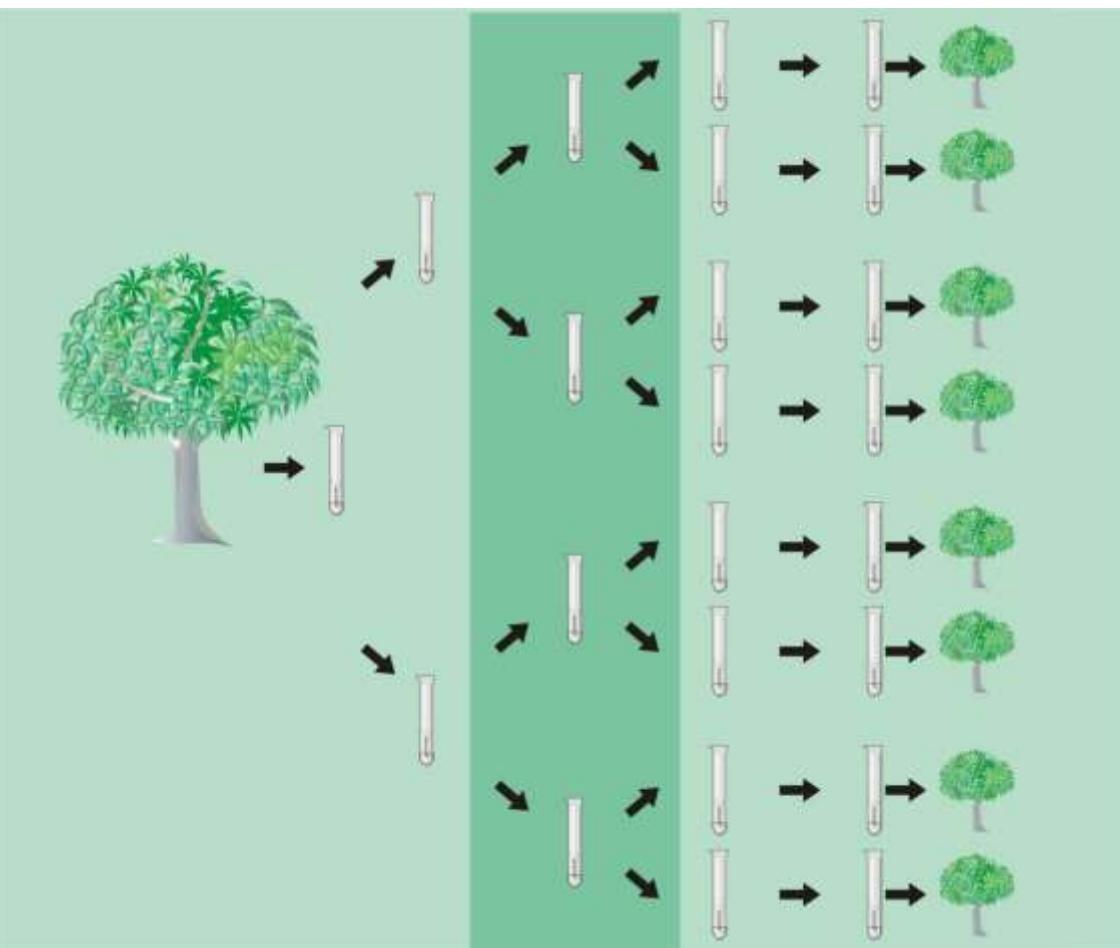


## Ensaio Preliminares para o Estabelecimento de um Protocolo de Assepsia, Visando à Micropropagação de Cultivares da Mangueira



# *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 43*

## **Ensaio Preliminares para o Estabelecimento de um Protocolo de Assepsia, Visando à Micropropagação de Cultivares de Mangueira**

Maria Cristina Rocha Cordeiro  
Luís Pedro Barrueto Cid  
Alberto Carlos de Queiroz Pinto  
Antônio Carlos Gomes  
Solange Rocha Monteiro de Andrade  
Víctor Hugo Vargas Ramos

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Cerrados**

BR 020, Km 18, Rod. Brasília/Fortaleza

Caixa Postal 08223

CEP 73301-970 Planaltina - DF

Fone: (61) 388-9898

Fax: (61) 388-9879

<http://www.cpac.embrapa.br>

[sac@cpac.embrapa.br](mailto:sac@cpac.embrapa.br)

Supervisão editorial: *Nilda Maria da Cunha Sette*

Revisão de texto: *Maria Helena Gonçalves Teixeira*

Normalização bibliográfica: *Shirley da Luz Soares*

Capa: *Chaile Cherne Soares Evangelista*

Edição eletrônica: *Leila Sandra Gomes Alencar*

Impressão e acabamento: *Divino Batista de Souza /  
Jaime Arbués Carneiro*

**1ª edição**

1ª impressão (2002): tiragem 100 exemplares

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.  
Embrapa Cerrados.

- 
- E59    Ensaios preliminares para o estabelecimento de um protocolo de assepsia, visando à micropropagação de cultivares de mangueira / Maria Cristina Rocha Cordeiro... [et al.]. – Planaltina-DF : Embrapa Cerrados, 2002.  
20 p.— (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Cerrados, ISSN 1676-918X ; 43)

1. Manga - micropropagação. 2. Explante - desinfecção.  
3. *Mangifera indica*. I. Cordeiro, Maria Cristina Rocha. II. Série.

---

634.44 - CDD 21

© Embrapa 2002

# Sumário

Resumo .....	5
Abstract .....	7
Introdução .....	9
Material e Métodos .....	10
Resultados e Discussão .....	13
Conclusões .....	18
Referências Bibliográficas .....	19

# Ensaio Preliminares para o Estabelecimento de um Protocolo de Assepsia, Visando à Micropropagação de Cultivares de Mangueira

*Maria Cristina Rocha Cordeiro<sup>1</sup>*

*Luis Pedro Barrueto Cid<sup>2</sup>*

*Alberto Carlos de Queiroz Pinto<sup>3</sup>*

*Antônio Carlos Gomes<sup>4</sup>*

*Solange Rocha Monteiro de Andrade<sup>5</sup>*

*Víctor Hugo Vargas Ramos<sup>6</sup>*

**Resumo** - Visando ao estabelecimento de um protocolo de assepsia para a micropropagação de diferentes cultivares de mangueira, foram coletadas no campo, por um período de dois anos (2000-2001), microestacas e folhas jovens e tratadas no laboratório com hipoclorito de sódio (v/v) 2% com Tween 80 a 0,025% por 15 minutos no caso de microestacas e, 0,5; 1,0; 1,5 e 2% com Tween 80 a 0,06% por 5 minutos no caso de folhas jovens. As microestacas, depois da assepsia com hipoclorito de sódio foram tratadas também com Benomyl 200mg/L por 30 minutos, ficando, em seguida, em magentas com vermiculita umedecidas em água estéril. As folhas jovens depois da assepsia foram colocadas em placas de Petri, contendo meio nutritivo básico SP com polivinilpirrolidona, Benomyl e carbenicilina. As condições de temperatura e de luz no laboratório foram  $28 \pm 2$  °C e 12 horas de fotoperíodo. As microestacas foram retiradas das variedades Alfa (Embrapa 142), Tommy Atkins e a seleção híbrida Embrapa CPAC 136-86, que mantiveram assepsia média durante os dois anos de 49, 43 e 60%

---

<sup>1</sup> Bioméd., Ph.D., Embrapa Cerrados, cristina@cpac.embrapa.br

<sup>2</sup> Biól., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>3</sup> Eng. Agrôn., Ph.D., Embrapa Cerrados, alcapi@cpac.embrapa.br

<sup>4</sup> Mat. Bioest., D.Sc., Embrapa Cerrados, acarlos@cpac.embrapa.br

<sup>5</sup> Biól., Ph.D., Embrapa Cerrados, solange@cpac.embrapa.br

<sup>6</sup> Eng. Agrôn., Ph.D., Embrapa Cerrados, vhugo@cpac.embrapa.br

respectivamente. Também foram avaliados os brotos emitidos periodicamente por elas, constatando-se que a maior frequência de brotação foi a da cultivar Alfa (53%) seguida por Tommy Atkins (24%). Houve efeito sazonal na indução desses brotos e que janeiro e abril de 2000, os meses em que se obteve a maior quantidade de brotos de tamanho grande. No estudo em que foram utilizadas folhas jovens, as seleções híbridas estudadas foram Embrapa CPAC 136-86 e Embrapa CPAC 2-97. Os valores médios de assepsia obtidos no período de fevereiro de 2001 foram 100% e 70% respectivamente. Ocorreu oxidação fenólica em todos os genótipos estudados, sendo esta influenciada pela concentração de hipoclorito que foi maior na seleção híbrida Embrapa CPAC 136-86. A concentração de 0,5% foi aquela em que se observou o menor número de oxidação fenólica nos explantes da seleção híbrida Embrapa CPAC 2-97 apesar de ter ocorrido maior contaminação.

Termos para indexação: *Mangifera indica*, L., micropropagação, explante, assepsia.

# Preliminary Assay to Establish an Assepsy Protocol in Order to Micropropagate Mango Cultivars

---

**Abstract** - *In order to establish an assepsy protocol to micropropagate different cultivars of mango it was collected in the field during two years (2000-2001) microshootings and young leaves and, in the laboratory, they were treated with 2% sodium hypochlorite with 0.025% Tween 80 for 15 minutes in the case of microshootings and, 0,5; 1; 1,5 and 2% with 0.06% Tween 80 for 5 minutes in the case of young leaves. The microshootings after assepsy with sodium hypochlorite were treated in a 200 mg/l Benomyl solution for 30 minutes and after that were put into magenta vessels containing wet vermiculite. The young leaves after assepsy were transferred in Petri dishes containing SP medium with polyvinilpirrolidone, Benomyl and carbenicillin. The temperature and photoperiod conditions in the laboratory were  $28 \pm 2$  °C and 12 h. In the microshooting study, the evaluated varieties were Alfa (Embrapa 142), Tommy Atkins and hybrid Embrapa CPAC 136-86. They revealed a media assepsy in these two years of 49, 43 and 60 % respectively. The periodical emergency of buds were also evaluated in the microshootings and it was observed that a higher frequency of appearance was in the Alfa cultivar (53%) followed by Tommy Atkins (24%). In microshootings, the sazonal effect influenced the budding induction and, January and April of 2000 was the season in wich we observed more budding with large size. In the case of young leaves, the studied genotypes were Embrapa CPAC 136-86 and Embrapa CPAC 2-97. The media values of assepsy in February of 2001 period were 100 e 70 % respectively. It was observed the production of phenolic oxidative process caused by hypochlorite concentration occurring differently among studied genotypes. The most influenced one was Embrapa CPAC 136-86. Sodium hypochlorite in 0,5% concentration demonstrated less tissue damage provided by oxidation although a higher contamination.*

*Index terms: Mangifera indica, L., micropropagation, explant, assepsy.*

## Introdução

A mangueira (*Mangifera indica*, L.) atualmente faz parte de um dos mais importantes agronegócios de frutas cultivadas no Brasil. A manga é cultivada nos Estados de São Paulo, Bahia, Ceará, Rio Grande do Norte e Pernambuco. Porém, a região produtora mais importante é o Vale do São Francisco no Estado de Pernambuco. Cerca de 94 mil toneladas de mangas produzidas nessa região foram exportadas para os Estados Unidos da América e para a Europa em 2001, resultando em divisas de U\$50 milhões para o Brasil ([Manga..., 2002](#)).

A produção e a exportação da manga nessa região poderá ser maior se alguns problemas como susceptibilidade a patógenos, desordem fisiológica do tipo amolecimento da polpa ou a baixa qualidade dos frutos quanto ao sabor, cor, odor, e quantidade de fibras forem superados. A variedade Tommy Atkins é a mais cultivada atualmente, porém, apresenta susceptibilidade a doenças como a antracnose e a malformação floral, bem como ao amolecimento da polpa. Além disso, seu sabor não é bem aceito pelo consumidor.

Com os objetivos de introduzir, adaptar e melhorar a mangueira na região do Brasil Central (Cerrado), um programa de melhoramento genético foi iniciado na Embrapa Cerrados ao longo de 1980 ([Pinto, 2001](#)). Considerando que a cultura de tecidos da mangueira constitui ferramenta auxiliar que permite a micropropagação das cultivares melhoradas ou, ainda, a superação das dificuldades atribuídas ao baixo resgate dos frutos no cruzamento, é fundamental o desenvolvimento de metodologias apropriadas para o estabelecimento dos explantes in vitro, isto é, garantir uma razoável assepsia desses explantes, a fim de que os trabalhos de melhoramento tenham boa complementaridade nessa área. Alguns trabalhos de cultura de tecidos da mangueira já são conhecidos, como os descritos por [Litz et al. \(1982\)](#); [Litz \(1984\)](#); [DeWald et al. \(1989a e b\)](#); [Raghuvanshi & Srivastava \(1985\)](#); [Thomas & Ravindra \(1997\)](#) e [Ara et al. \(2000\)](#). Em todos esses trabalhos, os autores descrevem problemas relacionados à assepsia dos explantes e também à produção de oxidação decorrente de compostos fenólicos do tecido. Porém, esses trabalhos não são conclusivos, portanto, ainda não recomendam um protocolo para a descontaminação de explantes coletados

diretamente no campo. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de assepsia para a micropropagação de diferentes variedades de mangueira, com o uso do hipoclorito de sódio como agente desinfetante e germinicida ([Collins & Edwards, 1998](#)) em explantes coletados de diferentes variedades diretamente no campo.

## Material e Métodos

**Material vegetal.** As variedades de mangueira para coleta dos explantes foram: Alfa -Embrapa 142; Tommy Atkins e as seleções híbridas Embrapa CPAC 136-86 e Embrapa CPAC 2-97. As plantas-matriz têm cerca de 14 anos e estão plantadas na Área Experimental de Fruticultura da Embrapa Cerrados.

**Condições Experimentais.** O solo da área experimental da Embrapa Cerrados é um Latossolo Vermelho-Amarelo, corrigido com calcário e fertilizado. A Embrapa Cerrados está situada em Planaltina - DF sob latitude 17° 35' 3" S e longitude 47° 42' 30" O, a 1100 m de altitude. O clima apresenta duas estações bem definidas: uma estação quente e úmida com temperatura variando de 25 °C a 30 °C e 1400 a 1800 mm de precipitação pluviométrica/ano total (setembro a abril) e, outra seca, com temperatura que varia de 20 °C a 23 °C e 40% de umidade relativa média (maio a agosto) ([Tabela 1](#)).

No laboratório, as condições padronizadas de incubação do material vegetal (explantes) foram:  $28 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 12 horas e irradiância de 40 a 50  $\mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fornecidas por lâmpadas fluorescentes frias. A manipulação dos explantes do tipo microestacas como também as folhas jovens foram realizadas em câmara de fluxo laminar e todo o material em contato com os explantes foi esterilizado por autoclavação (121 °C, 1 atm, 20 minutos) previamente.

**Tabela 1.** Dados Climáticos da Estação Meteorológica da Embrapa Cerrados em 2000 e 2001 (valores médios mensais\*)

Ano/Mês	Temperatura (°C)		Umidade Relativa (%)		Precipitação Pluviométrica (mm)		Irradiação Solar (cal/cm <sup>2</sup> /dia)		Brilho Solar (h)	
	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001
Janeiro	22,2	22,2	80	80	2,9	2,9	510,67	510,67	7,0	7,0
Fevereiro	21,9	22,6	87	75	6,7	1,4	468,38	491,45	5,8	8,1
Março	21,8	21,6	88	81	7,2	6,6	436,76	391,91	6,0	4,7
Abril	21,8	22,3	81	64	2,2	2,3	441,97	469,78	8,2	8,7
Mai	20,6	21,4	70	64	0,0	0,4	454,25	464,50	9,5	7,9
Junho	19,6	20,5	64	55	0,0	0,0	431,25	412,76	9,1	8,0
Julho	19,6	20,7	63	49	0,1	0,0	428,06	417,55	9,2	8,9
Agosto	21,7	20,6	52	47	1,3	1,1	456,62	453,01	9,0	9,3
Setembro	22,0	23,0	67	51	1,8	1,7	454,87	457,68	7,0	6,1
Outubro	23,7	22,0	60	68	2,7	2,5	522,97	407,05	7,8	4,9
Novembro	21,1	21,7	89	80	8,8	7,8	395,20	408,96	4,1	4,5
Dezembro	21,8	21,9	89	78	7,6	8,0	453,10	421,94	4,2	4,3

\*Boletim de Informações Agrometeorológicas Mensais, SAL, Embrapa Cerrados.

**Assepsia das microestacas.** Foram utilizadas hastes de 20 a 30 cm de comprimento e aproximadamente 0,5 cm de diâmetro das variedades Alfa, Tommy Atkins e a seleção híbrida Embrapa CPAC 136-86, coletadas mensalmente de janeiro a outubro em 2000 e 2001. No laboratório, as hastes trazidas do campo foram cortadas em tamanhos menores de 6 cm sendo o ápice eliminado. As microestacas foram lavadas com detergente em água abundante e, em seguida, tratadas com hipoclorito de sódio a 2% e Tween 80 a 0,025% por 15 minutos sob agitação. Depois desse tratamento, as microestacas foram lavadas três vezes com água destilada estéril e, por fim, colocadas numa suspensão de Benomyl a 200 mg/L por 30 minutos também sob agitação. Ao término do tratamento com Benomyl, as hastes foram colocadas na posição vertical em magentas estéreis inseridas em vermiculita umedecidas em água. Antes de serem colocadas nas magentas, a parte superior das hastes foi tratada com Benomyl autoclavado em pasta. As magentas foram então fechadas com filme plástico do tipo "zap". Cada experimento mensal de assepsia foi realizado com os três genótipos (duas variedades e uma seleção híbrida), dois tratamentos seguidos de descontaminação, com hipoclorito de sódio e Benomyl e, de cada genótipo estudado, foram colocadas três microestacas por recipiente do tipo magenta em um total de dez repetições exceto nos meses de janeiro e fevereiro de 2000 em que foram feitas três repetições. As avaliações da contaminação, bem como da presença de brotos em tamanhos variados foram feitas para cada magenta aos 7, 14, 21 e 28 dias depois do tratamento de descontaminação com hipoclorito de sódio e Benomyl.

**Assepsia dos explantes foliares.** Folhas jovens foram coletadas das seleções híbridas Embrapa CPAC 136-86 e Embrapa CPAC 2-97 nos meses de fevereiro e setembro de 2001 e imediatamente transportadas para o laboratório. Em seguida, elas foram lavadas com detergente em água abundante e cortadas em pedaços de 2,5 x 2,5 cm sob água destilada. Os explantes (pedaços de folhas) foram colocados em diferentes soluções de hipoclorito de sódio a 0,5; 1; 1,5 e 2% contendo, cada uma, Tween 80 a 0,06% por cinco minutos. Depois desse período, os explantes foram lavados cinco vezes em água destilada estéril e colocados em placas de Petri contendo meio de cultura SP ([Barrueto Cid. et al., 1999](#)) suplementados com Carbecilina a 200 mg/L; Benomyl 200 mg/L; Polivinilpirrolidona (PVP) 1,0 g/L; ácido naftaleno acético 5 µm, Benzilaminopurina 7,5 µm e vitaminas (em mg/L: Pantotenato de Cálcio (1); Piridoxina (1); Ácido Nicotínico (1) e Tiamina (10)). Vitaminas e antibiótico foram esterilizados via membrana Millipore 0,2 µm e depois adicionados ao

meio já autoclavado. Os explantes foram adicionados em placas de Petri contendo o meio nutritivo e, estas foram seladas com filme plástico ("zap") e incubadas sob condições padronizadas de temperatura e luz já descritas. Cada experimento resultou em cinco explantes (pedaços de folhas) obtidos de cada tratamento (quatro concentrações diferentes de hipoclorito de sódio) adicionados em placa de Petri em 5 ou 10 repetições por tratamento. Os explantes foram avaliados aos 7, 14, 21 e 28 dias quanto à contaminação e à oxidação fenólica depois realizados os tratamentos de descontaminação.

**Análise estatística.** Os dois experimentos de assepsia foram analisados estatisticamente utilizando o programa SAS (versão 8.0) em delineamento completamente casualizado em esquema fatorial. O experimento relativo à assepsia das microestacas foi analisado em esquema fatorial contendo três genótipos, avaliados em 10 meses nos dois anos agrícolas e dez repetições. No experimento de assepsia foliar, utilizou-se o esquema fatorial com duas seleções híbridas em quatro concentrações de hipoclorito de sódio, dois meses e cinco ou dez repetições. Os valores médios obtidos para as combinações dos tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de significância ou 1% de acordo com os resultados obtidos para o teste F na análise de variância. Para essa análise, os dados de contagens foram transformados em  $y = (x + 0,5)^{0,5}$ .

## Resultados e Discussão

**Assepsia das Microestacas.** A assepsia das microestacas teve valores que variaram de 43% a 60% durante todo o período analisado, inclusive, mostrando viabilidade do material de até 30 dias. Parte dessa diferença foi devida, provavelmente, a questões de natureza genética entre as variedades estudadas. A variedade Tommy Atkins foi aquela mais susceptível à contaminação durante todo o período (57%) seguida de Alfa (51%) e a seleção híbrida Embrapa CPAC 136-86 (40%).

Na maioria das microestacas, foram observados o desenvolvimento de uma necrose descendente depois de sete dias e a perda da cor verde com aparecimento de cor marrom da estaca na região superior. Depois disso, freqüentemente, a contaminação fúngica aparecia no local. Para reduzir essa tendência, colocou-se a pasta de Benomyl nessa extremidade das estacas. Esse procedimento retardou o aparecimento da contaminação por alguns dias e não se constatou a presença de fungo enquanto o tecido permanecia verde. As

observações feitas sugerem que se trata de uma contaminação endógena do material. A contaminação fúngica, em explantes, endógena ou não já foi reportada na literatura referente à manga e a outras culturas ([Redlin & Carris, 1997](#); [Thomas & Ravindra, 1997](#)). É importante, em trabalhos futuros, identificar os tipos de patógenos para mais informações sobre a assepsia desse material. Uma sugestão para esses trabalhos é o prévio tratamento dos ramos no campo, com agentes fungicidas antes de seu recolhimento para o trabalho em laboratório.

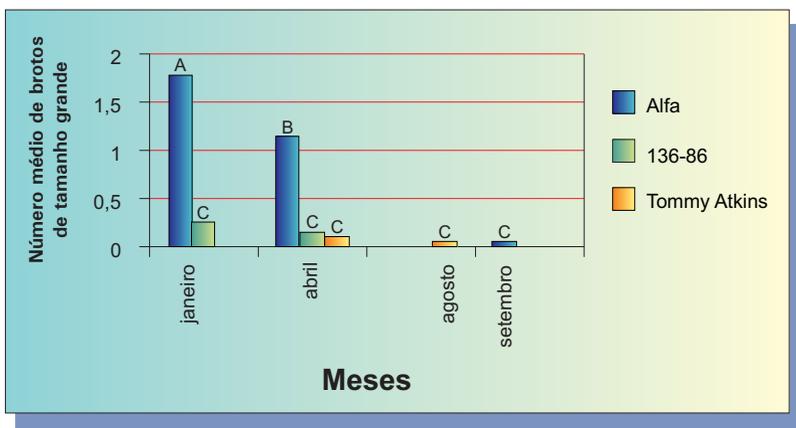
O sistema de microestacas em magentas foi adotado para utilizá-lo como fonte de explantes (brotos) já que explantes colhidos diretamente do campo estão bastante contaminados e dificultam muito os trabalhos de micropropagação, limitando, sobremaneira, a utilização da cultura de tecidos nos programas de melhoramento. Nesse sistema, além da possibilidade de utilização das gemas axilares, pode-se do mesmo modo utilizar as folhas jovens que aparecem nos brotos.

Os brotos emitidos nas microestacas têm diferentes tamanhos: pequeno (até 0,2 cm), médio (0,2 a 0,8 cm) e grande (0,8 a 1,5 cm) (Figura 1). De modo geral, observou-se que os brotamentos foram mais frequentes em 2000 do que em 2001. A variedade Alfa foi a que teve maior capacidade de brotamento (53%), seguida por Tommy Atkins (24%) e, por último, a seleção híbrida Embrapa CPAC 136-86 (22%).



**Figura 1.** Magenta com vermiculita úmida, contendo microestacas. As setas indicam os diferentes tamanhos de brotos. Na parte superior da microestaca, observa-se a aplicação de Benomyl na forma de pasta.

Nas microestacas da variedade Alfa, observou-se o maior número de brotos de tamanho grande podendo fornecer maior quantidade de explantes para o cultivo in vitro. Os maiores valores médios de brotos de tamanho grande na variedade Alfa foram observadas nos meses de janeiro e abril de 2000 (Figura 2).



**Figura 2.** Comparação do número médio de brotos de tamanho grande entre diferentes variedades de mangueira em 2000. As médias com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 1%. CV = 10,74%; F = 10,7.

Assepsia dos explantes foliares. Na assepsia foliar, realizada no mês de fevereiro de 2001, observou-se que o tratamento com hipoclorito de sódio a 0,5% contendo Tween 80 a 0,06% na seleção híbrida embrapa CPAC 2-97 apresentou o maior número médio de explantes contaminados em relação à seleção híbrida Embrapa CPAC 136-86 ([Tabela 2](#)). Os valores médios de contaminação entre os demais tratamentos e seleções não diferiram estatisticamente na comparação de médias. O valor alto para número médio de explantes contaminados na seleção híbrida Embrapa 2-97, tratada com hipoclorito de sódio, na concentração de 0,5% ocorreu durante a primeira semana de avaliação ([Tabela 3](#)). A contaminação observada nesses explantes foliares foi sempre do tipo fúngica e, percentualmente, equivale a 28% dos explantes.

**Tabela 2.** Efeito de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio sobre a descontaminação e a oxidação de explantes foliares entre as diferentes seleções híbridas (Embrapa CPAC 2-97 e Embrapa CPAC 136-86) em fevereiro de 2001.

	Número médio de explantes							
	Contaminados(*)				Oxidados(**)			
	Concentração de Hipoclorito de Sódio							
Variedades	0,5	1,0	1,5	2,0	0,5	1,0	1,5	2,0
Seleção Híbrida								
Embrapa CPAC 136-86	0 Ab	0 Aa	0,25 Aa	0 Aa	3,8 Aa	3,8 Aa	2,4 Aa	5,0 Aa
Seleção Híbrida								
Embrapa CPAC 2-97	0,35 Aa	0,2 Aa	0 Aa	0 Aa	1,4 Bb	3,0 Aa	4,6 Aa	3,5 Aa

As comparações de média para as análises de contaminação e oxidação foram feitas pelo Teste de Tukey. As letras maiúsculas nas linhas representam a comparação das concentrações de hipoclorito dentro de cada variedade e, as letras minúsculas nas colunas representam a comparação entre as variedades dentro de cada concentração de hipoclorito). CV = 26,55%; F = 3,12.

(\*) Na análise de contaminação, os valores foram significativos a 5% de probabilidade.

(\*\*) Na análise de oxidação, os valores foram significativos a 1% de probabilidade. CV = 20%; F = 5,78.

**Tabela 3.** Efeito de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio sobre a descontaminação de explantes foliares nas variedades Embrapa CPAC 2-97 e Embrapa CPAC 136-86 depois da primeira semana de tratamento, no mês de fevereiro de 2001.

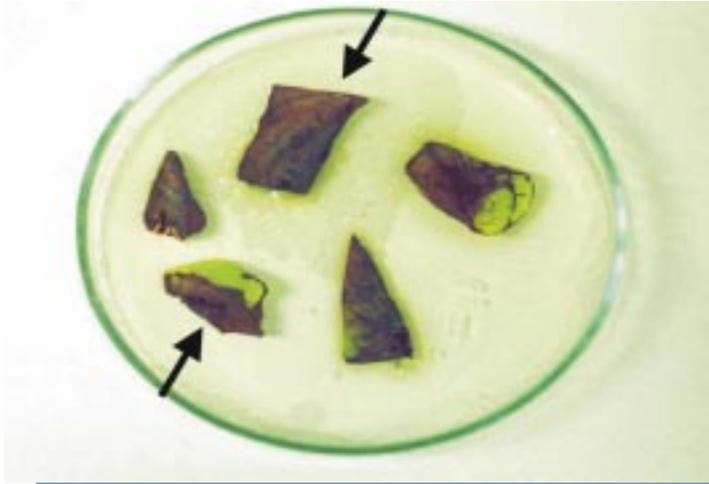
	Número médio de explantes contaminados(*)			
	Concentração de Hipoclorito de Sódio			
Variedades	0,5	1,0	1,5	2,0
Seleção Híbrida				
Embrapa CPAC 136-86	0 Ab	0 Aa	0,2 Aa	0 Aa
Seleção Híbrida				
Embrapa CPAC 2-97	1,4 Aa	0, Ba	0 Ba	0 Ba

(\*) A comparação de médias para essa análise de contaminação foi feita pelo Teste de Tukey. Os valores foram significativos a 1% de probabilidade. As letras maiúsculas nas linhas representam a comparação do efeito das concentrações de hipoclorito dentro de cada variedade e as letras minúsculas nas colunas representam a comparação das variedades dentro de cada dose de hipoclorito. CV = 22,54%; F = 8,16.

Por sua vez, a solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, no caso do teste na seleção híbrida Embrapa CPAC 2-97, foi a concentração em que apresentou menor número médio de explantes oxidados além de diferir estatisticamente quando comparada à seleção híbrida Embrapa CPAC 136-86 nessa mesma concentração (hipoclorito de sódio 0,5%) (Tabela 2). Assim, verificou-se que a seleção híbrida Embrapa CPAC 136-86 foi mais susceptível à oxidação quando tratada com hipoclorito a 0,5% do que a seleção híbrida Embrapa CPAC 2-97 (Tabela 2). Com base nesses resultados, sugere-se que há diferenças genéticas de susceptibilidade no processo de oxidação dos explantes. Apesar de a seleção híbrida Embrapa CPAC 136-86 ter mais susceptibilidade à oxidação fenólica também é aquela que apresenta menos contaminação fúngica (Tabela 2). Pelo menos no tratamento com hipoclorito de sódio na concentração de 0,5% contendo Tween 80 a 0,06%.

Durante o mês de setembro, as análises de contaminação e de oxidação não diferiram estatisticamente no teste de médias.

Os valores registrados relativos ao número médio de explantes foliares, contaminados e oxidados, representam perda de material e de esforço no trabalho. Porém, ainda foram obtidos explantes saudáveis. Esse fato é importante para dar prosseguimento a essa linha de pesquisa. Inicialmente, em trabalhos preliminares de descontaminação, testou-se, como testemunha, a lavagem dos explantes somente com detergente e água destilada estéril. Nessas condições, o tecido foliar contaminou 100% em 24 horas. Também, em etapas preliminares, foram utilizadas folhas adultas, mas essa estratégia teve de ser alterada devido à alta carga de contaminação que continham. As folhas novas, além de possuir menor carga de contaminação têm a vantagem de, após a primeira semana, mudar de cor, passando de marrom a verde, sendo um indicador de viabilidade do material. O procedimento de assepsia, adotado, também esteve fortemente associado à oxidação do material foliar (Figura 3), apesar da inclusão de PVP no meio de cultura, bem como do uso de um meio nutritivo diluído em sais minerais, especialmente, no elemento ferro. Em trabalhos futuros será necessário avaliar, com mais detalhes, também a ação da presença de outros tipos de antibióticos e outros fatores antioxidantes no meio de cultura.



**Figura 3.** Explantes foliares tratados com hipoclorito de sódio a 1% e Tween 80 a 0,06% depois de 21 dias de tratamento. As setas indicam oxidação parcial e total dos explantes.

## Conclusões

1. A seleção híbrida Embrapa CPAC 136-86 é a que apresenta menor contaminação em microestacas, seguida de Alfa e Tommy Atkins.
2. A variedade Alfa apresenta a maior capacidade de emitir brotos no sistema de magenta, podendo esse fato, ser vantajoso para a cultura *in vitro*.
3. Os brotos emitidos nas microestacas variam de forma sazonal.
4. A assepsia das folhas jovens também é mais eficiente na seleção híbrida Embrapa CPAC 136-86 apesar de essa ser mais susceptível à oxidação fenólica quando se compara à seleção híbrida Embrapa CPAC 2-97.
5. Tratamento com hipoclorito de sódio na concentração de 0,5% com 0,06% de Tween 80 em folhas jovens é a que produz menos oxidação fenólica apesar da maior contaminação, encontrada quase que exclusivamente na primeira semana.

6. Embora haja, dificuldade para descontaminar explantes de mangueira vindos diretamente do campo obtêm-se, neste primeiro estudo, explantes descontaminados.
7. A estratégia de descontaminação de microestacas em magentas permite a coleta de explantes descontaminados, sendo necessários, entretanto, alguns ajustes para a produção de brotos, como por exemplo a indução com reguladores de crescimento.

## Referências Bibliográficas

ARA, H.; JAISWAL, U.; JAISWAL, V. S. Plant regeneration from protoplasts of mango (*Mangifera indica*, L.) through somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, New York, v. 19, p. 622-627, 2000.

BARRUETO CID, L. P.; GOMES, A. C. M.; MACHADO; CARVALHEIRA, S. B. R. C.; BRASILEIRO, A. C. M. Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* X *Europhylla*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 56, 1999, 17-23.

COLLINS, H. A.; EDWARDS, S. **Plant cell culture**. New York: Springer-Verlag, 1998. p. 28-29

DE WALD, S. G.; LITZ, R. E.; MOORE, G. A. Optimizing somatic embryo production in mango. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 114, n. 4, p. 712-716, 1989a.

DE WALD, S.G.; LITZ, R. E.; MOORE, G. A. Maturation and germination of mango somatic embryos. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 114, n. 5, p. 837-841, 1989b.

LITZ, R. E. *In vitro* Somatic embryogenesis from nucellar callus of monoembryonic mango. *HortScience*, Alexandria, v. 19, n. 5, p. 715-717, 1984.

LITZ, R. E.; KNIGHT, R. L.; GAZIT, S. Somatic embryos from cultured ovules of polyembryonic *Mangifera indica*, L. **Plant Cell Reports**, New York, v. 1, p. 264-266, 1982.

MANGA nacional pode chegar ao Japão. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2002. p. 8 (Embrapa Agroindústria Tropical. Boletim Informativo, 87).

PINTO, A. C. O. A hibridação intervarietal em manga (*Mangifera indica* L.): técnicas usadas, principais resultados e suas limitações". **Revista Brasileira Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 23, n. 1, p. 200-202, 2001.

RAGHUVANSHI, S. S.; SRIVASTAVA, A. Plant regeneration of *Mangifera indica* using liquid shaker culture to reduce phenolic exudation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 41, p. 83-85, 1985.

REDLIN, S. C.; CARRIS, L. M. (Ed.). Endophytic fungi in grasses and woody plants: systematic, ecology, and evolution. St Paul: APS Press, 1997. 231 p.

THOMAS, P.; RAVINDRA, M. B. Shoot tip culture in mango: influence of medium, genotype, explant factors, season and decontamination treatments on phenolic exudation, explant survival and axenic culture establishment. **Journal of Horticultural Science**, Ashford Kent, v. 72, n. 5, p. 713-722, 1997.