

DESCONTAMINAÇÃO DE GEMAS LATERAIS DE MANGUEIRA (*Mangifera indica* L.) VISANDO A MICROPROPAGAÇÃO

Solange Rocha Monteiro de Andrade¹, Alberto Carlos de Queiroz Pinto¹,
João Batista Teixeira², Fábio Gelape Faleiro¹, Maria Cristina Rocha Cordeiro¹,
Victor Hugo Vargas Ramos¹

¹Embrapa Cerrados, CP 08223, 73301-970, Planaltina, DF, Brasil, solange@cpac.embrapa.br

²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB S/N, Brasília, DF, 70770-900

ABSTRACT

PRELIMINARY ASSAY TO DESINFECT MANGO (*Mangifera indica* L.) LATERAL BUD FOR MICROPROPAGATION

The decontamination of explants is a basic stage for the plant tissue culture. The microorganisms, if they are not eliminated, compete for nutrients from the culture medium modifying the normal development of the explant. The decontamination consists of eliminating the microorganisms, however preserving plant explant to be regenerated. The objective of this work was to develop a decontamination protocol of internodal segments for the introduction in plant tissue culture medium, to establish methods for micropropagation of lateral buds. The explants had been submitted to treatments with ethanol, hypochlorite and benomyl, for superficial decontamination. In a general, the treatments had been efficient for decontamination of fungos, however, do not eliminate contamination for an endogenous bacterium. The initial evaluations had demonstrated that the bacterium is gram positive and resistant to antibiotics rifampicin (300 mg.L⁻¹), kanamycin (150 mg.L⁻¹), ampicillin (150 mg.L⁻¹), tetracycline (150 mg.L⁻¹), cloranfenicol (150 mg.L⁻¹), carbenicillin (150 mg.L⁻¹) and streptomycin (300 mg.L⁻¹). Copper sulfate incorporation (25 and 50 mg.L⁻¹) to the nutritive medium controlled the endogenous fungos, however remains imperfection in the control of the bacterium. Studies are being carried through with other antibiotics, but they had still not been gotten any consistent resulted.

INTRODUÇÃO

A descontaminação de explantes é uma etapa fundamental para a cultura de tecidos. Os microorganismos, se não forem eliminados, competem pelos nutrientes do meio de cultura alterando o desenvolvimento normal do material a ser propagado. Além disto, vários microorganismos produzem toxinas que impedem o crescimento das plantas em meio de cultura. 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, com fungicidas e antibióticos, dependendo da origem do material (Grattapaglia e Machado, 1998). Em 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 de estacas e folhas de mangueira provenientes do campo (Cordeiro et al., 2002; Andrade et al., 2002). Os resultados iniciais demonstraram que para descontaminação superficial de gemas laterais é necessário um tratamento com solução de hipoclorito de sódio contendo Tween, além disto a sonicação e o tempo de incubação na solução de benlate aumentaram a eficiência do processo de descontaminação de explantes provenientes de matrizes altamente contaminadas no campo (Andrade et al., 2002; Andrade et al., 2003). Estes trabalhos também demonstraram que a contaminação da matriz influenciava na eficiência dos tratamentos de descontaminação dos explantes (Andrade et al., 2003). O objetivo deste trabalho foi avaliar os protocolos estudados até o momento visando a definição de um protocolo para descontaminação de estacas de manga para a introdução em meios de cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

1º Experimento

Estacas de manga (*Mangifera indica* L.) das cultivares Alfa e Tommy Atkins foram coletadas de brotos recentes de seis matrizes de 5 anos de idade, provenientes do campo experimental da Embrapa Cerrados e submetidas aos seguintes tratamentos de descontaminação:

1. Incubar 5 minutos em etanol 70%; 15 minutos em hipoclorito de sódio 1% contendo 2 gotas de Tween para cada 100 ml de solução; lavar 3 vezes em água destilada estéril; incubar 30 minutos em solução contendo 500 mg.L⁻¹ de benlate.
2. Incubar 5 minutos em etanol 70%; 15 minutos em hipoclorito de sódio 1% contendo 2 gotas de Tween para cada 100 ml de solução; lavar 3 vezes em água destilada estéril; mergulhar em solução contendo 500 mg.L⁻¹ de benlate, sonicar por 15 segundos e incubar por 10 minutos.
3. Incubar 5 minutos em etanol 70%; 15 minutos em hipoclorito de

sódio 1% contendo 2 gotas de Tween para cada 100 ml de solução; lavar 3 vezes em água destilada estéril; mergulhar em solução contendo 500 mg.L⁻¹ de benlate, sonicar por 15 segundos e incubar por 30 minutos.

Cada repetição consistia de 10 vidros contendo 1 estaca, com 8 repetições. Os experimentos foram avaliados 15 dias após o tratamento de descontaminação, e os resultados expressos em porcentagem de contaminação.

2º Experimento

Estacas de manga (*Mangifera indica* L.) das cultivares Alfa foram coletadas de brotos recentes de seis matrizes de 5 anos de idade, provenientes do campo experimental da Embrapa Cerrados, foram dessinfetadas conforme descrito no tratamento 3 do experimento anterior e transferidas para os seguintes meios de cultura:

1. Meio MS 1/2 força, acrescido de 0,1% PVP e 1% de sacarose;
2. Meio MS 1/2 força, acrescido de 0,1% PVP; 1% de sacarose e 2,5 mg.L⁻¹ de sulfato de cobre;
3. Meio MS 1/2 força, acrescido de 0,1% PVP; 1% de sacarose e 5 mg.L⁻¹ de sulfato de cobre;
4. Meio MS 1/2 força, acrescido de 0,1% PVP; 1% de sacarose e 12,5 mg.L⁻¹ de sulfato de cobre;
5. Meio MS 1/2 força, acrescido de 0,1% PVP; 1% de sacarose e 25 mg.L⁻¹ de sulfato de cobre;
6. Meio MS 1/2 força, acrescido de 0,1% PVP; 1% de sacarose e 50 mg.L⁻¹ de sulfato de cobre.

Cada repetição consistia de 10 vidros contendo 1 estaca, com 2 repetições. Os experimentos foram avaliados 15 dias após o tratamento de descontaminação, e os resultados expressos em porcentagem de contaminação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

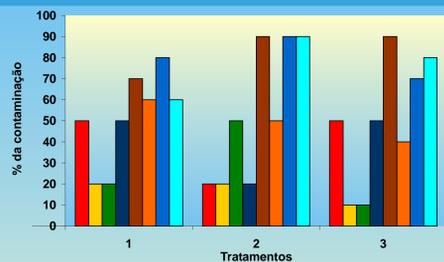


Figura 01 - Efeito dos tratamentos na descontaminação de gemas laterais de mangueira, cv. Alfa. **Tratamento 1:** Incubar 5 minutos em etanol 70%; 15 minutos em hipoclorito de sódio 1% contendo 2 gotas de Tween para cada 100 ml de solução; lavar 3 vezes em água destilada estéril; incubar 30 minutos em solução contendo 500 mg.L⁻¹ de benlate; **2:** Incubar 5 minutos em etanol 70%; 15 minutos em hipoclorito de sódio 1% contendo 2 gotas de Tween para cada 100 ml de solução; lavar 3 vezes em água destilada estéril; mergulhar em solução contendo 500 mg.L⁻¹ de benlate, sonicar por 15 segundos e incubar por 10 minutos; **3:** Incubar 5 minutos em etanol 70%; 15 minutos em hipoclorito de sódio 1% contendo 2 gotas de Tween para cada 100 ml de solução; lavar 3 vezes em água destilada estéril; mergulhar em solução contendo 500 mg.L⁻¹ de benlate, sonicar por 15 segundos e incubar por 30 minutos. Cada cor é referente a uma repetição.

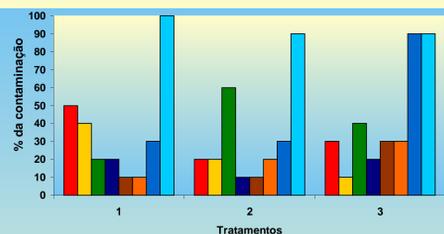


Figura 02 - Efeito dos tratamentos na descontaminação de gemas laterais de mangueira, cv. Tommy Atkins. **Tratamento 1:** Incubar 5 minutos em etanol 70%; 15 minutos em hipoclorito de sódio 1% contendo 2 gotas de Tween para cada 100 ml de solução; lavar 3 vezes em água destilada estéril; incubar 30 minutos em solução contendo 500 mg.L⁻¹ de benlate; **2:** Incubar 5 minutos em etanol 70%; 15 minutos em hipoclorito de sódio 1% contendo 2 gotas de Tween para cada 100 ml de solução; lavar 3 vezes em água destilada estéril; mergulhar em solução contendo 500 mg.L⁻¹ de benlate, sonicar por 15 segundos e incubar por 10 minutos; **3:** Incubar 5 minutos em etanol 70%; 15 minutos em hipoclorito de sódio 1% contendo 2 gotas de Tween para cada 100 ml de solução; lavar 3 vezes em água destilada estéril; mergulhar em solução contendo 500 mg.L⁻¹ de benlate, sonicar por 15 segundos e incubar por 30 minutos. Cada cor é referente a uma repetição.

As contaminações avaliadas neste trabalho tiveram origem fúngica, e não foi observada diferença em relação aos tratamentos tanto para a cultivar Alfa (Figura 1) quanto para a cultivar Tommy Atkins (Figura 2). No entanto, as contaminações foram observadas 15 após os tratamentos em laboratório, sugerindo ocorrência de contaminação endógena, sendo que os tratamentos foram testados para descontaminação superficial do explante.

Oliveira et al. (2000) avaliaram dois tratamentos com etanol e hipoclorito de sódio para descontaminação de explantes de banana e concluíram que os tratamentos são eficientes para descontaminação fúngica, no entanto são ineficientes 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 do campo. Os autores sugerem a rifampicina para o controle de bactérias endógenas, no entanto a bactéria encontrada nos explantes demonstrou resistência à rifampicina nas concentrações de 150 e 300 mg.L⁻¹ (Figura 3), bem como dos antibióticos canamicina, ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol, carbenicilina e estreptomicina.

Visando controlar o crescimento desta bactéria, utilizamos a sugestão do Dr. Eric Mercure (2003), na qual se utilizou 2000 vezes (50 mg.L⁻¹) a concentração de sulfato de cobre sugerida para meio MS. Foram realizados 2 testes com concentrações crescentes de sulfato de cobre, variando de 100 a 2000 vezes a concentração sugerida para meio MS, e não foi observado controle da bactéria, no entanto, verificamos uma queda na contaminação por fungos, principalmente nos tratamentos de 25 e 50 mg.L⁻¹ de sulfato de cobre (Figura 4). Esses resultados são consistentes, uma vez que sulfato de cobre é o componente ativo de vários fungicidas comerciais.



Figura 03 - Bactéria endógena detectada em experimento de descontaminação de explantes de manga crescendo em meio BDAL.
A: Controle;
B: Rifampicina 300 mg.L⁻¹;
C: Tetraciclina 75 mg.L⁻¹.

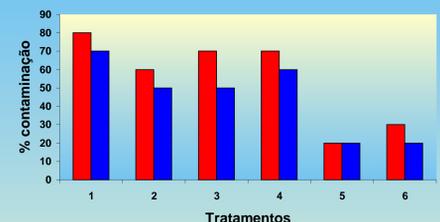


Figura 04 - Efeito concentração de sulfato de cobre no controle de contaminação endógena de fungos, cv. Alfa. **Tratamento 1:** Meio MS 1/2 força, acrescido de 0,1% PVP e 1% de sacarose; **2:** Meio MS 1/2 força, acrescido de 0,1% PVP; 1% de sacarose e 2,5 mg.L⁻¹ de sulfato de cobre; **3:** Meio MS 1/2 força, acrescido de 0,1% PVP; 1% de sacarose e 5 mg.L⁻¹ de sulfato de cobre; **4:** Meio MS 1/2 força, acrescido de 0,1% PVP; 1% de sacarose e 12,5 mg.L⁻¹ de sulfato de cobre; **5:** Meio MS 1/2 força, acrescido de 0,1% PVP; 1% de sacarose e 25 mg.L⁻¹ de sulfato de cobre; **6:** Meio MS 1/2 força, acrescido de 0,1% PVP; 1% de sacarose e 50 mg.L⁻¹ de sulfato de cobre. Cada cor é referente a uma repetição.

BIBLIOGRAFIA

ANDRADE, S.R.M.; PINTO, A.C.O.; DINIZ, H.S.; CORDEIRO, M.C.R.; RAMOS, V.H.V.; TEIXEIRA, J.B. Avaliação de protocolos para descontaminação de explantes de manga (*Mangifera indica* L.). XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura. CD-Room. 2002.
ANDRADE, S.R.M.; PINTO, A.C.O.; FALEIRO, F.G.; CORDEIRO, M.C.R.; RAMOS, V.H.V.; TEIXEIRA, J.B. Desenvolvimento de protocolo para descontaminação de explantes de mangueira visando a micropropagação de gemas laterais. 2º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas. CD-Room. 2003.
CORDEIRO, M.C.R.; BARRUETO CID, L.P.; PINTO, A.C.O.; 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.
MERCURE, E. Re: fungicide or surface sterilization protocol [Lista de discussão]. Disponível em: <http://plant-tc.coafes.umn.edu/listserv/2003/log0303/msg00050.html> Acesso em: 25 de agosto de 2003.
OLIVEIRA, R.P.; SILVEIRA, D.G.; SILVA, S.O. Efeito da desinfestação e do uso de meios indicadores de contaminação na micropropagação de banana. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.22, n.1, p.57-61, abril 2000.
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.

CONCLUSÕES

1. Não houve diferença entre os tratamentos de descontaminação.
2. Os antibióticos testados não controlam a contaminação por bactéria endógena.
3. Sulfato de cobre em concentrações superiores a 25 mg.L⁻¹ é eficiente para o controle de fungos endógenos, no entanto é ineficiente no controle da bactéria endógena.