

AValiação de Protocolos para Descontaminação de Explantes de Manga (*Mangifera indica* L.)

Solange Rocha Monteiro de Andrade¹, Alberto Carlos de Queiroz Pinto¹, Heyder Diniz Silva²;
Maria Cristina Rocha Cordeiro¹, Victor Hugo Vargas Ramos¹; João Batista Teixeira³

¹Embrapa Cerrados, CX. Postal 08223, CEP 73301-970 Planaltina, DF, solange@cpac.embrapa.br

²UFU - Universidade Federal de Uberlândia

³Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

INTRODUÇÃO

A descontaminação dos explantes é um ponto fundamental para a micropropagação. Os microorganismos, se não forem eliminados, competem pelos nutrientes do meio de cultura alterando o desenvolvimento normal da material a ser propagado. No entanto, embora seja uma fase primordial para o estabelecimento da cultura de tecidos, existem poucos trabalhos publicados a respeito de descontaminação de explantes (Oliveira et al., 2000; Vianna et al., 1997; Saheli & Khosh-Khui, 1997; Thomas & Ravindra, 1997).

A descontaminação consiste em eliminar os microorganismos, porém preservando o material vegetal a ser regenerado. Os explantes vegetais não podem ser submetidos ao calor extremo pois este afeta diversas atividades biológicas comprometendo a regeneração do material. Assim, órgãos e tecidos normalmente são esterilizados com substâncias como etanol e compostos a base de cloro, e, dependendo da origem do material, utiliza-se fungicidas e antibióticos. Etanol é utilizado nas concentrações de 70 a 80 % (v/v), pois acima destas concentrações a eficiência é reduzida e o tecido pode ser desidratado. Hipoclorito

de sódio e de cálcio são os compostos a base de cloro mais empregados na desinfestação de explantes em concentrações que variam de 0,5 a 2% de cloro ativo. No entanto, alguns pesquisadores utilizam cloreto de mercúrio, ácido clorídrico, cloreto de benzalcônio ou peróxido de hidrogênio. Usualmente detergentes são adicionados às soluções a base de cloro, sendo o Tween o mais comum nas concentrações de 0,01% a 0,05%, contudo detergentes neutros podem ser utilizados como substitutos (Grattapaglia & Machado, 1998).

No ano de 2000, iniciaram-se os primeiros trabalhos para estabelecimento de protocolos de cultura de tecidos de manga na Embrapa Cerrados. Os esforços se concentraram, a princípio, no desenvolvimento de métodos de descontaminação dos de estacas e folhas de mangueira provenientes do campo (Cordeiro et al., 2002). O objetivo deste trabalho foi ajustar um protocolo de descontaminação em de estacas de manga para a introdução em cultura de tecidos, visando o estabelecimento de métodos de micropropagação de gemas laterais.

MATERIAIS E MÉTODOS

O material vegetal utilizado foram estacas de manga (*Mangifera indica* L.), cultivar Alfa, coletadas de brotos recentes de matrizes de 5 anos de idade, provenientes do campo experimental da Embrapa Cerrados. As estacas eram submetidas aos tratamentos e separadas em vidros individuais contendo meio MS 3% e 1% PVP, cada vidro constituiu uma repetição e cada tratamento tinha 10 repetições, num total de 4 experimentos. O primeiro experimento avaliou o uso de hipoclorito de sódio, etanol e Tween. O segundo avaliou o tempo de exposição ao hipoclorito e testou diferentes concentrações do mesmo. O terceiro experimento avaliou o tempo de exposição à solução de benlate e cloranfenicol, bem com o efeito da sonicação. O quarto experimento foi uma repetição do terceiro. Os tratamentos foram avaliados a cada 2/3 dias para identificar a presença de contaminação, e os resultados foram expressos em porcentagem de contaminação.

RESULTADOS

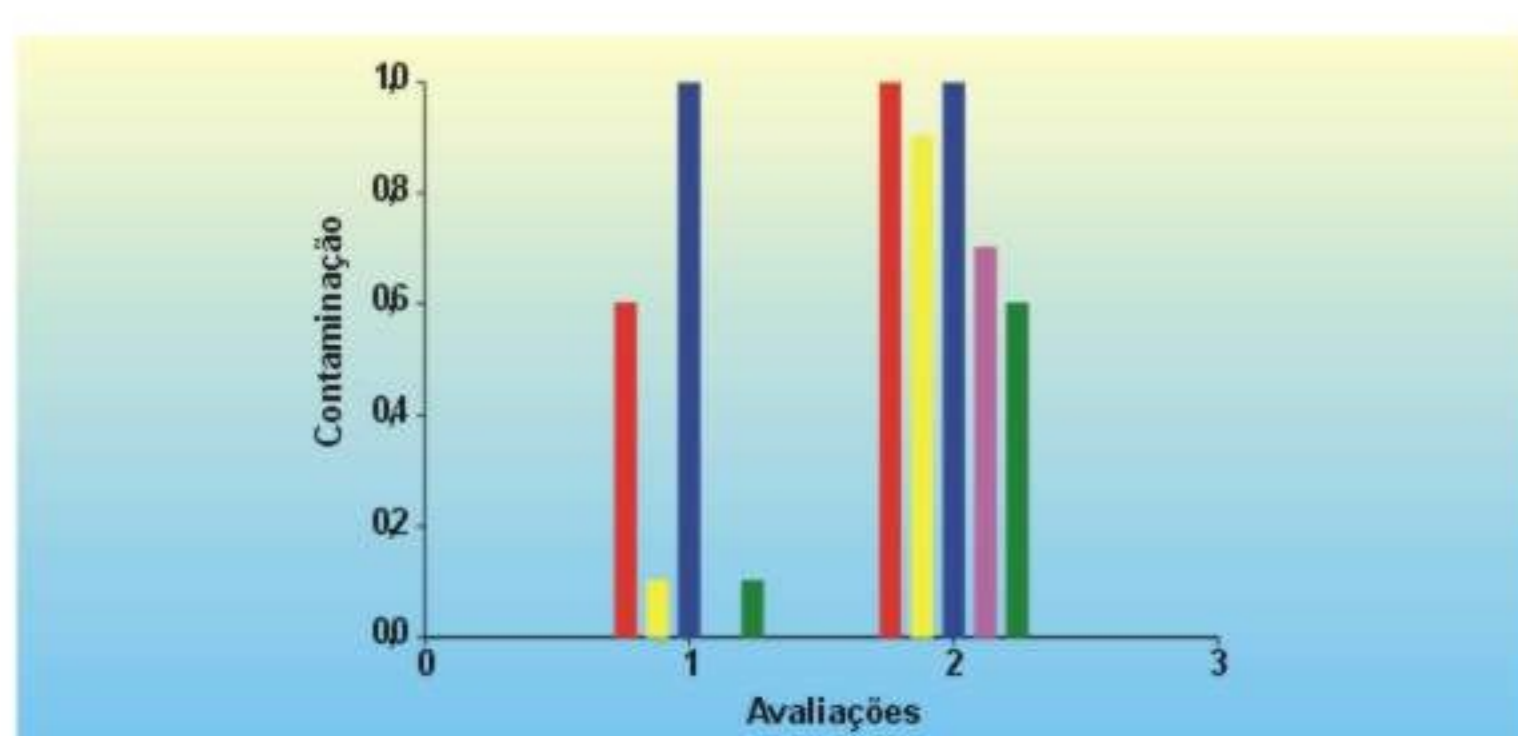


Gráfico 1 - Efeito dos tratamentos na descontaminação de explantes de manga. Tratamentos: (1) (■) 5 minutos em etanol 70%, seguido de 15 minutos em hipoclorito de sódio 1%; (2) (□) Idem 1, seguido incubar 1 minuto em solução de 500 mg.L⁻¹ de benlate e 500 mg.L⁻¹ de cloranfenicol a 45°C; (3) (▲) Incubar 1 minuto em solução de 500 mg.L⁻¹ de benlate e 500 mg.L⁻¹ de cloranfenicol a 45°C; (4) (●) 5 minutos em etanol 70%, seguido de 15 minutos em hipoclorito de sódio 1% com 2 gotas de Tween 80 para cada 100 ml de solução; (5) (■) Idem 4, em seguida incubar 1 minuto em solução de 500 mg.L⁻¹ de benlate e 500 mg.L⁻¹ de cloranfenicol a 45°C.

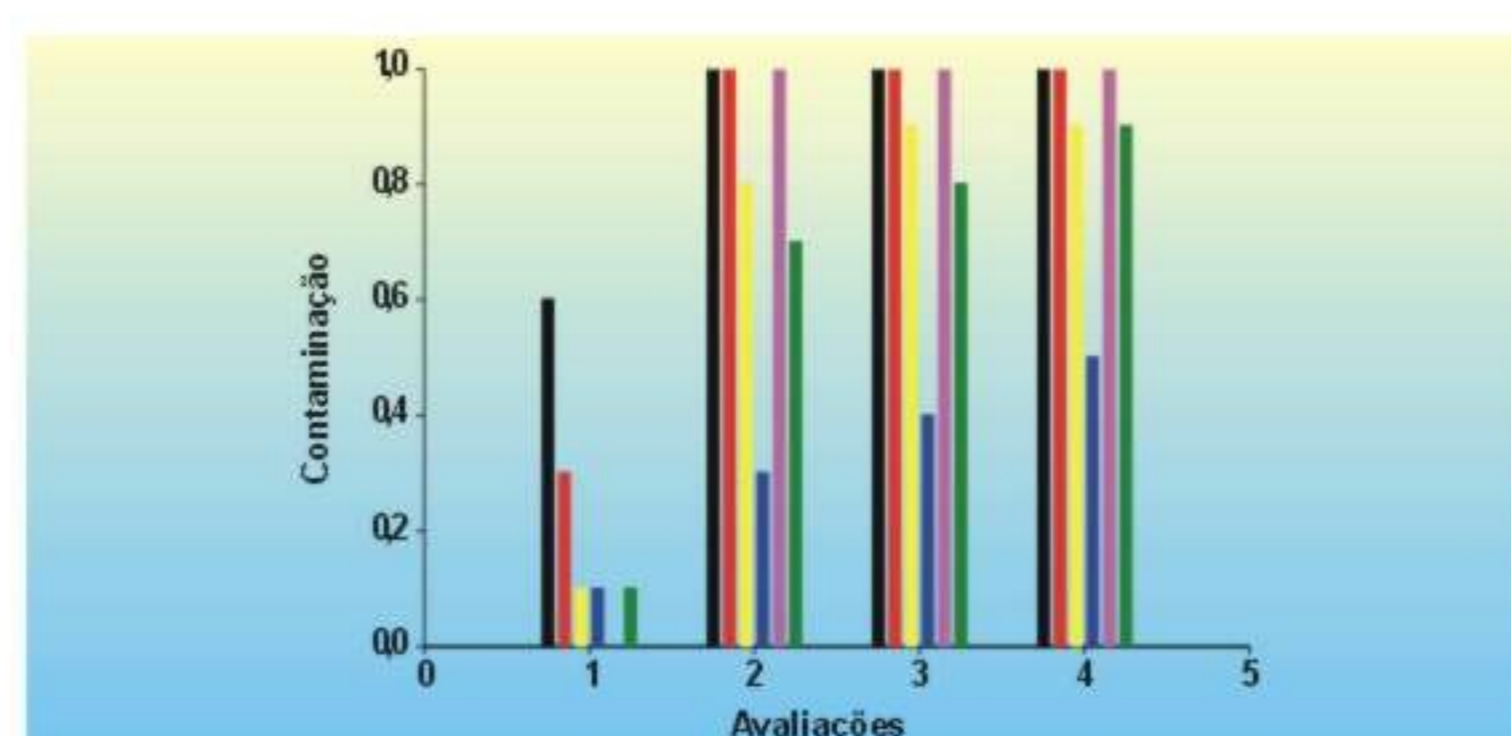


Gráfico 2 - Efeito dos tratamentos na descontaminação de explantes de manga. Tratamentos: (1) (■) 5 minutos em etanol 70%, seguido de 15 minutos em hipoclorito de sódio 1% com 2 gotas de Tween 80 para cada 100 ml de solução; (2) (□) Idem 1, sonicar o material na solução de hipoclorito e incubar por 15 minutos.; (3) (▲) 5 minutos em etanol 70%, seguido de 30 minutos em hipoclorito de sódio 1% com 2 gotas de Tween 80 para cada 100 ml de solução; (4) (●) Idem 1, em seguida incubar 1 minuto em solução de 500 mg.L⁻¹ de benlate e 500 mg.L⁻¹ de cloranfenicol a 45°C; (5) (■) 5 minutos em etanol 70%, seguido de 15 minutos em hipoclorito de sódio 2,5% com 2 gotas de Tween 80 para cada 100 ml de solução; (6) (□) 5 minutos em etanol 70%, seguido de 15 minutos em hipoclorito de sódio 5% com 2 gotas de Tween 80 para cada 100 ml de solução.

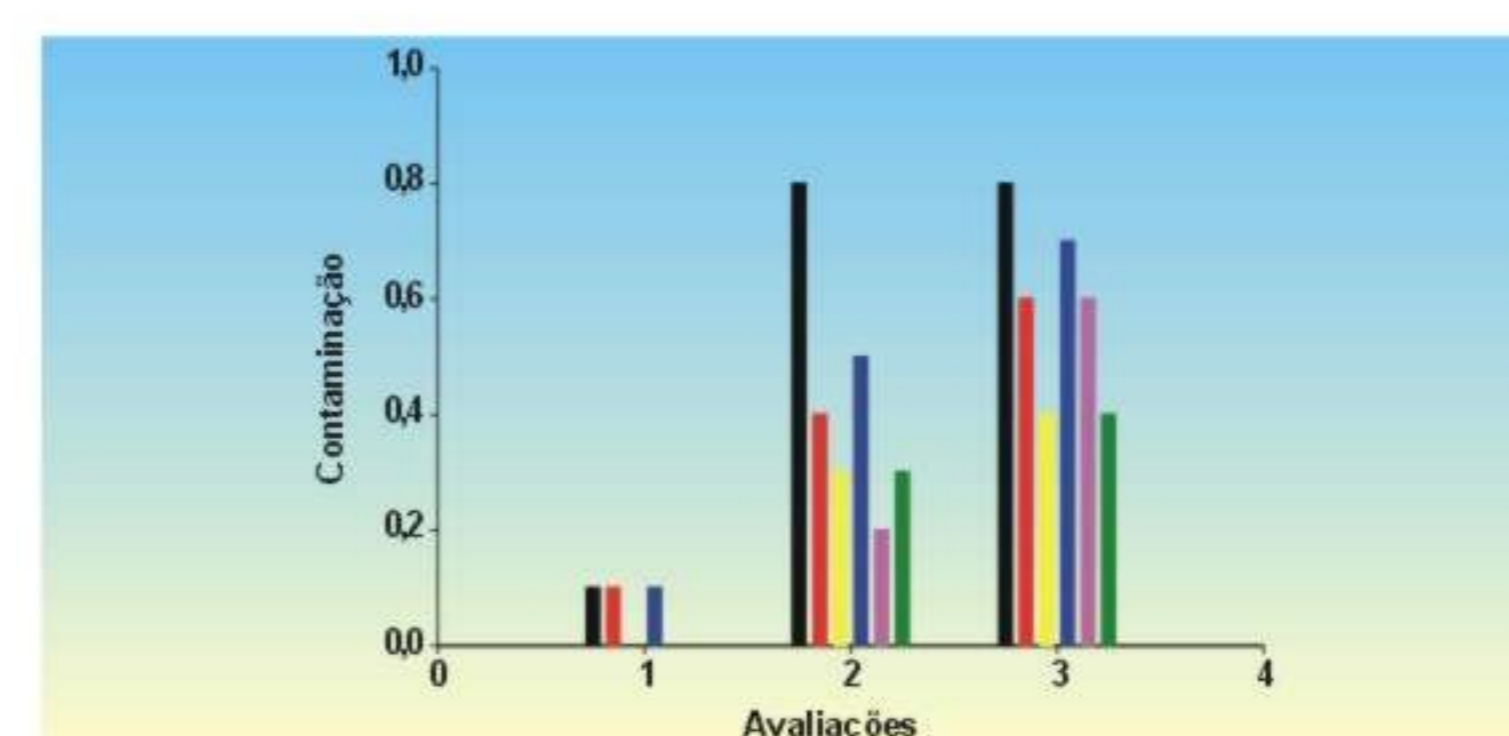


Gráfico 3 - Efeito dos tratamentos na descontaminação de explantes de manga. Tratamentos: (1) (■) 5 minutos em etanol 70%, seguido de 15 minutos em hipoclorito de sódio 1% com 2 gotas de Tween 80 para cada 100 ml de solução, em seguida incubar 1 minuto em solução de 500 mg.L⁻¹ de benlate e 500 mg.L⁻¹ de cloranfenicol a 45°C; (2) (□) Idem1, no entanto incubar a temperatura ambiente; (3) (▲) Idem2, no entanto incubar 30 minutos; (4) (●) Idem 2, no entanto incubar 15 minutos; (5) (■) 5 minutos em etanol 70%, seguido de 15 minutos em hipoclorito de sódio 1% com 2 gotas de Tween 80 para cada 100 ml de solução, em seguida mergulhar em solução de 500 mg.L⁻¹ de benlate e 500 mg.L⁻¹ de cloranfenicol, sonicar 5 segundos e incubar por 1 minuto.; (6) (□) Idem 5, no entanto incubar 10 minutos.

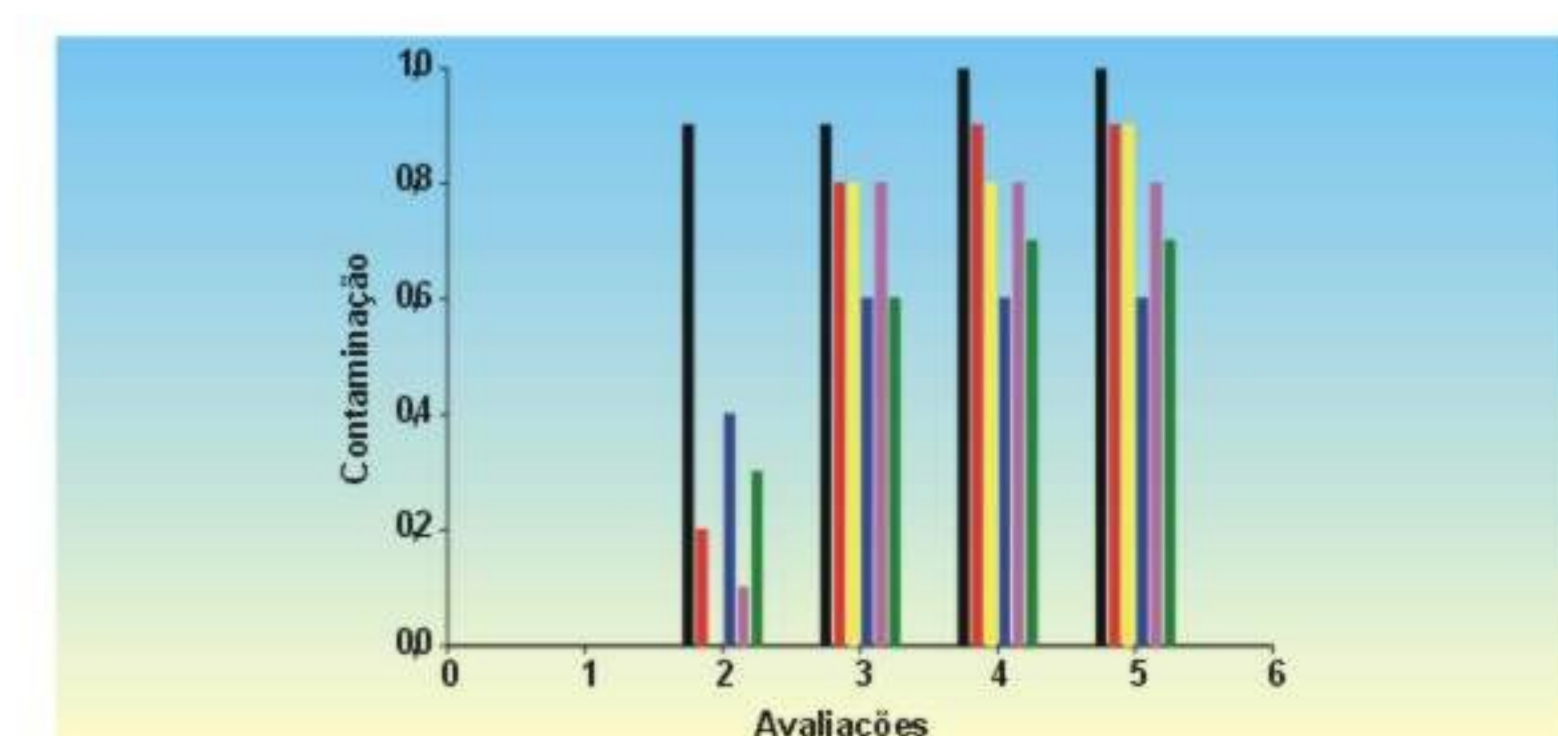


Gráfico 4 - Efeito dos tratamentos na descontaminação de explantes de manga. Tratamentos: (1) (■) 5 minutos em etanol 70%, seguido de 15 minutos em hipoclorito de sódio 1% com 2 gotas de Tween 80 para cada 100 ml de solução, em seguida incubar 1 minuto em solução de 500 mg.L⁻¹ de benlate e 500 mg.L⁻¹ de cloranfenicol a 45°C; (2) (□) Idem1, no entanto incubar a temperatura ambiente; (3) (▲) Idem2, no entanto incubar 30 minutos; (4) (●) Idem 2, no entanto incubar 15 minutos; (5) (■) 5 minutos em etanol 70%, seguido de 15 minutos em hipoclorito de sódio 1% com 2 gotas de Tween 80 para cada 100 ml de solução, em seguida mergulhar em solução de 500 mg.L⁻¹ de benlate e 500 mg.L⁻¹ de cloranfenicol, sonicar 5 segundos e incubar por 1 minuto.; (6) (□) Idem 5, no entanto incubar 10 minutos.

DISCUSSÃO

No Gráfico 1 observa-se que, na ausência de Tween, as estacas tratadas com hipoclorito de sódio e etanol, apresentaram baixa eficiência de descontaminação (Tratamento 1), mesmo quando em seguida utilizou-se a solução de benlate e cloranfenicol (Tratamento 2). Também, observou-se alta porcentagem de contaminação quando utilizou-se somente a solução de benlate e cloranfenicol (Tratamento 3), evidenciando a necessidade do uso de hipoclorito e etanol, conforme comprovado por Vianna et al. (1997) e Oliveira et al. (2000).

No Gráfico 2, novamente podemos observar que o melhor resultado foi obtido quando os explantes foram tratados com hipoclorito de sódio, etanol e solução de benlate e cloranfenicol a 45°C (Tratamento 4). Houve alta taxa de contaminação do material na ausência desta solução, mesmo quando aumentou-se a concentração de hipoclorito (Tratamentos 5 e 6), ou o tempo de

exposição ao hipoclorito (Tratamento 3). Isto indica que para o controle dos contaminantes é necessário o tratamento com fungicidas e antibióticos, conforme sugerido por Buer (2002) e Slabbert (2002).

Os Gráficos 3 e 4 demonstram que a o tratamento com benlate e cloranfenicol é eficiente para controlar a contaminação dos explantes (Tratamentos 2, 3, 4, 5 e 6). No entanto, para as estacas de mangueira o aquecimento a 45°C não aumentou a eficiência de descontaminação (Tratamento 1), quando comparado com os demais tratamentos, e produziu, como efeito colateral, um aumento na exsudação de fenóis. Buer (2002) em uma compilação de sugestões sobre fungicidas propôs o uso de benlate a 1% durante 30 minutos antes de hipoclorito, isto confere com nossos resultados que demonstraram que o maior tempo de exposição à solução de benlate aumenta a eficiência de descontaminação (Tratamento 3).

Os tratamentos 3 e 6 apresentaram o mesmo resultado, evidenciando que a sonicação também aumenta as chances de eliminação dos patógenos. A sonicação auxilia no processo de eliminação de bolhas de ar entre os tecidos do explante, permitindo um maior acesso da solução a toda a superfície do mesmo.

Os tratamentos foram eficientes para descontaminação de fungos, no entanto, após a eliminação dos mesmos iniciaram-se os problemas de contaminação por bactérias. Oliveira et al. (2000) avaliaram dois tratamentos com etanol e hipoclorito de sódio para descontaminação de explantes de bananeira e concluíram que os tratamentos são eficientes para descontaminação fúngica, no entanto são deficientes no controle de bactérias. Vianna et al. (1997) também observaram que álcool e hipoclorito são eficientes apenas no controle de fungos, após a esterilização de explantes de mamoeiro provenientes de campo.

CONCLUSÕES

- Os tratamentos contendo Tween na solução de hipoclorito, seguido de incubação com benlate e cloranfenicol apresentaram os melhores resultados de descontaminação de estacas de mangueira;
- Aquecimento da solução de benlate e cloranfenicol não aumenta a eficiência de descontaminação;
- A sonicação e o tempo de incubação nas soluções de benlate e cloranfenicol aumentaram a eficiência do processo de descontaminação.

BUER, C.S. [Plant-tc] [Fungicidas for endogenous fungus](http://www.agro.agri.umn.edu/plant-tc/listserv/1996/msg00067.html) [mensagem em lista de discussão]. Disponível em: <<http://www.agro.agri.umn.edu/plant-tc/listserv/1996/msg00067.html>> Acesso em: 12 de fev. 2002.

CORDEIRO, M.C.R.; BARRUETO CID, L.P.; PINTO, A.C.Q.; ANDRADE, S.R.M.; VARGAS RAMOS, V.H. Preliminary assays for establishment of an in vitro micropropagation protocol of mango cultivated in Brazilian savannah. 7th International Mango Symposium, Program and Abstracts. *Documentos*, v.46, Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, p.342. 2002.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds). *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: Embrapa SPI/Embrapa CNPH, 1998. p. 183-260.

OLIVEIRA, R.P.; SILVEIRA, D.G.; SILVA, S.O.: Efeito da desinfestação e do uso de meios indicadores de contaminação na micropropagação de bananeira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.22, n.1, p.57-61, abril 2000.

SAHELI, H.; KOHS-KHUI, M. A simple procedure for disinfection of "Baby Masquerade" miniature rose explants. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.68, p.145-148. 1997.

SLABBERT, R. [Plant-tc] [Benlate](http://www.agro.agri.umn.edu/plant-tc/listserv/2000/msg00082.html) [mensagem em lista de discussão]. Disponível em: <http://www.agro.agri.umn.edu/plant-tc/listserv/2000/msg00082.html> > Acesso em: 12 fev. 2002.

VIANNA, G.R.; COUTO, F.A.A.; OLIVEIRA, A.B.; ZAMBOLIM, L.; MARIA, J. A rifampicina na descontaminação bacteriana de explantes de mamoeiro provenientes do campo. *Bragantia*, Campinas, v.56, n.2, p.1-9. 1997.