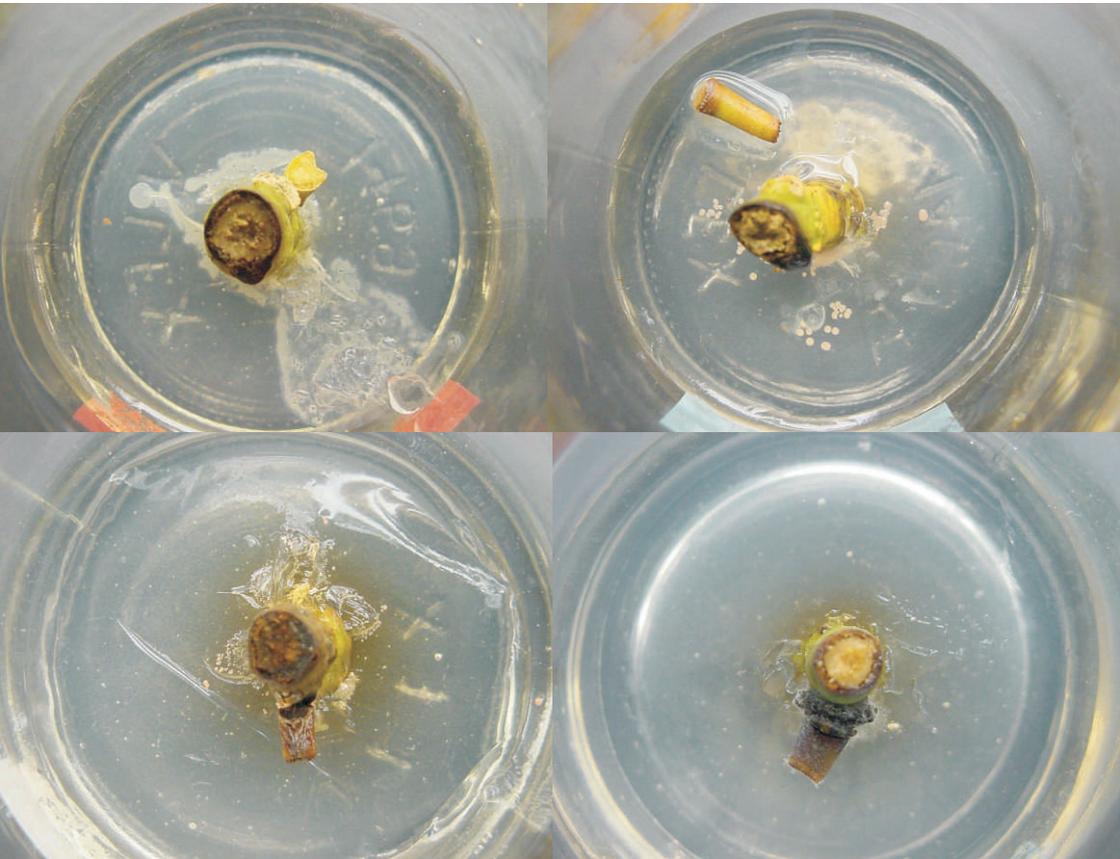


## Desenvolvimento e Avaliação de Protocolos para Descontaminação de Explantes de Mangueira Visando à Micropropagação





*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Cerrados  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

ISSN 1676-918X

Julho, 2005

# ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 153***

## **Desenvolvimento e Avaliação de Protocolos para Descontaminação de Explantos de Mangueira Visando à Micropropagação**

Solange Rocha Monteiro de Andrade  
Alberto Carlos de Queiroz Pinto  
Fábio Gelape Faleiro  
Maria Cristina Rocha Cordeiro  
Victor Hugo Vargas Ramos  
João Batista Teixeira

Planaltina, DF  
2005

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Cerrados**

BR 020, Km 18, Rod. Brasília/Fortaleza

Caixa Postal 08223

CEP 73310-970 Planaltina - DF

Fone: (61) 3388-9898

Fax: (61) 3388-9879

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

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

**Comitê de Publicações**

Presidente: *José de Ribamar N. dos Anjos*

Secretária-Executiva: *Maria Edilva Nogueira*

Supervisão editorial: *Maria Helena Gonçalves Teixeira*

Revisão de texto: *Maria Helena Gonçalves Teixeira*

Normalização bibliográfica: *Hozana Alvares de Oliveira*

Capa: *Leila Sandra Gomes Alencar*

Fotos da capa: *Solange Rocha Monteiro de Andrade*

Editoração eletrônica: *Leila Sandra Gomes Alencar*

Impressão e acabamento: *Divino Batista de Souza*

*Jaime Arbués Carneiro*

Impresso no Serviço Gráfico da Embrapa Cerrados

**1ª edição**

1ª impressão (2005): 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.

---

D451 Desenvolvimento e avaliação de protocolos para descontaminação de explantes de mangueira visando à micropropagação / Solange Rocha Monteiro de Andrade ... [et al.]. – Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2005.

24 p. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Cerrados, ISSN 1676-918X ; 153)

1. Manga - tecidos. 2. Microorganismos - manga - desinfecção.  
I. Andrade, S. R. M. de. II. Série.

---

634.655 - CDD 21

© Embrapa 2005

# Sumário

Resumo .....	5
Abstract .....	6
Introdução .....	7
Material e Métodos .....	9
Desenvolvimento do protocolo de descontaminação superficial de estacas de mangueira .....	9
Testes iniciais .....	9
Controle de crescimento de microrganismos endógenos .....	11
Resultados e Discussão .....	12
Desenvolvimento do protocolo de descontaminação superficial de estacas de mangueira .....	12
Concentração e tempo de exposição ao hipoclorito de sódio .....	14
Teste do protocolo de descontaminação .....	15
Controle de crescimento de microrganismos endógenos .....	17
Conclusões .....	21
Referências .....	21

# Desenvolvimento e Avaliação de Protocolos para Descontaminação de Explantes de Mangueira Visando à Micropropagação

*Solange Rocha Monteiro de Andrade<sup>1</sup>; Alberto Carlos de Queiroz Pinto<sup>2</sup>; Fábio Gelape Faleiro<sup>3</sup>; Maria Cristina Rocha Cordeiro<sup>4</sup>; Victor Hugo Vargas Ramos<sup>5</sup>; João Batista Teixeira<sup>6</sup>*

**Resumo:** A eliminação de microrganismos é uma condição essencial para o estabelecimento de um processo de regeneração *in vitro*, pois eles além de competirem pelos nutrientes também produzem toxinas que causam a morte do explante. O trabalho visou desenvolver metodologias de controle de crescimento de microrganismos provenientes de explantes de mangueira inoculados em meio de cultura, como fase inicial do estabelecimento de um protocolo de micropropagação de gemas laterais de mangueira para apoiar o programa de melhoramento desenvolvido na Embrapa. Contudo, uma bactéria de cor esbranquiçada, gram positiva, demonstrou ser resistente a todos os antibióticos, menos ao complexo sulfametaxazol + trimetoprima. Foi verificada a presença de outra bactéria, de coloração rosada e que foi controlada por canamicina, rifampicina, tetraciclina e estreptomicina. Testou-se então, o uso de sulfato de cobre em concentrações até 2000 vezes maior que a indicada para o meio MS e verificou-se que não foi capaz de controlar a bactéria, mas exerceu forte controle da contaminação de fungos endógenos. Com base nesses resultados, inocularam explantes em meio contendo sulfato de cobre, canamicina e o complexo sulfametaxazol + trimetoprima em diferentes concentrações e cada antibiótico isoladamente. Os resultados demonstram que o sulfametaxazol sozinho ou com a trimetoprima controlam o desenvolvimento da bactéria. No entanto, novos estudos são necessários para identificar se esses antibióticos não afetam o desenvolvimento do explante.

Termos de Indexação: cultura de tecidos, organogênese, desinfecção, *Mangifera indica*.

<sup>1</sup> Biól., D.Sc., Embrapa Cerrados, solange@cpac.embrapa.br

<sup>2</sup> Eng. Agrôn., Ph.D., Embrapa Sede, alberto.pinto@sede.embrapa.br

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

<sup>4</sup> Bioméd., D.Sc., Embrapa Cerrados, cristina@cpac.embrapa.br

<sup>5</sup> Eng. Agrôn., Ph.D., Embrapa Cerrados, vhugo@cpac.embrapa.br

<sup>6</sup> Eng. Agrôn., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica PqEB S/N, Plano Piloto CEP 70770-900, Brasília, DF

# Evaluation and development of mango explant decontamination protocol for micropropagation

---

**Abstract** - *The decontamination of explantes is a basic stage for the plant tissue culture. The objective of this work was to develop a decontamination protocol of internodal segments to establish methods for micropropagation of mango lateral buds. The first step was to develop a superficial decontamination of the explants followed by a control of microrganism growth into the medium. The results demonstrated that explant needs a pre-treatment with neutral detergent in tap water, a mixture with hypochlorite and Tween and 15 seconds of sonication in Benomyl (500 mg.L<sup>-1</sup>), before incubation in the solution. Treatment with etanol 70% followed by hypochlorite 1%, and 30 minutes of Benomyl 500 mg.L<sup>-1</sup> immersion was the most efficient for superficial decontamination. In general, the treatments were efficient for decontamination of superficial fungi, however, they did not eliminate contamination of endogenous bacteria and fungi. Inclusion of copper sulfate (25 and 50 mg.L<sup>-1</sup>) into the nutritive medium controlled the endogenous fungi, although it fails to control the endogenous bacteria. The evaluation demonstrated that the bacteria are gram positive and resistant to the antibiotics rifampycin (300 mg.L<sup>-1</sup>), kanamycin (150 mg.L<sup>-1</sup>), ampicylin (150 mg.L<sup>-1</sup>), tetracyclin (150 mg.L<sup>-1</sup>), chloramphenicol (150 mg.L<sup>-1</sup>), carbenicyllin (150 mg.L<sup>-1</sup>) and streptomycin (300 mg.L<sup>-1</sup>). However, these results also revealed that the combination of sulphametaxazole + trimetroprim (80 mg.L<sup>-1</sup> + 16 mg.L<sup>-1</sup>) or sulfamethoxazole (80 mg.L<sup>-1</sup>) alone showed satisfactory result on the control of this endogenous bacteria, while trimethoprim (16 mg.L<sup>-1</sup>) did not work alone. Studies are actually being carried out to evaluate if the antibiotics affect the explant development.*

**Index terms:** mango, plant tissue culture, micropropagation, disinfection.

## Introdução

A cultura de tecidos pode apoiar o programa de melhoramento pela multiplicação rápida dos genótipos de interesse a partir de um pequeno explante, mantendo a identidade genética e diminuindo o tempo de obtenção de clones para avaliações com repetição e em diferentes ambientes ([HU; WANG, 1983](#)). As vantagens potenciais em relação à propagação por métodos convencionais são: (1) apenas pequena quantidade de explantes é necessária para a regeneração de milhares de clones em um ano; (2) muitas espécies não são propagadas por métodos convencionais, sendo a cultura de tecidos alternativa para essas espécies; (3) permite a troca de germoplasma livre de doenças evitando a introdução de novas doenças em locais deferentes; (4) podem ser propagadas em qualquer época do ano ([HU; WANG, 1983](#); [AMMIRATO, 1983](#); [LITZ et al., 1984](#)). No entanto, a contribuição da cultura de tecidos no melhoramento dependerá dos objetivos do programa e das características da espécie-alvo ([FERREIRA et al., 1998](#)).

Atualmente, a embriogênese somática é o único método de micropropagação da mangueira ([LITZ, 1984a](#); [LITZ et al., 1984](#); [DEWALD et al., 1989a, b](#)). O método, embora efetivo, apresenta alguns inconvenientes para a propagação rápida dos híbridos de interesse. O primeiro, é a utilização de nucelos como fonte de explantes ([LITZ, 1984a](#); [LITZ et al., 1984](#); [DEWALD et al., 1989a,b](#)), limitando a época de inoculação em meio de cultura ao período de frutificação (setembro-dezembro). Em frutos da mangueira, o estágio ótimo de desenvolvimento do óvulo para o estabelecimento das culturas embriogênicas é aproximadamente quando a massa embrionária ocupa metade do saco embrionário, ou seja, cerca de 30 a 50 dias após a polinização dependendo da cultivar ([LITZ, 1984b](#); [DEWALD et al., 1989b](#); [LITZ; JAISWAL, 1991](#); [LITZ, 2002](#)). Entretanto, estudos ([LITZ, 1989](#)) demonstram que, embora o nucelo apresente a habilidade de produzir embriões até sem estímulo externo, em baixa frequência, a resposta é significativamente diferente dentro das cultivares e entre as variedades poli e monoembriônicas ([LITZ, 2002](#); [LITZ et al., 1998](#)). Além disso, o híbrido enxertado frutifica no mínimo de 3 a 4 anos após o plantio<sup>7</sup>, e o processo de obtenção de embriões somáticos é lento devido às dificuldades de controlar o desenvolvimento normal do embrião em meio de cultivo ([DEWALD et al., 1989b](#); [LITZ; JAISWAL, 1991](#); [THOMAS, 1999](#)). Portanto, a obtenção da multiplicação do genótipo de interesse ocorreria somente cerca de seis anos depois da identificação dele.

<sup>7</sup> Comunicação pessoal do Dr. Alberto C. O. Pinto da Embrapa Sede a primeira autora em julho/2005.

A técnica da embriogênese somática também apresenta alto índice de variação somaclonal devido à manutenção do explante em altas concentrações de reguladores de crescimento ao longo período em meio de cultura ([LITZ, 2002](#)). Isso ocorre por que as células do tecido sofrem um processo traumático por causa da reprogramação celular durante o processo de produção de embriões e regeneração deles que é um processo completamente diferente do que ocorre na natureza ([JAIN, 2001](#)). Esse processo costuma induzir a poliploidização, quebras de cromossomos, aneuploidização e outras mutações, resultando em anormalidades na mitose e no desenvolvimento do explante ([HU; WANG, 1983](#); [AMMIRATO, 1983](#)). A variação somaclonal pode ser utilizada para aumentar a variabilidade do germoplasma, mas é um inconveniente quando se pretende clonar genótipos de interesse ou para utilizar em processos de transformação genética ([JAIN, 2001](#)). Segundo [Litz e Jaiswal \(1991\)](#), o uso de embriogênese somática ainda não pode ser considerada como um método confiável para ser empregado na micropropagação de espécies frutíferas tropicais.

Existem poucos trabalhos visando ao desenvolvimento de protocolos de micropropagação por gemas laterais e ápices caulinares de mangueira. Os principais problemas são a intensa contaminação endógena dos explantes e a exsudação de fenóis no meio de cultivo ([SHARMA; SINGH, 2002](#); [LITZ, 2002](#)), além da ausência de qualquer descrição de meios de cultura adaptados ao sistema de micropropagação de gemas laterais de mangueira. As vantagens desse sistema são: a preservação da integridade genética da planta-mãe dos explantes e a possibilidade de não haver reintrodução da juvenildade nos clones desenvolvidos ([LITZ, 2002](#)).

A descontaminação de explantes é uma etapa fundamental para a cultura de tecidos. Os microrganismos, se não forem eliminados, competem pelos nutrientes do meio de cultura alterando o desenvolvimento normal do material a ser propagado. Além disto, vários microrganismos produzem toxinas que impedem o crescimento das plantas em meio de cultura. A descontaminação consiste em eliminá-los, porém preservando o material vegetal a ser regenerado ([RAZDAN, 2003](#)). Em 2000, iniciaram-se os primeiros trabalhos para estabelecimento de protocolos de cultura de tecidos de mangueira na Embrapa Cerrados. Os esforços concentraram-se, a princípio, no desenvolvimento de métodos de descontaminação de estacas e folhas de mangueira provenientes do campo ([CORDEIRO et al., 2002](#); [ANDRADE et al., 2003](#)).

Nos procedimentos de descontaminação, os explantes vegetais não podem ser submetidos ao calor extremo, pois esse afeta diversas atividades biológicas comprometendo a regeneração dos tecidos. Assim, órgãos e tecidos normalmente são esterilizados com substâncias como etanol, compostos à base de cloro, fungicidas e antibióticos, dependendo da origem do material ([GRATTAPLAGIA; MACHADO, 1998](#), [RAZDAN, 2003](#); [CHAWLA, 2003](#)).

O Etanol é utilizado nas concentrações de 70% a 80 % (v/v), pois, acima dessas concentrações, a eficiência é reduzida e o tecido pode ser desidratado. Hipoclorito de sódio e de cálcio são os compostos à base de cloro mais empregados na desinfestação de explantes em concentrações que variam de 0,5% a 5% 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 à base de cloro, sendo o Tween, nas concentrações de 0,01% a 0,05%, o mais utilizado. Detergentes neutros também podem ser usados como substitutos ([GRATTAPLAGIA; MACHADO, 1998](#); [RAZDAN, 2003](#); [CHAWLA, 2003](#)).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar protocolos de descontaminação de estacas de manga para a introdução em cultura de tecidos, visando ao estabelecimento de métodos de micropropagação de gemas laterais.

## Material e Métodos

O trabalho foi dividido em duas fases, (1) desenvolvimento do protocolo de descontaminação de estacas de mangueira; (2) controle do crescimento de microrganismos endógenos.

### Desenvolvimento do protocolo de descontaminação superficial de estacas de mangueira

#### Testes iniciais:

*Pré-lavagem com detergente neutro* - os explantes foram descontaminados conforme os seguintes tratamentos: (1) Imersão em água de torneira contendo detergente neutro durante 30 minutos, enxágüe dos explantes em água de torneira e tratamento com etanol 70% por cinco minutos, seguido de hipoclorito de sódio a 1% com Tween 80 por 15 minutos e um minuto em Benomyl 500 mg.L<sup>-1</sup>; 2) etanol 70% por cinco minutos, seguido de hipoclorito de sódio a 1% com Tween 80 por 15 minutos e um minuto em Benomyl 500 mg.L<sup>-1</sup>.

*Efeito da presença de Tween 80, hipoclorito de sódio e Benomyl* - os explantes foram descontaminados conforme os seguintes tratamentos: (1) 5 minutos em etanol 70%, seguido de 15 minutos em hipoclorito de sódio 1%; (2) Idem 1, seguido imersão 1 minuto em solução de 500 mg.L<sup>-1</sup> de Benomyl e 500 mg.L<sup>-1</sup> de cloranfenicol a 45 °C; (3) Imersão um minuto em solução de 500 mg.L<sup>-1</sup> de Benomyl e 500 mg.L<sup>-1</sup> de cloranfenicol a 45 °C; (4) cinco minutos em etanol 70%, seguido de 15 minutos em hipoclorito de sódio 1% com duas gotas de Tween 80 para cada 100 mL de solução; (5) Idem 4, em seguida, imersão um minuto em solução de 500 mg.L<sup>-1</sup> de Benomyl e 500 mg.L<sup>-1</sup> de cloranfenicol a 45 °C.

*Concentração de hipoclorito e tempo de exposição* - os explantes foram submetidos ao tratamento etanol 70% por cinco minutos, seguido de incubação com hipoclorito, mas com as seguintes diferenças: (1) 15 minutos em hipoclorito 1%; (2) 30 minutos em hipoclorito 1%; (3) 15 minutos em hipoclorito 2,5%; (4) 15 minutos em hipoclorito 5%; (5) um minuto em Benomyl 500 mg.L<sup>-1</sup>; (6) 15 minutos em hipoclorito 1%, seguido de um minuto em Benomyl 500 mg.L<sup>-1</sup>.

*Tempo de exposição ao Benomyl e efeito da sonicação* - os explantes foram submetidos ao tratamento etanol 70% por cinco minutos e 15 minutos de incubação com hipoclorito de sódio 1%, seguido dos seguintes tratamentos: (1) um minuto em Benomyl 500 mg.L<sup>-1</sup> a 45 C; (2) um minuto em Benomyl 500 mg.L<sup>-1</sup>; (3) 10 minutos em Benomyl 500 mg.L<sup>-1</sup>; (4) 30 minutos em Benomyl 500 mg.L<sup>-1</sup>; (5) 15 segundos de sonicação seguido por 10 minutos em Benomyl 500 mg.L<sup>-1</sup>; (6) 15 segundos de sonicação seguido por 30 minutos em Benomyl 500 mg.L<sup>-1</sup>.

Nesses testes iniciais o material vegetal utilizado foram estacas de manga, cultivar Alfa, coletadas de brotos recentes de matrizes de 5 anos de idade, provenientes do campo experimental da Embrapa Cerrados. As estacas foram submetidas aos tratamentos e separadas em vidros individuais contendo meio 25 mL de MS 3%. Cada tratamento consistia de 10 vidros contendo uma estaca. Os tratamentos foram avaliados 15 dias após os testes de descontaminação e o resultado expresso em porcentagem de contaminação.

*Teste do Protocolo de Descontaminação superficial* - os explantes foram coletados de brotos terminais de seis matrizes de cinco anos de idade, das cultivares Alfa e Tommy Atkins, provenientes do campo experimental da Embrapa Cerrados. As estacas de mangueira foram cortadas e tratadas por cinco

minutos em etanol 70% seguidos de 15 minutos em hipoclorito de sódio 1% contendo duas gotas de Tween 80 para cada 100 mL de solução; lavadas três vezes em água destilada estéril; e, então, submetidas a três tratamentos de descontaminação: (1) incubação por 30 minutos em solução contendo 500 mg.L<sup>-1</sup> de Benomyl; (2) imersão em solução contendo 500 mg.L<sup>-1</sup> de Benomyl, seguida de sonicação por 15 segundos e incubação por 10 minutos; (3) imersão em solução contendo 500 mg.L<sup>-1</sup> de Benomyl, seguida de sonicação por 15 segundos e incubação por 30 minutos.

O delineamento experimental foi o fatorial 2 X 3 (genótipo por tratamento de assepsia) com três repetições. As estacas foram submetidas aos tratamentos e separadas em vidros individuais contendo meio 25 mL de MS 3%. Cada repetição consistia de 10 vidros contendo uma estaca. Os experimentos foram avaliados 15 dias após o tratamento de descontaminação. Os resultados foram transformados para arcsen submetidos à análise de variância, utilizando-se o modelo fixo  $Y_{ijk} = u + G_i + T_j + GT_{ij} + x_{ijk}$ . As análises foram realizadas com o auxílio do Programa Genes (CRUZ, 1997).

## Controle de crescimento de microrganismos endógenos

*Controle de fungos endógenos* - estacas de mangueira da cultivar Alfa foram coletadas de brotos recentes de seis matrizes de 5 anos de idade, provenientes do campo experimental da Embrapa Cerrados, foram desinfetadas conforme descrito no tratamento 3 do experimento anterior e transferidas para meios de cultura MS 1/2 força com 0,1% PVP e 1% de sacarose; acrescidos de sulfato de cobre nas seguintes concentrações (1) 0,0 mg.L<sup>-1</sup> (controle); (2) 2,5 mg.L<sup>-1</sup>; (3) 5 mg.L<sup>-1</sup>; (4) 12,5 mg.L<sup>-1</sup>; (5) 25 mg.L<sup>-1</sup>; (6) 50 mg.L<sup>-1</sup>. Foram feitas duas repetições sendo que cada repetição consistiu de 10 vidros contendo uma estaca. Os experimentos foram avaliados 15 dias depois do tratamento de descontaminação e os resultados expressos em porcentagem de contaminação.

*Uso de antibióticos para controle do desenvolvimento de bactérias endógenas* - as bactérias foram cultivadas em meio BDAL acrescido de antibióticos: canamicina (75 e 150 mg.L<sup>-1</sup>), rifampicina (150 e 300 mg.L<sup>-1</sup>), estreptomycin (150 e 300 mg.L<sup>-1</sup>), tetraciclina (75 e 150 mg.L<sup>-1</sup>), ampicilina (75 e 150 mg.L<sup>-1</sup>), cloranfenicol (75 e 150 mg.L<sup>-1</sup>), carbenicilina (75 e 150 mg.L<sup>-1</sup>) e sulfametoxazol + Trimetoprima (80 + 16 e 120 + 24 mg.L<sup>-1</sup>). As avaliações foram realizadas dois dias depois a inoculação nas placas.

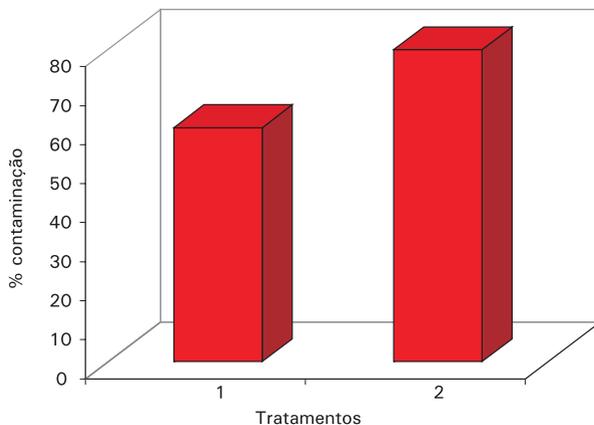
*Controle da bactéria endógena utilizando sulfametaxazol e trimetoprima* - microestacas de mangueira da cultivar Alfa foram coletadas de brotos recentes de seis matrizes de 5 anos de idade, provenientes do campo experimental da Embrapa Cerrados, foram desinfetadas (conforme descrito no tratamento 3 do item anterior) e transferidas para Meio MS  $\frac{1}{2}$  força acrescido dos seguintes tratamentos: (1) sem antibiótico (controle); (2) 40 mg.L<sup>-1</sup> de sulfametaxazol + 16 mg.L<sup>-1</sup> de trimetoprima; (3) 60 mg.L<sup>-1</sup> de sulfametaxazol + 24 mg.L<sup>-1</sup> de trimetoprima; (4) 80 mg.L<sup>-1</sup> de sulfametaxazol + 32 mg.L<sup>-1</sup> de trimetoprima; (5) 80 mg.L<sup>-1</sup> de sulfametaxazol; (6) 32 mm.L<sup>-1</sup> de trimetoprima

## Resultados e Discussão

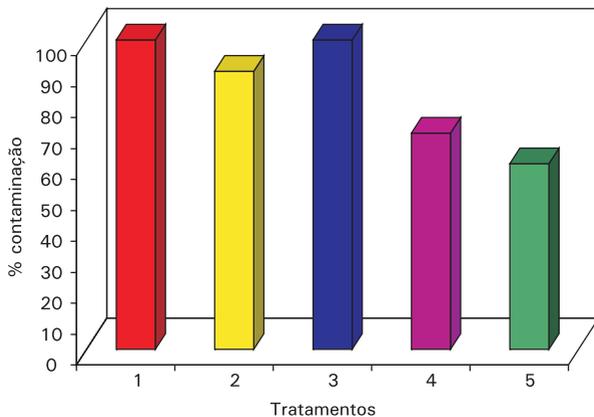
### Desenvolvimento do protocolo de descontaminação superficial de estacas de mangueira

Foram realizados alguns experimentos iniciais, baseados em dados da literatura e de informações pessoais ([MERCURE, 2003](#)) visando ao estabelecimento de um protocolo inicial de descontaminação superficial ([RAZDAN, 2003](#); [GRATTAPLAGIA; MACHADO, 1998](#)). Os resultados mostraram a necessidade de uma pré-lavagem dos explantes em detergente neutro antes do tratamento de descontaminação sugerido ([Figura 1](#)). Na ausência de Tween, as estacas, tratadas com hipoclorito de sódio e etanol, apresentaram baixa eficiência de descontaminação, mesmo quando em seguida utilizou-se da solução de Benomyl e cloranfenicol ([Figura 2](#)). Tween 20 ou 80 em baixas concentrações (0,01% a 0,1%) apresentaram efeitos surfactantes permitindo ao desinfetante atingir e eliminar os microrganismos superficiais ([HU; WANG, 1983](#); [RAZDAN, 2003](#); [CHAWLA, 2003](#)). Observou-se, também, alta porcentagem de contaminação quando se utilizou somente a solução de Benomyl e cloranfenicol, evidenciando a necessidade de um pré-tratamento com hipoclorito, etanol e Tween ([Figura 2](#)).

Estudos posteriores demonstraram que o aquecimento da solução de Benomyl e cloranfenicol não aumenta a eficiência da descontaminação, além de aumentar a exsudação de fenóis, fato que levou à eliminação da etapa de aquecimento. O tratamento com cloranfenicol foi igualmente eliminado, pois se observou que ele não controlava o desenvolvimento de bactérias endógenas. Trabalhos têm demonstrado que incubação com antibióticos posterior à descontaminação superficial não controla o desenvolvimento de bactérias endógenas ([SALEHI; KHOSH-KHUI, 1997](#)).



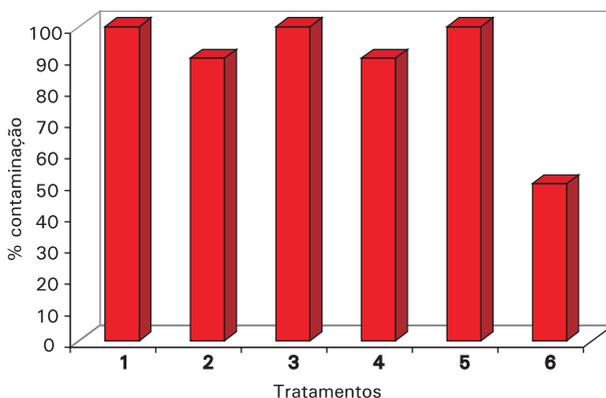
**Figura 1.** Pré-tratamento: (1) Incubação em água de torneira contendo detergente neutro durante 30 minutos, enxágüe dos explantes em água de torneira e tratamento com etanol 70% por cinco minutos, seguido de hipoclorito a 1% com Tween 80 por 15 minutos e um minuto em Benomyl 500 mg.L<sup>-1</sup>; 2) etanol 70% por cinco minutos, seguido de hipoclorito a 1% com Tween 80 por 15 minutos e um minuto em Benomyl 500 mg.L<sup>-1</sup>.



**Figura 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%; (2) (■) Idem 1, seguido imergir 1 minuto em solução de 500 mg.L<sup>-1</sup> de Benomyl e 500 mg.L<sup>-1</sup> de cloranfenicol a 45°C; (3) (■) Imersão por um minuto em solução de 500 mg.L<sup>-1</sup> de Benomyl e 500 mg.L<sup>-1</sup> de cloranfenicol a 45°C; (4) (■) cinco minutos em etanol 70%, seguido de 15 minutos em hipoclorito de sódio 1% com duas gotas de Tween 80 para cada 100 ml de solução; (5) (■) Idem 4, em seguida imersão por um minuto em solução de 500 mg.L<sup>-1</sup> de Benomyl e 500 mg.L<sup>-1</sup> de cloranfenicol a 45°C.

## Concentração e tempo de exposição ao hipoclorito de sódio

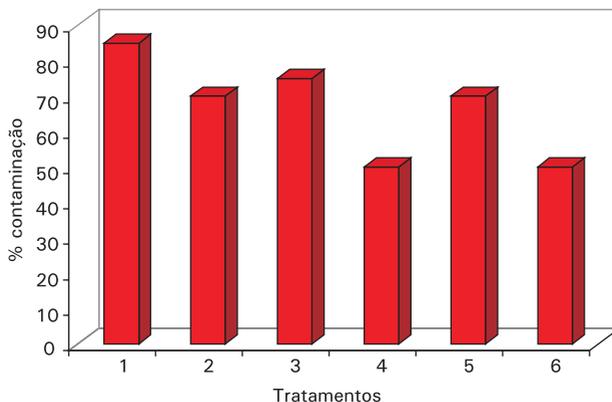
Verifica-se na Figura 3 que o aumento da concentração de hipoclorito de sódio ou o tempo de exposição ao hipoclorito de sódio não afeta a porcentagem de contaminação. Em geral, utiliza-se uma concentração de 0,5% a 1% de hipoclorito de sódio (NaClO). Existem trabalhos em que se utilizam concentrações de até 10% do princípio ativo, no entanto, altas concentrações podem danificar o tecido ([HU: WANG, 1983](#)). Como as avaliações com maiores concentrações de hipoclorito não diminuíram a contaminação por fungos, manteve-se a concentração em 1%, seguida da imersão em Benomyl, que diminuiu a contaminação em quase 50% (Figura 3).



**Figura 3.** Tratamento com hipoclorito - os explantes foram submetidos ao tratamento etanol 70% por cinco minutos, seguido de incubação com hipoclorito, mas com as seguintes diferenças: (1) 15 minutos em hipoclorito 1%; (2) 30 minutos em hipoclorito 1%; (3) 15 minutos em hipoclorito 2,5%; (4) 15 minutos em hipoclorito 5%; (5) um minuto em Benomyl 500 mg.L<sup>-1</sup> ; 6) 15 minutos em hipoclorito 1%, seguido de um minuto em Benomyl 500 mg.L<sup>-1</sup>.

### *Tempo de exposição ao Benomyl e efeito da sonicação*

A utilização de fungicidas para descontaminação superficial de explantes é bastante comum, sendo o Benomyl o fungicida mais utilizado por apresentar baixo efeito fitotóxico, além de apresentar amplo espectro de ação ([PAUL et al., 2001](#)). Observou-se que o maior tempo de exposição ao Benomyl e a sonicação aumentaram a eficiência de descontaminação ([Figura 4](#)). A sonicação auxilia o processo de eliminação de bolhas de ar entre os tecidos do explante, permitindo maior acesso da solução a toda a superfície dele ([HU: WANG, 1983](#)).



**Figura 4.** Os explantes foram submetidos ao tratamento etanol 70% por cinco minutos e 15 minutos de incubação com hipoclorito 1%, seguido dos seguintes tratamentos: (1) um minuto em Benomyl 500 mg.L<sup>-1</sup> a 45 C; (2) um minuto em Benomyl 500 mg.L<sup>-1</sup>; (3) 10 minutos em Benomyl 500 mg.L<sup>-1</sup>; (4) 30 minutos em Benomyl 500 mg.L<sup>-1</sup>; (5) 15 segundos de sonicação seguido por 10 minutos em Benomyl 500 mg.L<sup>-1</sup>; (6) 15 segundos de sonicação seguido por 30 minutos em Benomyl 500 mg.L<sup>-1</sup>.

Os tratamentos foram eficientes para descontaminação de fungos, no entanto, após a eliminação deles, iniciaram-se os problemas de contaminação por bactérias.

## Teste do protocolo de descontaminação

Visando validar os dados obtidos nos experimentos iniciais, três tratamentos de descontaminação, incluindo o protocolo proposto, foram utilizados para duas cultivares de mangueira. O delineamento experimental foi fatorial 2 X 3. A análise de variância mostrou que não houve efeito significativo da cultivar, do tipo de tratamento de descontaminação, nem da interação cultivar X tipo de tratamento ([Tabela 1](#)). Entretanto, observando os dados brutos obtidos neste trabalho ([Tabela 2](#)), verificou-se uma variação da porcentagem de descontaminação em função da matriz utilizada para coletar as estacas e uma tendência de maior eficiência do tratamento 3, principalmente, para as estacas das matrizes 1, 4 e 6 que apresentavam altas taxas de contaminação.

**Tabela 1.** Análise de variância dos experimentos de descontaminação.

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Probabilidade
Genótipo	1	0,000156	0,000156	0,00805	n.s.
Tratamento de descontaminação	2	0,157117	0,078558	0,406739	n.s.
Inter. GxT	2	0,006594	0,003297	0,017072	n.s.
Resíduo	12	2,3177			
Total	17	2,4816			

**Tabela 2.** Efeito de três tratamentos e duas variedades na descontaminação de explantes de manga.

Tratamento	Genótipo	Matrizes	% contaminação
1	Alfa	1	100
2	Alfa	1	70
3	Alfa	1	60
1	Alfa	2	40
2	Alfa	2	80
3	Alfa	2	50
1	Alfa	3	20
2	Alfa	3	30
3	Alfa	3	20
1	Tommy Atkins	4	100
2	Tommy Atkins	4	90
3	Tommy Atkins	4	70
1	Tommy Atkins	5	10
2	Tommy Atkins	5	10
3	Tommy Atkins	5	20
1	Tommy Atkins	6	70
2	Tommy Atkins	6	70
3	Tommy Atkins	6	40

(1) Imersão por 30 minutos em solução contendo 500 mg.L<sup>-1</sup> de Benomyl; (2) sonicação por 15 segundos na solução de Benomyl de imergir por 10 minutos; (3) mais sonicação por 15 segundos na solução de Benomyl e imersão por 30 minutos.

A análise de variância ([Tabela 3](#)) evidencia o efeito altamente significativo da matriz na porcentagem de contaminação. A alta variação da porcentagem de contaminação em função da matriz sugere que a quantidade de inóculo nas

matrizes em campo é muito variável, mesmo sendo da mesma cultivar. Diversos autores ([OLIVEIRA et al., 2000](#); [GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998](#); [THOMAS; RAVINDRA, 1997](#)) afirmam que a qualidade fitossanitária das matrizes tem muita influência na porcentagem de contaminação *in vitro*. Os autores sugerem a criação de um banco de matrizes, em viveiro ou casa de vegetação, com comprovada qualidade fitossanitária e nutricional para serem utilizadas como fonte de explante para a cultura de tecidos.

**Tabela 3.** Análise de variância dos experimentos de descontaminação.

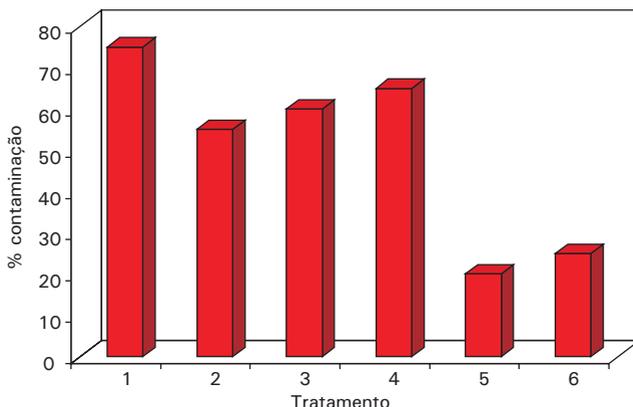
F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Probabilidade
Tratamentos de descontaminação	2	811,111	405,556	1,91	100,0
Matrizes	5	12627,778	2525,556	11,9005	0,000597
Resíduo	10	2122,222	212,222		
Total					

## Controle do crescimento de microrganismos endógenos

As contaminações observadas neste trabalho tiveram origem fúngica e bacteriana. O sulfato de cobre foi utilizado visando controlar o crescimento da bactéria, conforme a sugestão de [Mercure \(2003\)](#) utilizando-se 2000 vezes (50 mg.L<sup>-1</sup>) a concentração de sulfato de cobre sugerida para meio MS. Foram realizados dois testes com concentrações crescentes de sulfato de cobre, variando de 100 a 2000 vezes a concentração sugerida para meio MS não se observando o controle da bactéria, no entanto, verificou-se queda na contaminação por fungos, principalmente, nos tratamentos de 25 e 50 mg.L<sup>-1</sup> de sulfato de cobre ([Figura 5](#)), o que seria esperado considerando que o sulfato de cobre é o componente ativo de vários fungicidas comerciais. De modo geral, os tratamentos foram eficientes para descontaminação de fungos superficiais, no entanto, não eliminaram a contaminação por bactérias e fungos endógenos.

[Thomas e Ravindra \(1997\)](#) utilizaram diferentes tratamentos com fungicidas e antibióticos para descontaminação de gemas apicais de mangueira e concluíram que os tratamentos apenas atrasaram ou reduziram as contaminações por fungos e 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 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, uma das bactérias (branca) encontradas nos explantes demonstrou resistência à rifampicina nas concentrações de 150 e 300 mg.L<sup>-1</sup> (Figura 6), bem como dos antibióticos canamicina, ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol, carbenicilina e estreptomicina.

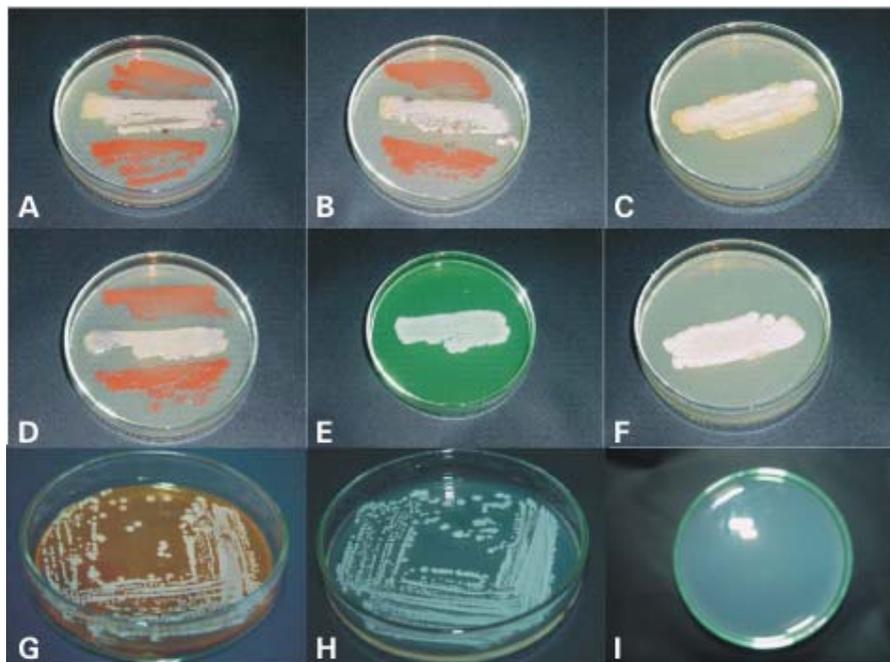


**Figura 5.** Efeito concentração de sulfato de cobre no controle de contaminação endógena de fungos, cv. Alfa. Tratamento (1) sem sulfato de cobre; (2) 2,5 mg.L<sup>-1</sup> de sulfato de cobre; (3) 5 mg.L<sup>-1</sup> de sulfato de cobre; (4) 12,5 mg.L<sup>-1</sup> de sulfato de cobre; (5) 25 mg.L<sup>-1</sup> de sulfato de cobre; (6) 50 mg.L<sup>-1</sup> de sulfato de cobre. Média de duas repetições.

Estudos realizados com os antibióticos Sulfametoxazol + Trimetoprima demonstraram a capacidade de esse complexo controlar o desenvolvimento dessa bactéria (branca), a partir da concentração de 80 + 16 mg.L<sup>-1</sup> (Figuras 6 e 7). No entanto, não existem estudos sobre a utilização de sulfametoxazol em cultura de tecidos, embora tenha sido relatado na literatura, o uso da rifampicina associada à trimetoprima para controle de bactérias endógenas (ALBERS; KUNNEMAN, 1992; HALDEMAN et al., 1987; PHILLIPS et al., 1981).

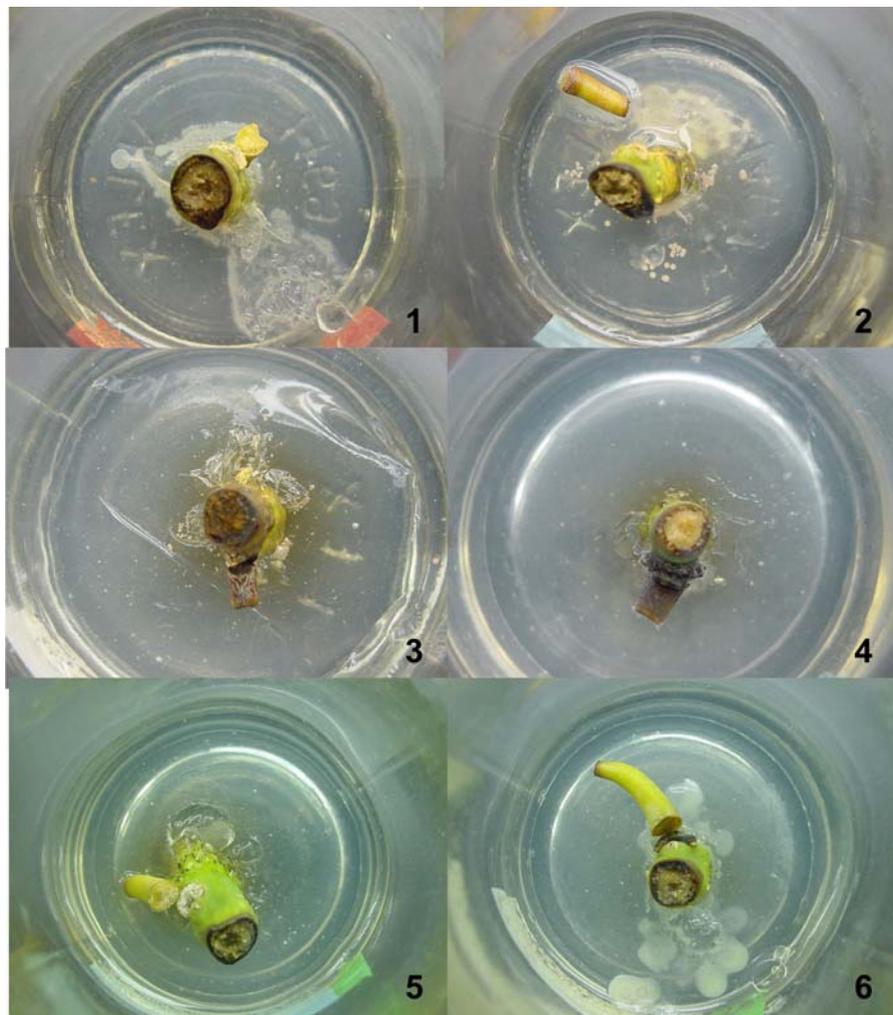
A associação dos dois antibióticos inibe a síntese do ácido fólico. O sulfametoxazol é análogo estrutural ao ácido r-aminobenzóico (PABA), inibindo de forma competitiva a enzima diidropteroato sintetase. A trimetoprima inibe a

enzima diidrofolato redutase através de uma ligação reversível ao sítio ativo. Ambos os antibióticos apresentam efeito bacteriostático quando utilizados separadamente, mas têm efeito bactericida quando combinados. Assim, o uso desses antibióticos em cultura de tecidos precisa ser estudado com mais profundidade, pois pode afetar a síntese do ácido fólico em plantas, principalmente, em altas concentrações<sup>8</sup>. Salehi e Kosh-Khui (1997) sugerem a incubação dos explantes com soluções de antibiótico ao invés da incorporação deles ao meio de cultivo. Segundo os autores, esse procedimento diminui a contaminação endógena das bactéria em minirroseiras e não afeta o desenvolvimento normal do explante.



**Figura 6.** Teste de crescimento das bactérias no meio BDAL acrescido dos seguintes antibióticos: (A) Controle; (B) Ampicilina ( $150 \text{ mg.L}^{-1}$ ); (C) Canamicina ( $150 \text{ mg.L}^{-1}$ ); (D) Carbenicilina ( $150 \text{ mg.L}^{-1}$ ); (E) Cloranfenicol ( $150 \text{ mg.L}^{-1}$ ); (F) Estreptomicina ( $300 \text{ mg.L}^{-1}$ ); (G) Rifampicina ( $300 \text{ mg.L}^{-1}$ ); (H) Tetraciclina ( $150 \text{ mg.L}^{-1}$ ); (I) Sulfametoxazol + Trimetoprima ( $80 \text{ mg.L}^{-1} + 16 \text{ mg.L}^{-1}$ )

<sup>8</sup> Comunicação pessoal do Dr. Edwin Cossins a primeira autora em 2005.



**Figura 7.** Efeito do antibiótico no controle do crescimento de bactéria endógena.

Tratamentos: (1) Meio MS 1/2 força (controle); (2) Meio MS 1/2 força + 40 mg.L<sup>-1</sup> de sulfametaxazol + 16 mg.L<sup>-1</sup> de trimetoprima; (3) Meio MS 1/2 força + 60 mg.L<sup>-1</sup> de sulfametaxazol + 24 mg.L<sup>-1</sup> de trimetoprima; (4) Meio MS 1/2 força + 80 mg.L<sup>-1</sup> de sulfametaxazol + 32 mg.L<sup>-1</sup> de trimetoprima; (5) Meio MS 1/2 força + 80 mg.L<sup>-1</sup> de sulfametaxazol; (6) Meio MS 1/2 força + 32 mm.L<sup>-1</sup> de trimetoprima.

Os resultados demonstram que o composto Sulfametaxazol + Trimetoprima controla o crescimento da bactéria (branca) a partir da concentração 80 mg.L<sup>-1</sup> de sulfametaxazol + 32 mg.L<sup>-1</sup> de trimetoprima. No entanto, a utilização de sulfametaxazol (80 mg.L<sup>-1</sup>) separadamente da trimetoprima também controla o desenvolvimento da bactéria, enquanto o uso somente da trimetoprima não é suficiente para esse controle (Figura 7). No entanto, ambos não controlam outra bactéria, de cor rosada, sendo necessária a utilização de outro antibiótico. Serão realizados novos estudos para verificar a melhor combinação de antibióticos para controlar ambas as bactérias.

## Conclusões

- 1 Os tratamentos contendo Tween na solução de hipoclorito, seguido de incubação com Benomyl e cloranfenicol apresentam os melhores resultados de descontaminação superficial de microestacas de mangueira.
- 2 O aquecimento da solução de Benomyl e cloranfenicol não aumenta a eficiência de descontaminação superficial.
- 3 A utilização de cloranfenicol não impede o desenvolvimento de bactérias no meio de cultura.
- 4 A sonicação e o tempo de incubação nas soluções de Benomyl aumentam a eficiência do processo de descontaminação superficial.
- 5 As matrizes no campo apresentam diferentes concentrações de inóculo, o que influencia a eficiência dos métodos de descontaminação de explantes.
- 6 O sulfato de cobre em concentrações superiores a 25 mg. L<sup>-1</sup> é eficiente para o controle de fungos endógenos, no entanto, é ineficiente no controle da bactéria endógena.
- 7 O uso de sulfametaxazol controla uma das bactérias endógenas, mas é necessário adição de outro antibiótico para o controle de outra cepa de bactéria.

## Referências

ALBERS, M. R. J.; KUNNEMAN, B. P. A. M. Micropropagation of *Paeonia*. *Acta Horticulturae*, v. 314, p. 85-92, 1992.

- AMMIRATO, P. V. Embriogenesis. In: EVANS, P. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture**. New York: MacMillan, 1983. v.1, p. 82-123.
- ANDRADE, S. R. M.; PINTO, A. C. Q.; FALEIRO, F. G.; CORDEIRO, M. C. R.; RAMOS, V. H. V. Descontaminação de gemas laterais de mangueira (*Mangifera indica* L.) visando a micropropagação. **Proceedings of Interamerican Society of Tropical Horticulturae**, v.47, p. 188-190, 2003.
- CHAWLA, H. S. Sterilization Techniques. In: CHAWLA, H. S. (Ed.). **Plant biotechnology: a practical approach**. Enfield: Science Publishers, 2003. p. 17-22.
- CORDEIRO, M. C. R.; CID, L. P. B.; PINTO, A. C. Q.; GOMES, A. C.; ANDRADE, S. R. M.; RAMOS, V. H. V. **Ensaio preliminares para o estabelecimento de um protocolo de assepsia, visando à micropropagação de cultivares de mangueira**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2002. 20 p. (Embrapa Cerrados. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 43).
- CRUZ, C. D. **Programa Genes**. Viçosa: UFV, 1997. 443 p.
- DEWALD, S. G.; LITZ, R. E.; MOORE, G. A. Maturation and germination of mango somatic embryos. **Journal of American Society of Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 114, p. 837-841, 1989b
- DEWALD, S. G.; LITZ, R. E.; MOORE, G. A. Optimizing somatic embryo production in Mango. **Journal of American Society of Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 114, p. 712-716, 1989a.
- FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI: Embrapa CNPH, 1998. p. 21-43.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa SPI: Embrapa CNPH, 1998. p. 183-260.
- HALDEMAN, J. H. ; THOMAS, R. L.; McKAMY, D. L. Use of benomyl and rifampicin for in vitro shoot tip culture of *Camellia sinensis* and *C. japonica*. **HortScience**, Alexandria, v. 22, p. 306-307, 1987.
- HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip, and bud cultures. In: EVANS, P. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture**. New York: MacMillan, 1983. v.1, p. 177-227.

JAIN, S. M. Tissue culture-derived variation in crop improvement. **Euphytica**, v. 118, p. 153-166, 2001.

LITZ, R. E. Biotechnology and mango improvment. **Acta Horticulturae**, v. 645, p. 85-92, 2002.

LITZ, R. E. *In vitro* somatic embryogenesis from nucellar callus of monoembryonic *Mangifera indica* L. **HortScience**, Alexandria, v. 19, p. 715-717, 1984a.

LITZ, R. E. *In vitro* strategies for tropical fruit improvment. In: DHAWAN, V. (Ed.). **Applications of Biotechnology in Forestry and Horticulture**. New York: Plenum, 1989. p. 109-118.

LITZ, R. E. Somatic embryogenesis in tropical fruit trees. In: HENCKE, R. R.; HUGHES, K. W.; CONSTANTIN, M. J.; HOLLAENDER, A. (Ed.). **Tissue culture in forestry and agriculture**. New York: Plenum, 1984b. p. 179-193.

LITZ, R. E.; HENDRIX, R. C.; MOON, P. A.; CHAVEZ, V. M. Induction of embryogenic mango cultures as affected by genotype, explanting, 2,4-D and embryogenic nurse culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 53, p.13-18, 1998.

LITZ, R. E.; JAISWAL, V. S. Micropropagation of tropical and subtropical fruits. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation**. Netherland: Kluwer, 1991. p. 247-263.

LITZ, R. E.; KNIGHT, R. J.; GAZIT, S. *In vitro* somatic embryogenesis from *Mangifera indica* L. callus. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 22, p. 233-240, 1984.

MERCURE, E. **Re: fungicide or surface sterilization protocol** [mensagem em lista de discussão]. Disponível em: <<http://plant-tc.coafes.umn.edu/listserv/2003/log0303/msg00050.html>> Acesso em: 25 ago. 2003.

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.

PAUL, A-L.; SEMER, C.; KUCHARREK, T.; FERL, R. J. The fungicidal and phytotoxic properties of benomyl and PPM in supplemented agar media supporting transgenic arabidopsis plants for Space Shuttle flight experiment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, p. 480-485, 2001.

PHILLIPS, R.; ARNOTT, S. M.; KAPLAN, S. E. Antibiotics in plant tissue culture: rifampicin effectively controls bacterial contamination without affecting the growth of short-term explant cultures of *Helianthus tuberosus*. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 21, p. 235-240, 1981.

RAGUVANSHI, 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, 1995.

RAZDAN, M. K. Aseptic manipulation. In: RAZDAN, M. K. (Ed.). **Introduction to plant tissue culture**. 2nd ed. Enfield: Science, 2003. p. 35-40.

SALEHI, H.; KHOSH-KHUI, M. A simple procedure for disinfection of 'Baby Masquerade' miniature rose explants. **Scientia Horticulturae**, v. 68, p. 145-148, 1997.

SHARMA, R. R.; SINGH, S. K. Etiolation reduces phenolic content and polyphenol oxidase activity at the pre-culture stage and *in-vitro* exudation of phenols from mango explant. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 79, p. 94-99, 2002.

THOMAS, P. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from nucellar tissue of monoembryonic mango. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 74, p. 135-139, 1999.

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**, Asfort-Kent, v. 72, n. 5, p. 713-722, 1997.

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.