

IDENTIFICAÇÃO DE CONTAMINANTES DE SEGMENTOS NODAIS DE MANGUEIRA INOCULADOS EM MEIO MURASHIGUE SKOOG (MS)

Andrade, S.R.M.¹; Reis Jr., F.B.¹; Charchar, M.J.D.¹; Anjos, J.R.N.¹; Buta, B.¹; Pinto, A.C.Q.¹; Oliveira, W.C.¹; Santos, J.B.¹; Mehta, A.²

¹Embrapa Cerrados, km 18 da BR 020 C.P. 08223, 73310-970 Planaltina, DF

²Embrapa Recurso Genético e Biotecnologia

e-mail: solange@cpac.embrapa.br

Introdução

A cultura de tecidos apresenta diversas possibilidades de apoio a um programa de melhoramento vegetal, entre elas a multiplicação rápida de genótipos de interesse potencial. No entanto, a embriogênese somática utilizando nucelos, única metodologia descrita para micropropagação de mangueira apresenta alta ocorrência de variação somaclonal. Pesquisadores da Austrália, México Índia e Brasil (Embrapa Cerrados e Embrapa Mandioca e Fruticultura) estão trabalhando no desenvolvimento de protocolos de micropropagação por gemas laterais e ápices caulinares, entretanto, ainda sem sucesso. Os principais problemas são a intensa contaminação endógena dos explantes e a exsudação de fenóis no meio de cultivo, além da ausência de qualquer descrição de meios de cultura adaptados a micropropagação de gemas laterais de mangueira. O presente trabalho tem o intuito de identificar os contaminantes visando controlar o desenvolvimento deles em meio de cultura.

Material e métodos

Obtenção dos explantes

Os explantes foram coletados de campos experimentais da Embrapa Cerrados (Figura 1), descontaminados superficialmente com álcool 70%, hipoclorito de sódio a 1% e 30 minutos em 500 mg.L⁻¹ de Benomyl, e inoculados em meio MS 3%.



Figura 1. Campo Experimental de mangueira da Embrapa Cerrados.

Seqüenciamento do RNAr da bactéria "B"

Cinco dias após a inoculação do explante em meio de cultura, uma bactéria com colônias brancas e de crescimento rápido foi isolada em Meio AB. O DNA desta bactéria, chamada de bactéria "B", foi extraído utilizando-se o Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). As amplificações do gene 16S RNAr foram realizadas em um volume total de 25 µl contendo 50 ng de DNA, 1,25 mM MgCl₂, 100 µM dNTP, 0,5 mM de cada primer e 0,5 U de Taq DNA polymerase (Amersham). As seqüências dos primers foram 27f: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' e 1525r: 5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3' (Lane, 1991). As amplificações foram realizadas com uma desnaturação inicial a 94°C por 1 min, seguida de 40 ciclos a 94°C por 1 min, 65°C por 1 min e 72°C por 2 min. Os produtos amplificados foram clonados utilizando o pGEM T-Easy (Promega) e seqüenciados em Seqüenciador Automático ABI Prism 3700 DNA Analyser (Applied Biosystems Inc.). As homologias das seqüências foram analisadas utilizando o programa Blast (Altschul et al., 1997).

Comparação entre as bactérias

Foi avaliado o crescimento da Bactéria "B" em meio contendo D-Manitol ou Glutamato, assim como em meio LGI semi-sólido sem N (Döbereiner et al., 1995).

Identificação dos fungos

Dez a quinze dias depois da inoculação dos explantes, foram visualizados fungos diversos. Esses fungos foram isolados após transferência para placas de Petri contendo o meio de cultura batata-dextrose-ágar e o gênero foi identificado pela avaliação morfológica das estruturas dos fungos.

Conclusões

1. A bactéria "B" deve ser filogeneticamente próxima aos gêneros *Asaia* e *Swaminathania*.
2. Matrizes do campo apresentam uma gama de fungos, sugerindo a necessidade de utilização de fungicidas no campo experimental em conjunto com tratamentos em laboratório.

Resultados e discussão

Identificação da bactéria

A bactéria "B" foi identificada como Gram Negativa, apresentando colônias chatas e circulares com diâmetro de aproximadamente 2 mm, de aspecto seco e coloração branca no meio AB (Figura 2). A amplificação do gene 16S RNAr revelou uma banda única de aproximadamente 1,4 kb. Com o seqüenciamento parcial do gene 16S RNAr foi obtida uma seqüência de aproximadamente 515 pb. A análise dessa seqüência mostrou 98% de identidade com a seqüência 16S RNAr de *Asaia bogorensis* (AB025931.1) e 97% com o 16S RNAr de *Swaminathania salitolerans* (AF459454.1). Ambas as espécies são aceto-bactérias endofíticas e são próximas filogeneticamente (Loganathan & Nair, 2004) e podem ter efeito benéfico para a planta. Embora as análises tenham sido feitas com a seqüência parcial do gene 16S RNAr, Yamada e colaboradores (2000) reportaram que árvores filogenéticas construídas com a seqüência parcial e completa do gene 16S RNAr revelam resultados semelhantes, assim, pode-se sugerir que a bactéria "B" deve ser filogeneticamente próxima aos gêneros *Asaia* e



Figura 2. Detalhe das colônias da Bactéria "B".

Nesse estudo as comparações entre essas bactérias foram feitas com informações baseadas nos trabalhos de identificação dessas espécies (Tabela 1). Entretanto, os resultados não foram conclusivos sendo necessário realizar outras baterias de teste morfológico, fisiológico e bioquímico para confirmar a identificação da Bactéria "B". As estirpes-padrão de *Asaia bogorensis* e *Swaminathania salitolerans* estão sendo solicitadas para facilitar os trabalhos de comparação entre essas bactérias.

Tabela 1. Resultado parcial das comparações entre a Bactéria B e *A. bogorensis* e *S. salitolerans*.

Crescimento em	Bactérias		
	<i>A. bogorensis</i>	<i>S. salitolerans</i>	Bactéria "B"
D- manitol	+	+	+
Glutamato	+	+	+
LGI semi-sólido sem N	ND	+	-

ND - Não determinado.

Identificação dos fungos

Inicialmente, os fungos identificados pertenciam aos seguintes gêneros: *Curvularia* sp., *Fusarium* sp. e *Aspergillus* sp. Esses gêneros são provavelmente saprófitas, sugerindo que essas espécies aparecem à medida que o explante sofre necrose. Esse resultado sugere que a diminuição no tamanho do explante, bem como a utilização de diferentes fungicidas que poderão ajudar no controle do desenvolvimento desses fungos. Entretanto, em novo bloco de inoculação de explantes foram identificados outros fungos: *Alternaria* sp., *Helmithosporium* sp., *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *Gliocladium* sp., *Penicillium* sp. e fungos do grupo de leveduras (Figura 3). Essa gama de fungos sugere a necessidade de um tratamento no campo e utilização de outras alternativas em laboratório. Em experimento-piloto, a inclusão de 25 mg.L⁻¹ de sulfato de cobre ao meio de cultura restringiu os gêneros de fungo sendo observado apenas *Fusarium* sete dias depois da inoculação. Novos estudos estão sendo realizados para definir qual o tratamento mais adequado para o controle desse fungos.

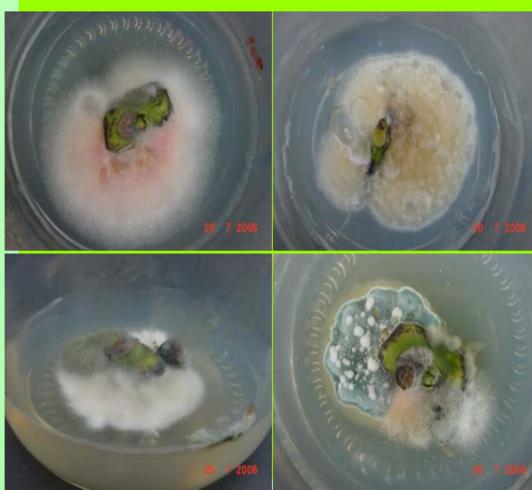


Figura 3. Amostra dos fungos identificados em meio de cultura após inoculação dos explantes.

Referências bibliográficas

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Döbereiner, J.; Baldani, V.L.D.; Baldani, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. Brasília, EMBRAPA-SPI, Itaguaí, RJ, EMBRAPA-CNPAB, 1995.
- Lane, DJ 1991. 16S/23S rRNA sequences. *Nucleic Acids Techniques in bacterail systematics*, Stackenbrandt E & Goodfellow M (eds) John Wiley & Sons, New York, 115-175.
- Loganathan P.; Nair S. 2004 *Swaminathania salitolerans* gen. nov., sp. nov., a salt-tolerant, nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacterium from wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka). *Int J Syst Evol Microbiol.* 54:1185-1190.
- Yamada Y, Katsura K, Kawasaki H, Widyastuti Y, Saono S, Seki T, Uchimura T, Komagata K. 2000. *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the alpha-Proteobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2:823-829.