv.br

³ Dept. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000 Viçosa, MG. E-mail: jrogerio@ufv.br

plants, four belonged to the genus *Bacillus* and five to the genus *Erwinia*, while all the fungal isolates were *Rhizoctonia* sp. Out of 35 antibacterial agents tested, only nalidixic acid, oxylynic acid, cefotaxin and sulfazotin inhibited the growth of all the bacterial isolates. All fungal isolates were inhibited by benomyl. The effect of these compounds on the development of coffee explants could not be determined because of high rate (75 to 100%) of phenolic oxidation.

Key words: *Coffea arabica*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Rhizoctonia*, tissue culture.

INTRODUÇÃO

Microrganismos externos e endofíticos, essencialmente saprofíticos ou potenciais patógenos de plantas, são freqüentemente encontrados em tecidos de todos os órgãos vegetais (6, 11, 17). As gemas axilares do cafeeiro são recobertas por pêlos que, por sua vez, são recobertos por brácteas, o que dificulta a descontaminação externa (13). Quanto aos endofíticos encontrados em vasos e espaços intercelulares, eles não são controlados pelos métodos convencionais (3, 5, 7, 8, 11, 17).

Em 1990, ao dar-se início a um trabalho de pesquisa com base em organogênese *in vitro*, a partir de gemas axilares, observou-se que 100% dos explantes apresentavam-se contaminados com fungos, em menor porcentagem, e com bactérias (próximo de 100%). Embora a porcentagem de contaminação fúngica fosse muito baixa, os fungos se desenvolviam rapidamente, contaminando outros explantes do mesmo frasco de cultivo. Algumas vezes tanto os contaminantes fúngicos quanto os bacterianos desenvolviam-se tardiamente, comprometendo a cultura já em estado mais avançado de desenvolvimento (7).

Depois de várias tentativas infrutíferas de cultivo dos explantes e de várias consultas à bibliografia disponível, propôs-se, por meio deste trabalho, identificar o gênero dos microrganismos, e instalar um ensaio visando controlar os contaminantes externos e internos em tecidos dos segmentos nodais de ramos ortotrópicos de cafeeiro por meio de antibióticos e de fungicida.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e desinfestação dos segmentos nodais

Utilizou-se a metodologia empregada por Söndahl et al. (17) indicada para desinfestação e cultura de brotos de cafeeiros, com algumas modificações.

Como material vegetal foram usadas diferentes introduções de cafeeiros do cultivar Catuaí, de um ou mais anos de idade, cultivados sob ripados, na UFV, visando à propagação vegetativa. Extremidades de

ramos ortotrópicos foram cortadas logo abaixo do quarto par de gemas e os limbos foliares foram eliminados. As estacas resultantes foram imediatamente imersas em água contendo algumas gotas de Tween 20, para quebrar a tensão superficial, e, ou, hipoclorito de sódio a 0,2%. Desta solução, as estacas foram imediatamente conduzidas ao laboratório, onde foram enxaguadas em água corrente de torneira, por um período mínimo de 6 h, visando eliminar o excesso de impurezas e de parte dos propágulos de microrganismos externos. Em seguida, foram desinfestadas em hipoclorito de sódio a 2% v/v (produto comercial puro), durante 10 minutos, com agitação manual leve. O Tween 20 foi evitado nesta fase, porque induz maior taxa de oxidação dos explantes, já bastante alta em tecidos de cafeeiro. Depois, retirou-se o excesso de hipoclorito de sódio com três enxaguaduras, utilizando-se água destilada esterilizada durante cinco minutos com fraca agitação manual.

Isolamento dos microrganismos

Depois de desinfestadas, as estacas foram imediatamente transferidas uma a uma para o meio de corte (água destilada esterilizada + 250 μ L de cisteína). Neste meio, foram eliminados a gema apical, os excessos de entrenós e os resíduos de pecíolos foliares, de modo a obterem-se segmentos nodais com tamanho aproximado de 0,5 cm e contendo um par de gemas ortotrópicas. De cada brotação aproveitaram-se o segundo, o terceiro e o quarto segmentos nodais, cultivando-os em número de três a cinco por placa de Petri (9,0 x 1,5 cm), contendo 10 mL de meio de cultivo, constituído pelos nutrientes minerais de Murashige e Skoog (14), 3% p/v de sacarose, 100 mg L⁻¹ de cisteína e o pH ajustado a 5,7, antes da adição de 1% p/v de ágar.

Foram preparadas 5 a 10 placas para cada repetição do ensaio, o que ocorreu duas vezes.

As placas foram incubadas em BOD a 25-28 °C, no escuro, durante três a cinco dias. Após esse período, as colônias bacterianas e fúngicas desenvolvidas foram transferidas para tubos contendo meio 523 (9) e BDA, respectivamente. Os organismos foram cultivados e preservados até se dar início aos trabalhos de identificação e, ou, de controle.

Identificação do gênero dos isolados bacterianos

Os isolados de bactérias foram identificados por meio de provas bioquímicas e tintoriais, cujos resultados foram analisados segundo o Manual de Bergey, volumes 1 e 2 (10, 16).

Identificação do gênero dos isolados fúngicos

Pontas de hifa do micélio das colônias foram transferidas para meio BDA em placas de Petri, uma por placa, incubadas sob bateria de lâmpadas fluorescentes (Silvanya[®], Luz do dia Plus), em laboratório (temperatura de 25-30°C). Para identificação das colônias de fungos, utilizou-se como referência o tipo de colônia, pigmentação e presença ou não de corpos frutíferos. Estas informações foram comparadas com os gêneros fúngicos descritos por Barnett (2).

Seleção de antibióticos para o controle de contaminantes bacterianos

Em placas de Petri preparou-se uma camada básica de ágar-água a 2%. Após a solidificação, verteu-se uma sobrecamada de 9,0 mL de meio 523, semi-sólido (0,85% de ágar), a 50°C, ao qual se incorporou 0,1 mL de suspensão de células do organismo-teste (cultura com 24 horas). Solidificada a sobrecamada, foram distribuídos os discos de papel-filtro contendo antibióticos, um central e seis equidistantes dele. As placas foram incubadas a 28°C, por 48 horas, quando se observou a formação ou não de halos de inibição. A avaliação foi feita de acordo com a seguinte escala:

Diâmetro de halo $\geq 2,0$ cm	sensível (S)
Diâmetro de halo > 0 e $< 2,0$ cm	medianamente sensível (MS)
Diâmetro de halo = 0	insensível (I)

O antibiograma foi realizado com 35 diferentes antibióticos e duas repetições.

Seleção de dosagem de benomyl para o controle de contaminantes fúngicos

O meio de cultivo constituiu-se dos nutrientes minerais de Murashige e Skoog (14) e, ainda, de 2 g de cisteína, 10 g de sacarose e 1 g de ágar por litro de meio. Adicionaram a este meio, como tratamentos: 0; 0,25; 0,5; 1,0; e 2,0 g L⁻¹ do princípio ativo do fungicida benomyl. A opção por este fungicida deveu-se ao fato de que a literatura o menciona como sendo um produto não tóxico a explantes vegetais cultivados *in vitro* (6).

Foram plantados quatro segmentos nodais por placa e preparadas quatro placas por tratamento, as quais foram incubadas a 27°C, no escuro, durante três dias. Após o período de incubação, verificou-se a presença de micélio, visualmente e com ajuda de microscópio estereoscópico. O ensaio foi repetido duas vezes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação do gênero dos isolados bacterianos

Foram obtidos nove isolados bacterianos, dos quais cinco (isolados C3, C4, C5, C6 e C7) eram bastonetes gram-negativos e anaeróbios facultativos (Quadro 1). Estes isolados foram posicionados na Seção 4 – Bastonetes anaeróbios facultativos e gram-negativos – do Manual de Bergey (10), como membros da família Enterobacteriaceae Rahn 1937 (Quadro 2).

QUADRO 1 - Características dos isolados bacterianos, contaminantes de segmentos nodais de cafeeiro cultivados *in vitro*

Características	Isolados								
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
Coloração de Gram	+	+	-	-	-	-	-	+	+
Forma da célula	bast ^a	bast	bast	bast	bast	bast	bast	bast	bast
Anaeróbica	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Aeróbica	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Formação de esporos	+	+	-	-	-	-	-	+	+

^a bast: Bastonete

QUADRO 2 - Características de cinco isolados bacterianos, contaminantes de segmentos nodais de cafeeiro cultivados *in vitro* e algumas características diferenciais das famílias da Seção 5 do Manual de Bergey (10)

Características	Isolados					Famílias		
	C3	C4	C5	C6	C7	Entero- bacteriaceae	Vibrio- naceae	Pasteure- llaceae
Bastonetes retos	+	+	+	+	+	+	D ^a	+
Bastonetes curtos	-	-	-	-	-	-	D	-
Teste de oxidase	-	-	-	-	-	-	+	+

^a D = Proporção substancial de espécies diferem.

As características morfológicas, tintoriais e bioquímicas dos isolados C3, C4, C5, C6 e C7 parecem indicar que eles pertencem ao gênero *Erwinia* Winslow et al, 1920 (Quadro 3). Espécies de *Erwinia* são encontradas associadas com plantas, como patógenos, saprófitas ou como constituintes da flora epífita (12). Espécies pertencentes aos outros gêneros da família Enterobacteriaceae são encontradas, normalmente, associadas ao homem e animais ou livremente no solo e água (10).

QUADRO 3 - Características de cinco isolados bacterianos, contaminantes de segmentos nodais de cafeeiro cultivados <i>in vitro</i> , e algumas características do gênero <i>Erwinia</i> (12)						
Características	Isolados					<i>Erwinia</i> ^a
	C3	C4	C5	C6	C7	
Coloração de Gram	-	-	-	-	-	-
Bastonetes retos	+	+	+	+	+	+
Bastonetes curvos	-	-	-	-	-	-
Oxidase	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+

^a Associado com plantas, como patógenos, saprófitas ou como constituintes da flora epífita.

Os quatro isolados restantes (C1, C2, C8 e C9) eram bastonetes gram-positivos e esporogênicos (Quadro 1), tendo sido posicionados na Seção 13 – Bastonetes e cocos gram-positivos e esporogênicos – do Manual de Bergey (16). As características diferenciais de bactérias esporogênicas (15) mostraram que esses isolados pertencem ao gênero *Bacillus* (Quadro 4). Nenhum membro deste gênero é considerado um patógeno ativo de plantas, embora alguns sejam comuns em plantas, podendo estar envolvidos em apodrecimento de órgãos vegetais, especialmente durante e após a colheita (4).

De acordo com Johnson et al. (8) e Fisher e Petrini (5), as bactérias nos tecidos internos de diferentes órgãos de plantas podem ser essencialmente saprofíticas ou potenciais patógenos do hospedeiro, podendo causar doença quando as condições fenológicas ou de ambiente forem propícias. Entretanto, não foi objetivo deste trabalho verificar a potencial patogenicidade dos isolados obtidos.

Identificação do gênero dos isolados fúngicos

As colônias desenvolveram-se vigorosamente. Inicialmente eram brancas, tornando-se cinza-escuras após três dias. Todos os isolados apresentaram a mesma morfologia de colônia.

QUADRO 4 - Características de quatro isolados bacterianos, contaminantes de segmentos nodais de cafeeiro cultivados *in vitro* e características diferenciais de bactérias esporogênicas (15)

Características	Isolados				Gêneros ^a					
	C1	C2	C8	C9	Bac	Spo	Clo	Des	Sps	Osc
Bastonetes	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Bastonetes curtos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Coloração de gram	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Aeróbio estrito	+	-	+	+	D ^b	-	-	-	+	ND ^c
Anaeróbio facultativo	-	+	-	-	D	+	-	-	-	ND
Anaeróbico estrito	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
Catalase	+	+	+	+	+	-	-	-	+	ND

^a Bac = *Bacillus*, Spo = *Sporolactobacillus*, Clo = *Clostridium*, Des = *Desulfotomaculum*, Sps = *Sporosarcina*, Osc = *Oscillospira*.

^b D = proporção substancial de espécies diferem.

^c ND = não determinado.

Ao microscópio de luz, observou-se que as hifas eram grossas, de parede espessa, pigmentadas e septadas. As ramificações inseriam-se em ângulo reto na hifa de origem. Na região de inserção, o calibre da hifa secundária apresentava ligeiro estreitamento e os septos eram formados antes e depois da região de inserção, na hifa principal, e pouco acima da base, na hifa secundária. Não se encontrou nenhuma frutificação, sexual ou assexual, assim como nenhum escleródio. Segundo Barnett (2), o fungo é um *Micelia Sterilia*, pertencente ao gênero *Rhizoctonia*.

De acordo com Andersen e Rasmussen (1), diferentes teliomorfos de *Rhizoctonia* são encontrados como micorrizas de orquídeas, colonizando os tecidos corticosos da raiz e rizomas. Em meio de cultura, nem sempre estas espécies produzem escleródios. Embora teliomorfos endofíticos de *Rhizoctonia* sejam pouco estudados, sabe-se que ocorrem em outras espécies de plantas, como *Pinus taeda*, tremoço e ervilha.

Seleção de antibióticos para o controle de contaminantes bacterianos

Verificou-se que os melhores antibióticos a serem testados nas culturas de brotos de cafeeiro seriam o ácido nalidíxico, o ácido oxilínico, a cefotaxima e o sulfazotrin (Quadro 5), aos quais os nove isolados bacterianos mostraram-se sensíveis. Outros produtos que poderiam ser testados seriam a cefotriaxona e o norfloxacin, aos quais oito isolados mostraram-se sensíveis e um medianamente sensível; e o ácido pipemídico, a amicacina, a cefoxitina e o cloranfenicol, aos quais sete isolados mostraram-se sensíveis e dois medianamente sensíveis. É importante determinarem-se a concentração dos antibióticos e os efeitos resultantes das combinações dos mesmos no meio de cultura. É bastante freqüente a ocorrência de sinergismo quando dois ou mais antibióticos são combinados, o que pode levar à diminuição da concentração mínima necessária para inibir o crescimento de isolados bacterianos sensíveis. O cloranfenicol não é recomendado para uso em cultura de tecido, devido ao seu efeito tóxico (18).

Seleção de dosagem de benomyl para o controle de contaminantes fúngicos

Todas as concentrações de benomyl testadas foram 100% eficientes, mesmo na mais baixa concentração (0,25 g do p.a./litro de meio). Apenas nas testemunhas observou-se crescimento de colônias fúngicas, mesmo assim em pequena porcentagem, como já se havia verificado nos testes preliminares; ou seja, na primeira repetição do ensaio apenas 31,2% dos pares de gemas desenvolveram colônias fúngicas, enquanto, na segunda, reduziu-se para 25%. Entretanto, verificou-se que todos os brotos desenvolveram crescimento bacteriano, independentemente da concentração do fungicida no meio.

O objetivo inicial deste trabalho foi conduzi-lo até a fase de germinação dos brotos e enraizamento dos explantes, de forma que se pudesse observar se havia ou não efeito deletério das drogas selecionadas, nas concentrações efetivas, sobre a cultura. Entretanto, este objetivo não pôde ser atingido, devido à alta porcentagem de oxidação dos explantes (75 a 100%). Barros e Pasqual (3) consideram que tanto a infecção bacteriana de explantes de cafeeiro quanto a alta concentração de hipoclorito de sódio usado na assepsia dos explantes são responsáveis pela oxidação fenólica. O problema da oxidação, já observado (13), não pôde ser contornado durante a pesquisa, mesmo tendo-se usado antioxidante (cisteína) no meio em todas as fases da pesquisa, o que leva a propor que novos estudos sejam conduzidos com este objetivo específico.

QUADRO 5 - Sensibilidade de isolados bacterianos, contaminantes de segmentos nodais de cafeeiro cultivados *in vitro*, a diferentes antibióticos

Antibiótico	µg /disco	Nº de isolados			Antibiótico	µg /disco	Nº de isolados		
		S*	MS	I			S*	MS	I
Ácido nalidíxico	30	9	0	0	Gentamicina	10	0	9	0
Ácido oxilínico	30	9	0	0	Kanamicina	30	5	4	0
Ácido pipemídico	30	7	2	0	Lincomicina	10	0	1	8
Amicacina	30	7	2	0	Neomicina	30	0	8	1
Amoxilina	10	0	1	8	Netilmicina	30	4	5	1
Ampicilina	10	0	1	8	Nitrofurantoina	10	1	5	3
Bacitracina	30	0	3	6	Norfloxacin	10	8	1	0
Carbenicilina	100	2	6	1	Novobiocina	30	3	4	2
Cefadroxil	30	3	5	1	Oxacilina	05	0	2	7
Cefotaxima	30	9	0	0	Penicilina G	10	0	0	9
Cefalexina	30	4	3	2	Polimixina B	300	0	5	4
Cefalotina	30	3	3	3	Rifampicina	30	1	7	1
Cefoxitina	30	7	2	0	Sulfazotrim	25	9	0	0
Cefotriaxona	30	8	1	0	Sulfonamida	300	4	0	5
Cloranfenicol	30	7	2	0	Tetraciclina	30	6	1	2
Eritromicina	15	3	0	6	Tobramicina	10	2	7	0
Estreptomicina	10	1	8	0	Vancomicina	30	3	4	2
Fosfomicina	30	3	4	2					

* S = sensível; MS = medianamente sensível; I = insensível.

CONCLUSÕES

1) Bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Erwinia* e fungos pertencentes ao gênero *Rhizoctonia* são contaminantes de tecidos dos segmentos nodais de ramos de cafeeiro.

2) Os antibióticos que se mostram mais promissores ao controle de contaminantes bacterianos são o ácido nalidíxico, o ácido oxilínico, a cefotaxima e o sulfazotrin, aos quais todos os isolados de bactérias mostram-se sensíveis.

3) Os isolados de *Rhizoctonia* são sensíveis ao benomyl em todas as dosagens testadas.

4) A alta taxa de oxidação fenólica (75 a 100%) nos explantes não permite a avaliação do efeito dos pesticidas sobre o desenvolvimento dos mesmos.

REFERÊNCIAS

1. ANDERSEN, T.F. & RASMUSSEN, H.N. The mycorrhizal species of *Rhizoctonia*. In: Sneh, B.; Jabaji-Hare, S. & Dijst, G. (eds.). *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Dordrecht/Boston/London, Kluwer Academic Publishers, 1996. p. 379-90.
2. BARNETT, H.L. Illustrated genera of imperfect fungi. West Virginia University, Burgess Publishing, 1967. 225p.
3. BARROS, I. DE & PASQUAL, M. Contaminação fúngica, bacteriana e oxidação "in vitro" de explantes de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí LHC-2077-2-5-4. *Ciência e Prática*, 15:145-53, 1991.
4. BRADBURY, J. F. Guide to plant pathogenic bacteria. Ferry Lane, CAB International, 1986. 332p.
5. FISCHER, P.J. & PETRINI, O. Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytologist*, 120:137-43, 1992.
6. GEORGE, E.F. & SHERRINGTON, P.D. Plant propagation by tissue culture. Reading, Eastern Press, 1984. 709p.
7. GILBERT, J.E.; SHOEHEIT, S. & CALIGARI, P.D.S. The use of antibiotics to eliminate latent bacterial contamination in potato tissue culture. *Annals of Applied Biology*, 119:113-20, 1991.
8. JOHNSON, G.I.; MEAD, A.J.; COOKE, A.W. & DEAN, J.R. Mango stem end rot pathogens: fruit infection by endophytic colonization of the inflorescence and pedicel. *Annals of Applied Biology*, 120:225-34, 1992.
9. KADO, C. I. & HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 60:969-76, 1970.
10. KRIEG, N.R. & HOLT, J.G. (eds.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 1. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984. 964p.
11. LARRAN, S.; MONACO, C. & ALIPPI, H.E. Endophytic fungi in leaves of *Lycopersicon esculentum* Mill. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17:181-4, 2001.
12. LELLIOTT, R.A. & DICKEY, R.S. Genus VII. *Erwinia* Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith 1920. In: Krieg, N.R. & Holt, J.G. (eds.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol.1. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984. p.469-76.

13. LONDOÑO-RAMIREZ, L.C. & OROZCO-CASTAÑO, F.J. Metodos de propagación de cafetos mediante cultivo "in vitro". *Cenicafé*, 37:119-33, 1986.
14. MURASHIGE, T. & SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-97, 1962.
15. SNEATH, P.H.A. Endospore forming Gram-positive rods and cocci. In: Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; Sharpe, M.E. & Holt, J.G. (eds.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2. Baltimore, Williams e Wilkins, 1986. p.1104-599.
16. SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E. & HOLT, J.G. (eds.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2. Baltimore, Williams e Wilkins, 1986. p.965-1599.
17. SØNDAHL, M.R.; MONACO, L.C. & SHARP, W.R. *In vitro* methods applied to coffee. In: Thorpe, T.A. (ed.). *Plant tissue culture: methods and applications in agriculture*. New York, Academic Press, 1981. p. 325-58.
18. THORPE, T. A. (ed.). *Plant tissue culture: methods and applications in agriculture*. New York, Academic Press, 1981. 379 p.