

**Controle do Crescimento e
Identificação de Microrganismos
Contaminantes Visando à
Micropropagação de Gemas
Laterais de Mangueira**



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

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 217

Controle do Crescimento e Identificação de Microrganismos Contaminantes Visando à Micropropagação de Gemas Laterais de Mangueira

Solange Rocha Monteiro de Andrade

Welmo Costa de Oliveira

Fábio Bueno dos Reis Junior

Maria José d'Ávila Charchar

Fábio Gelape Faleiro

Angela Mehta

João Batista Teixeira

José Ricardo Peixoto

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

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *José de Ribamar N. dos Anjos*

Secretária-Executiva: *Maria Edilva Nogueira*

Supervisão editorial: *Fernanda Vidígal Cabral de Miranda*

Equipe de Revisão: *Fernanda Vidígal Cabral de Miranda*

Francisca Elijani do Nascimento

Jussara Flores de Oliveira Arbués

Normalização bibliográfica: *Marilaine Schaun Pelufê*

Editoração eletrônica: *Wellington Cavalcanti*

Capa: *Wellington Cavalcanti*

Foto(s) da capa: *Solange Rocha Monteiro de Andrade*

Impressão e acabamento: *Divino Batista de Souza*

Alexandre Veloso

Impresso no Serviço Gráfico da Embrapa Cerrados

1ª edição

1ª impressão (2008): 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).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Cerrados

C764 Controle do crescimento e identificação de microrganismos contaminantes visando à micropropagação de gemas laterais de mangueira / Solange Rocha Monteiro de Andrade... [et al]. – Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2008. 27 p. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Cerrados, ISSN 1676-918X ; 217).

1. *Mangifera indica*. 2. Cultura de tecido. 3. Microorganismo. 4. Fungo. 5. Bactéria. I. Andrade, Solange Rocha Monteiro de. II. Série.

634.44 - CDD 21

© Embrapa 2008

Sumário

Resumo	5
Abstract.....	6
Introdução.....	7
Material e Métodos.....	9
Obtenção dos explantes.....	9
Identificação de fungos.....	9
Identificação da bactéria	10
Avaliação do efeito de fungicidas nas matrizes do campo experimental	11
Avaliações do efeito de fungicidas acrescidos em meio de cultura.....	11
Avaliação de diferentes tipos de manejo nas estacas em campo experimental	12
Avaliação do efeito de extrato de própolis no crescimento das bactérias.....	13
Resultados e Discussão.....	14
Identificação de fungos.....	14

Identificação da bactéria	16
Avaliação do efeito de fungicidas nas matrizes do campo experimental	17
Avaliações do efeito de fungicidas acrescidos em meio de cultura	19
Avaliação de diferentes tipos de manejo nas estacas em campo experimental	21
Avaliação do efeito de extrato de própolis no crescimento das bactérias.....	22
Conclusões.....	24
Referências	24

Controle do Crescimento e Identificação de Microrganismos Contaminantes Visando à Micropropagação de Gemas Laterais de Mangueira

*Solange Rocha Monteiro de Andrade*¹; *Welmo Costa de Oliveira*²; *Fábio Bueno dos Reis Junior*³; *Maria José d'Ávila Charchar*⁴; *Fábio Gelape Faleiro*⁵; *Angela Mehta*⁶; *João Batista Teixeira*⁷; *José Ricardo Peixoto*⁸

Resumo

Objetivou-se aprimorar os protocolos de descontaminação superficial, identificar os fungos e bactérias e controlar o crescimento dos microrganismos endógenos. Foram identificados 9 gêneros de fungos, e verificou-se que a contaminação por fungos é proveniente de fragmentos de tecido externos. Foi testado o efeito dos seguintes fungicidas no campo: 20 g.L⁻¹ Tebuconazole, 20 g.L⁻¹ de Mancozeb, 20 g.L⁻¹ de Procimidona. Não houve diferença significativa entre os tratamentos. Foi avaliado o efeito in vitro dos seguintes fungicidas: 2 g.L⁻¹ de Tebuconazole; 2 g.L⁻¹ de Mancozeb; 2 g.L⁻¹ de Procimidona; 2 g.L⁻¹ de Benzimidazol e testemunha sem fungicida. O Tebuconazole apresentou maior eficiência no controle de fungos presentes na superfície do explante. Avaliações da bactéria, denominada "B", demonstraram que ela é Gram Negativa, apresenta colônias chatas e circulares, de aspecto seco e coloração branca. Análise por sequenciamento parcial do gene 16S RNAr identificou que deve ser filogeneticamente próxima aos gêneros *Asaia* e *Swaminathania*. O extrato de própolis foi eficiente no controle do crescimento da bactéria nas concentrações 0,5 e 1% ao contrário da própolis bruta que não controlou o crescimento da bactéria.

Termos para indexação: Cultura de tecidos, micropropagação, *Mangifera indica* L., descontaminação, antibióticos, fungicidas.

¹Bióloga, D.Sc., Pesquisadora da Embrapa Cerrados, solange@cpac.embrapa.br

²Aluno da Universidade de Brasília, Bolsista PIBIC / Embrapa Cerrados

³Engenheiro Agrônomo, D.Sc., Pesquisador da Embrapa Cerrados, fabio@cpac.embrapa.br

⁴Engenheira Agrônoma, Ph.D., Pesquisadora aposentada da Embrapa Cerrados

⁵Engenheiro Agrônomo, D.Sc., Pesquisador da Embrapa Cerrados, ffaleiro@cpac.embrapa.br

⁶Bióloga, D.Sc., Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, amehta@cenargen.embrapa.br

⁷Engenheiro Agrônomo, Ph.D, Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, batista@cenargen.embrapa.br

⁸Engenheiro Agrônomo, D.Sc., Professor Adjunto, Universidade de Brasília, peixoto@unb.br

Control of Growth and Identification of Microorganisms Contaminants at in Vitro Propagation of Lateral Mango Buds

Abstract

The objective was to improve the protocols for surface decontamination, and identify the fungi and bacteria, and control bacteria and fungi growth. We identify 9 genera of fungi, and found that the contamination by fungi came from external fragments of tissue. We tested the effect of the following fungicides at the experimental field: 20 gL⁻¹ Tebuconazole, 20 gL⁻¹ of Mancozeb, 20 gL⁻¹ Procymidone. There was no significant difference between treatments. The in vitro effect of the fungicides were tested. The active principle Tebuconazole showed higher efficiency in the control of fungi on the surface of the explant. Evaluations of the bacteria, called "B", demonstrated that it is Gram negative, has flat and circular colonies of white color. Analysis by partial sequencing of 16S rRNA gene identified that it could be phylogenetically close to the genera and Asaia and Swaminathania. The extract of propolis was effective in controlling the growth of bacteria at concentrations 0.5 and 1% in contrast to the crude propolis which did not controlled the growth of the bacteria.

Index terms: plant tissue culture, micropropagation, Mangifera indica L., decontamination, antibiotics, fungicides.

Introdução

A cultura de tecidos de mangueira pode ser utilizada como técnica de propagação massal e clonal nos programas de melhoramento, pois permite a rápida obtenção de indivíduos para avaliação com diversas repetições e em diversos ambientes. Por meio da técnica de micropropagação, é possível fixar os ganhos genéticos obtidos pelo melhoramento, capturando e fixando os componentes aditivos de variância genética (GUERRA; NODARI, 2006). Além disso, a micropropagação de mangueira tem sido proposta para estudos e obtenção de porta enxertos provenientes de cultivares de sementes monoembriogênicas, rápida obtenção de plântulas de cultivares anões selecionadas e, por fim, para atuar no manejo a médio e curto prazo dos recursos genéticos (LITZ, 2004).

Na micropropagação de mangueira, até o presente momento, foi obtido sucesso somente por embriogênese somática utilizando nucelo de embriões zigóticos imaturos (LITZ, 2004; KRISHNA; SINGH, 2007). Contudo, essa metodologia apresenta alta ocorrência de variação somaclonal, a qual é inconveniente quando o objetivo é obter clones de genótipos de interesse. Outro problema se refere ao curto período de disponibilidade dos frutos imaturos no estágio adequado para a introdução *in vitro* (KRISHNA; SINGH, 2007). Existem relatos de indução de organogênese a partir de explantes como folhas (RAGHUVANSHI; SRIVASTAVA, 1995), ápices caulinares (THOMAS; RAVINDRA, 1997), cotilédones (RAO et al., 1981), epicótilo (SINGH et al., 1999) e entrenós (KRISHNA; SINGH, 2007), no entanto, em muitos casos, houve relato de obtenção de calos, mas baixo sucesso de regeneração (LITZ, 2004; KRISHNA e SINGH, 2007).

Pesquisadores da Austrália, Índia e Brasil 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 dos explantes, a exsudação de fenóis no meio de cultivo, necrose prematura do explante e

recalcitrância dos tecidos ao cultivo in vitro (LITZ, 2004; KRISHNA; SINGH, 2007).

Durante o desenvolvimento de um protocolo de propagação, muitas vezes o explante é proveniente do campo. Segundo Benson (2000), a fisiologia da planta doadora, a manipulação in vitro e o estresse do cultivo in vitro são fatores primordiais para o sucesso da micropropagação. Assim a saúde das plantas afeta tanto a qualidade fisiológica da planta e sua competência em responder aos estímulos do meio de cultura quanto na contaminação por microrganismos, pois as matrizes em campos experimentais estão expostas aos mais diversos tipos de microrganismos.

Além disso, os meios de cultivo são ricos em macro e micronutrientes, vitaminas e alguma fonte de energia, sendo que esses meios, essenciais para o desenvolvimento da nova plântula, também são altamente nutritivos para os microrganismos, que, uma vez estabelecidos, desenvolvem-se rapidamente, depletando os nutrientes, produzindo toxinas e podendo até matar o explante (GRATAPLAGIA; MACHADO, 1998).

No Laboratório de Biologia Celular e Cultura de Tecidos da Embrapa Cerrados tem-se estudado diferentes metodologias para solucionar esse problema. Os resultados demonstraram que, para diminuir a contaminação por fungos exógenos, os explantes precisavam de uma limpeza inicial em água de torneira com detergente neutro, seguido de tratamento em solução de hipoclorito de sódio 1 % e Tween 80, finalizando com sonicação de 15 segundo em 500 mg.L⁻¹ Benomyl e suspensão de 15 minutos na mesma solução. No entanto, esse processo de descontaminação diminuiu principalmente os contaminantes superficiais, permanecendo o problema da contaminação endógena (ANDRADE et al., 2005).

Neste projeto, objetivou-se aprimorar os protocolos de descontaminação superficial, identificar os fungos e as bactérias e controlar o crescimento dos microrganismos endógenos. Para alcançar

esses objetivos, foram realizados experimentos de controle no campo experimental, adição de antibióticos e fungicidas ao meio de cultura, além de estudos preliminares para identificação e localização dos focos de inóculos.

Material e Métodos

Obtenção dos explantes

Os explantes foram coletados no campo experimental de fruticultura da Embrapa Cerrados (Fig. 1), localizado em Planaltina, DF, km 18 da BR 020, Rodovia Brasília/Fortaleza.



Fotos: Solange R. M. de Andrade

Fig. 1. Campo Experimental de mangaueira da Embrapa Cerrados.

Identificação de fungos

Os explantes coletados foram descontaminados superficialmente conforme protocolo (ANDRADE et al., 2005) e inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Aos 10 a 15 dias após a inoculação,

foram visualizados fungos diversos. Esses fungos foram isolados por transferência para placas de Petri contendo o meio de cultura batata-dextrose-ágar com estreptomicina, e o gênero foi identificado pela avaliação morfológica das estruturas dos fungos.

Visando observar a origem do foco de contaminação por fungos em segmentos nodais, foram obtidos fragmentos de tecido interno e externo dos explantes de estacas de diferentes idades (jovens e adultas), em três cultivares (Alfa, Roxa e Tommy Atkins). Os fragmentos foram submetidos a desinfestação superficial em álcool 70 %, seguido de 2 minutos em hipoclorito de sódio 1 % e lavados com água estéril, cujo excesso foi removido em papel de filtro esterilizado. Em seguida, as amostras foram incubadas em meio BDA com 12 horas de luz a 25 °C, durante uma semana.

Identificação da bactéria

Aos 5 dias após a inoculação do explante em meio de cultura, foi detectada uma bactéria com colônia de coloração branca e de crescimento rápido, que foi isolada em meio AB e batizada preliminarmente como Bactéria "B". A extração do DNA total dessa bactéria foi feita com a utilização do Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). A amplificação do gene 16S RNAr foi realizada 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). A amplificação foi realizada com uma desnaturação inicial a 94 °C por 1 minuto, seguida de 40 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 65 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos. O produto amplificado foi clonado utilizando o pGEM T-Easy (Promega) e seqüenciado parcialmente em Seqüenciador Automático ABI Prism 3700 DNA Analyser (Applied Biosystems Inc.). A homologia da seqüência foi analisada utilizando o programa Blast (ALTSCHUL et al., 1997). Além da coloração de Gram, 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).

Avaliação do efeito de fungicidas nas matrizes do campo experimental

Os experimentos foram realizados com a cultivar Tommy Atkins. Estacas das matrizes foram submetidas a um tratamento de pré-assepsia em uma porção de aproximadamente 20 cm nas estacas na seguinte ordem: poda dos ápices e das folhas; lavagem superficial com solução de água e detergente; lavagem com água; e submetidos à aplicação de fungicidas: (1) 20 g.L⁻¹ Tebuconazole (Folicur®), (2) 20 g.L⁻¹ Mancozeb (Manzate®) e (3) 20 g.L⁻¹ Procimidona (Sialex®).

Dois dias após esse tratamento, as estacas foram coletadas, subdivididas em segmentos nodais e submetidas ao protocolo de descontaminação superficial (ANDRADE et al., 2005). Após a descontaminação superficial, os explantes foram inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 3 % sacarose, 1 mg.L⁻¹ BAP, 25 mg.L⁻¹ de sulfato de cobre (CuSO₄), 150 mg.L⁻¹ canamicina, 80 mg.L⁻¹ sulfametaxazol e 32 mg.L⁻¹ trimetoprima. Depois de três dias, foram transferidos para o mesmo meio contendo ágar 0,8 %, e transferidos para câmara de crescimento (ANDRADE et al., 2005).

Avaliou-se, então, a porcentagem de contaminação por fungos aos 7, 10, 12, 14, 17, 19 e 21 dias após a inoculação dos segmentos nodais em meio de cultura.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com quatro repetições, em arranjo de parcela subdividida, sendo as parcelas formadas pelas 7 épocas de avaliação e as subparcelas formadas pelos 3 fungicidas, totalizando 21 tratamentos, sendo a unidade experimental formada por dez explantes.

Avaliações do efeito de fungicidas acrescidos em meio de cultura

Os experimentos foram realizados com a cultivar Tommy Atkins. Depois de realizada a descontaminação superficial dos segmentos nodais conforme protocolo (ANDRADE et al., 2005), estes explantes

foram inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) semi-sólido com os seguintes tratamentos: (1) 2 g.L⁻¹ de fungicida Tebuconazole (Folicur_{200CE}[®]); (2) 2 g.L⁻¹ de Mancozeb (Manzate₈₀₀[®]); (3) 2 g.L⁻¹ de Procimidona (Sialex₅₀₀[®]); (4) 2 g.L⁻¹ de Benzimidazol (Derosal[®]); e (5) testemunha sem fungicida. As avaliações foram feitas aos 3, 5, 7, 10, 12, 14, 17, 19, 21 e 24 dias após inoculação em meio semi-sólido, de acordo com o percentual de contaminação por fungos.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com quatro repetições, em arranjo de parcela subdividida, sendo as parcelas formadas pelas 10 épocas de avaliação e as subparcelas formadas pelos 4 fungicidas + controle, totalizando 50 tratamentos, sendo a unidade experimental formada por dez explantes.

Avaliação de diferentes tipos de manejo nas estacas em campo experimental

Estacas de mangueira com porção terminal de aproximadamente 20 cm das cultivares Alfa e Roxa foram submetidas aos seguintes tratamentos no campo: (a) corte das folhas e dos ápices; (b) eliminação das folhas; e (c) manutenção das folhas e dos ápices, constituindo o tratamento-controle (Fig. 2).



Fig. 2. Tratamentos das estacas de mangueira (*Mangifera indica* L.) no campo experimental: corte de folhas e ápices (a); corte de folhas (b); manutenção de folhas e ápices (controle) (c).

Depois de 2, 9 e 16 dias, as estacas foram coletadas e levadas para o laboratório, submetidas a descontaminação superficial (ANDRADE et al., 2005) e inoculadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) 3 % líquido, acrescido de 1 mg.L^{-1} BAP, 25 mg.L^{-1} de sulfato de cobre (CuSO_4), 150 mg.L^{-1} canamicina; 80 mg.L^{-1} sulfametaxazol e 32 mg.L^{-1} trimetoprima (ANDRADE et al., 2005). Após cinco dias, os explantes foram transferidos para meio MS 3 % com 0,8 % de ágar.

As avaliações ocorreram aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação. O experimento foi montado em delineamento fatorial triplo, sendo 2 cultivares, 3 tratamentos no campo, 3 épocas de coleta e 3 repetições(blocos)/diferentes épocas de avaliação. Os dados foram transformados em $\text{arc sen } P\%/100$, e submetidos à análise de variância, sendo a unidade experimental formada por dez explantes.

Avaliação do efeito de extrato de própolis no crescimento das bactérias

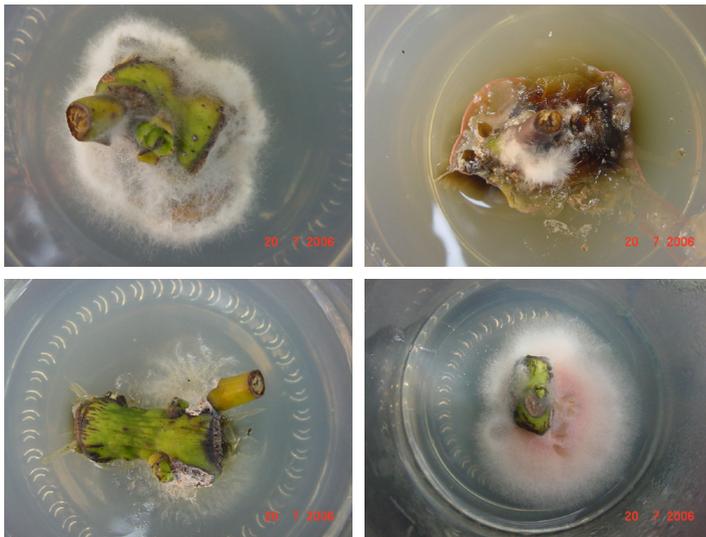
As bactérias foram inoculadas em meio AB adicionando diferentes concentrações de própolis a partir de própolis bruta e extrato de própolis 11 %. A própolis bruta foi desidratada em estufa $70 \text{ }^\circ\text{C}$ por 72 horas, moída, pesada e acrescentada ao meio antes de autoclavar. O extrato de própolis comercial a 11 % em álcool foi diluído no meio após a autoclavagem. Os tratamentos foram os seguintes:

1. Controle 1 (sem antibióticos).
2. Controle 2 (80 mg.L^{-1} Sulfametoxazol + 16 mg.L^{-1} Trimetoprima).
3. Própolis 0,1 % p/v.
4. Própolis 0,5 % p/v.
5. Própolis 1 % p/v.
6. Própolis 0,1 % v/v.
7. Própolis 0,5 % v/v.
8. Própolis 1 % v/v.

Resultados e Discussão

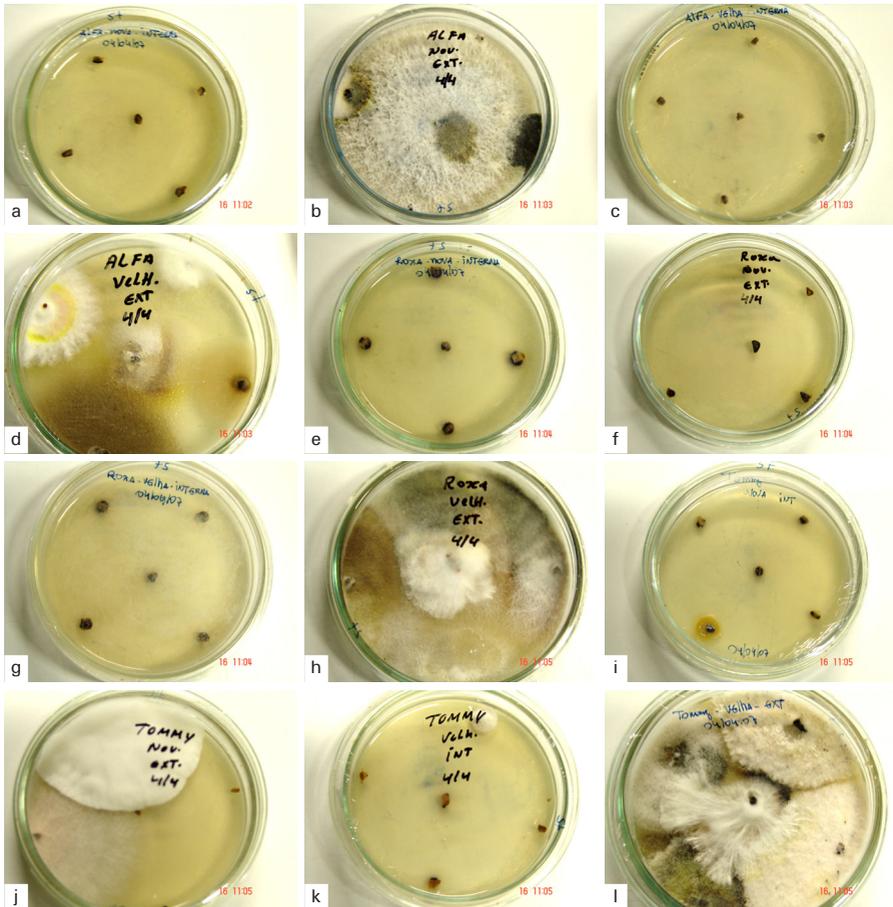
Identificação de fungos

Foram identificados fungos pertencentes aos seguintes gêneros: *Curvularia* sp., *Fusarium* sp. e *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp., *Helminthosporium* sp., *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *Gliocadium* sp., *Penicillium* sp. e fungos do grupo de leveduras (Fig. 3). Segundo Leifert e Cassels (2001), o tipo de microrganismo encontrado no meio nutritivo pode ser um indicador do tipo de problema durante o processo de desinfestação. Alguns fungos como *Alternaria alternata*, *Colletotrichum* spp., *Dothiorella* spp. e *Fusarium subglutinans* têm apresentado infecções latentes em cultura de ápices e panículas de mangueiras (KRISHNA; SINGH, 2007). Segundo esses autores, esses contaminantes latentes estariam distribuídos no tecido vegetal em células do córtex, xilema, floema e parênquima. No entanto, os resultados obtidos com fragmentos de tecidos não corroboram essa hipótese, pois demonstraram que, nas três cultivares, independente da idade do tecido, as contaminações eram oriundas somente do tecido externo (Fig. 4).



Fotos: Solange R. M. de Andrade

Fig. 3. Fungos presentes em meio de cultura após inoculação dos explantes.



Fotos: Welmo Costa de Oliveira

Fig. 4. Placas contendo fragmentos de tecido interno e externo de estacas jovens e adultas de segmentos nodais de três cultivares de manga (*Mangifera indica* L.): Alfa/jovem/interno (a); Alfa/jovem/externo (b); Alfa/adulto/interno(c); Alfa/adulto/externo (d); Roxa/jovem/interno (e); Roxa/jovem/externo (f); Roxa/adulto/interno (g); Roxa/adulto/externo (h); Tommy/jovem/interno (i); Tommy/jovem/externo (j); Tommy/adulto/interno (k); Tommy/adulto/externo (l).

Assim, a gama de fungos identificada sugere a necessidade de um tratamento das matrizes no campo experimental, conforme indicado por Oliveira e colaboradores (2000) e Gratapaglia e Machado (1998), e de aprimoramento do protocolo de descontaminação superficial dos explantes.

Identificação da bactéria

Foi identificado que a bactéria isolada e denominada “B” é Gram Negativa, apresentando colônias chatas e circulares com diâmetro de aproximadamente 2 mm, de aspecto seco e coloração branca em meio AB (Fig. 5). A amplificação do gene 16S RNAr revelou uma banda única de aproximadamente 1,4 kb. Foi realizado sequenciamento parcial do gene 16S RNAr e 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 *Swaminathania salitolerans* (AF459454.1). Ambas as espécies são aceto-bactérias, próximas filogeneticamente (LOGANATHAN; NAIR, 2004) e podem apresentar 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 podemos sugerir que a bactéria “B” deve ser filogeneticamente próxima aos gêneros *Asaia* e *Swaminathania*.



Fig. 5. Detalhe das colônias da Bactéria “B”.

Foto: Solange R. M. de Andrade

Com o intuito de confirmar a identificação da Bactéria “B”, comparações foram feitas com informações baseadas nos trabalhos de identificação das espécies *A. bogorensis* (YAMADA et al., 2000) e *S. salitolerans* (LOGANATHAN; NAIR, 2004) (Tabela 1). Segundo os trabalhos de descrição das espécies, ambas são capazes de crescer com D-Manitol ou Glutamato como fonte de C exclusiva, e o mesmo comportamento foi apresentado pela Bactéria “B”. Uma característica

interessante da espécie *S. salitolerans* é a possibilidade de crescimento em meio LGI semi-sólido sem N, característica de bactérias diazotróficas associativas, que não foi apresentada por nossos isolados.

Esses resultados não foram suficientes para a confirmação da caracterização da Bactéria "B", sendo necessária a realização de uma maior bateria de testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos. A dificuldade em se conseguir os padrões de *A. bogorensis* e *S. salitolerans* foi fator decisivo para que os testes não fossem conclusivos, e a obtenção dessas estirpes, encontradas apenas em coleções internacionais, será primordial para a continuação desse trabalho.

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

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

ND – Não determinado.

Avaliação do efeito de fungicidas nas matrizes do campo experimental

Os experimentos para avaliar o efeito de fungicidas em campo não apresentaram diferenças significativas. No entanto, o fungicida de princípio ativo Mancozeb apresentou melhor resultado quando comparado ao Tebuconazole e ao Procimidona (Tabela 2 e Fig. 6).

Handa et al. (2001), trabalhando com diferentes explantes de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), realizaram o tratamento de plantas no campo com a aplicação de Benomyl (300 mg.L⁻¹), cujo princípio ativo é Benzimidazol, e relataram a ineficiência do tratamento, resultando em completa contaminação do material por fungos e bactérias.

Entre os tratamentos avaliados, o Mancozeb foi o único fungicida de contato, sendo os demais sistêmicos. Talvez o intervalo de dois dias entre a aplicação do produto e a coleta do material não tenha sido suficiente para surtir efeito e apresentar diferenças significativas. Apesar disso, os explantes tratados com Mancozeb se mantiveram, ao longo das avaliações, com o menor percentual de contaminação em relação aos outros, apresentando taxa de contaminação sempre abaixo das outras médias do experimento (Tabela 2 e Fig. 6). A aplicação do fungicida Tebuconazole na concentração de $1,5 \text{ ml.L}^{-1}$, apesar de não inibir *in vitro* o crescimento do fungo *Cylindrocladium candelabrum* em todas as lesões, foi capaz de inibir em mais de 20 % o crescimento do mesmo em fragmentos de folhas de Eucalipto coletadas depois de 48 horas da aplicação do fungicida (FERREIRA et al., 2006).

Tabela 2. Médias da porcentagem de explantes com fungos analisadas após três tratamentos com fungicidas.

Tratamentos	Porcentagem de explantes com fungos
Tebuconazole	37,85 a
Mancozeb	29,64 a
Procididona	46,07 a

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si, pelo teste de Duncan, a 1 % de probabilidade.

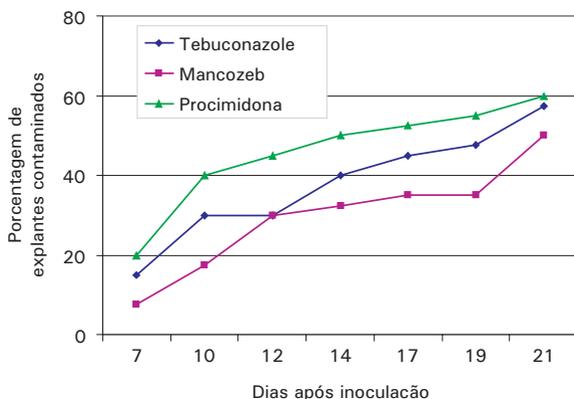


Fig. 6. Porcentagem de explantes contaminados em meio de cultura contendo três fungicidas, em 7 épocas de avaliação após a inoculação.

Avaliações do efeito de fungicidas acrescidos em meio de cultura

A análise de variância demonstrou que houve diferença significativa entre os tratamentos com os fungicidas. A presença do Tebuconazole apresentou maior eficiência de controle da contaminação quando comparado à média dos demais tratamentos (Tabela 3 e Fig. 7). O Mancozeb, diferente do experimento em campo, apresentou os maiores índices de contaminação. O Tebuconazole apresentou resultados semelhantes conforme o trabalho realizado por Ferreira et al. (2006), sendo altamente eficiente na inibição *in vitro* da germinação de conídios e do crescimento micelial de *C. candelabrum*. O Tebuconazole nas menores doses, 0,1 ppm e 1 ppm, da mesma forma, apresentou inibição *in vitro* tanto do crescimento micelial como da germinação de conídios, no controle de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* do morangueiro (KOSOSKI et al., 2001). Esses resultados indicam que a inclusão do Tebuconazole em meio de cultura é eficiente para controlar a contaminação fúngica em explantes de mangueira.

Tabela 3. Médias da porcentagem de explantes com fungos analisadas após cinco tratamentos com fungicidas.

Tratamentos	Porcentagem de explantes com fungo (média)
Tebuconazole	12,0 a
Benzimidazol	18,5 b
Procimidona	19,7 c
Controle	24,7 d
Mancozeb	27,7 e

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si, pelo teste de Duncan, a 1 % de probabilidade.

Como esperado, a porcentagem de contaminação aumentou a cada avaliação (Fig. 7). No entanto, todos os tratamentos mantiveram-se estáveis com nível de contaminação menor que 10 % até o 7º dia de avaliação. O meio contendo Tebuconazole mostrou curva de crescimento lenta, estabilizando-se praticamente no 14º dia após

inoculação com contaminação de explantes de 20 %. Os demais tratamentos apresentaram crescimento acentuado, sendo que o meio contendo Procimidona e Benzimidazol estabilizou o crescimento de fungos entre 35 % e 38 % por volta do 21º dia após inoculação. Estudo de crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* em explantes de mamoeiro demonstra que o uso do Tebuconazole foi o mais eficiente, quando comparado com fungicidas do grupo dos benzimidazóis, que mostraram baixa eficiência no controle do patógeno (TAVARES; SOUZA, 2005).

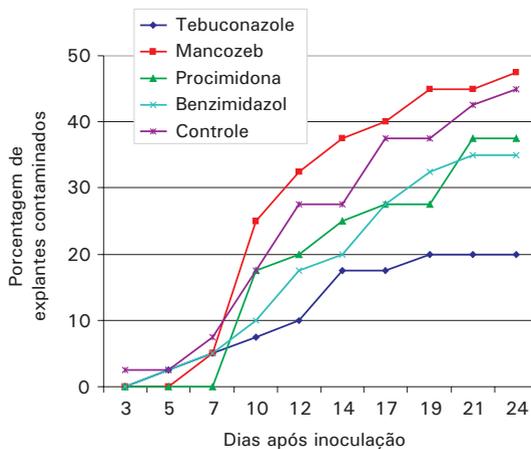


Fig. 7. Porcentagem de explantes contaminados em meio de cultura contendo quatro fungicidas, em 10 épocas de avaliação após a inoculação.

Corroborando nossos resultados, Teixeira (1997) observou que o fungicida Tebuconazole, na dose de 1,25 ppm, inibiu completamente o crescimento de isolados de *C. gloeosporioides*, e que o Mancozeb não foi capaz de inibir o crescimento micelial em meio BDA quando comparados com o tratamento testemunha. Lim e Wai (1986), observando o efeito in vitro de fungicidas sobre *Colletotrichum gloeosporioides* da mangueira, relataram que o Mancozeb desempenhou a menor ação tóxica em fungos nos valores de ED 50 superiores a 1.000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para crescimento micelial e esporulação, e valores acima de 2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para germinação, quando comparado aos demais fungicidas testados.

Avaliação de diferentes tipos de manejo nas estacas em campo experimental

As análises de variância demonstraram que houve diferenças significativas dependendo do genótipo, do tratamento no campo (Fig. 8) e da época de coleta (Fig. 9), bem como das interações genótipo e tratamento no campo, genótipo e época de coleta, e genótipo e tratamentos no campo e épocas de coleta.

Fica demonstrado, na Fig. 8, que não houve diferença entre os tratamentos para a cultivar Roxa. No entanto, a cultivar Alfa apresentou maior índice de contaminação no tratamento de corte de folha. Avaliando a Fig. 9, verificamos que a cultivar Alfa apresentou menores índices de contaminação aos 2 e 9 dias após o tratamento no campo. Por outro lado, a cultivar Roxa não demonstrou diferença no índice de contaminação entre as coletas aos 2 e 16 dias após o tratamento no campo, e os menores índices de contaminação foram observados aos 9 dias após o tratamento no campo. Os resultados indicam que os genótipos respondem de modo diferente às diferentes épocas de coleta do material.

Em experimento anterior (RADEL et al., 2006), foi demonstrado que o corte de ápices e folhas de mangueira coletadas 15 dias após o tratamento diminuíram a contaminação por fungos para a cultivar Roxa, o mesmo não ocorrendo para a cultivar Alfa.

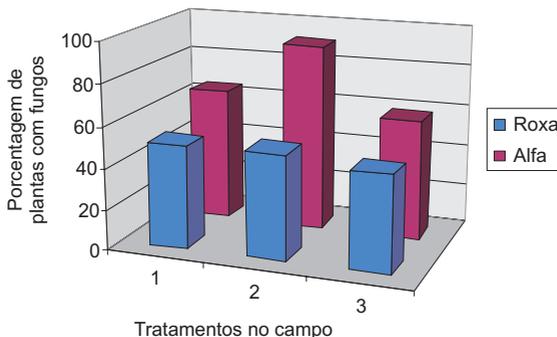


Fig. 8. Porcentagem de explantes contaminados por fungos após tratamento no campo. Tratamentos: corte de folha e ápices (1); corte folha (2); manutenção de folhas e ápices (controle) (3).

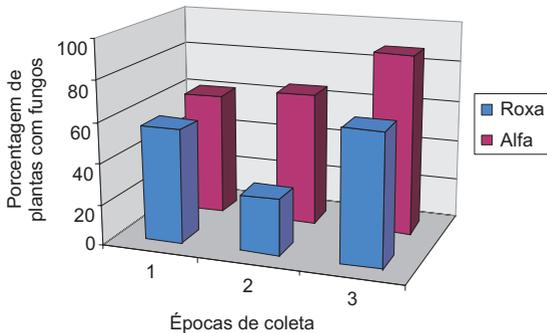


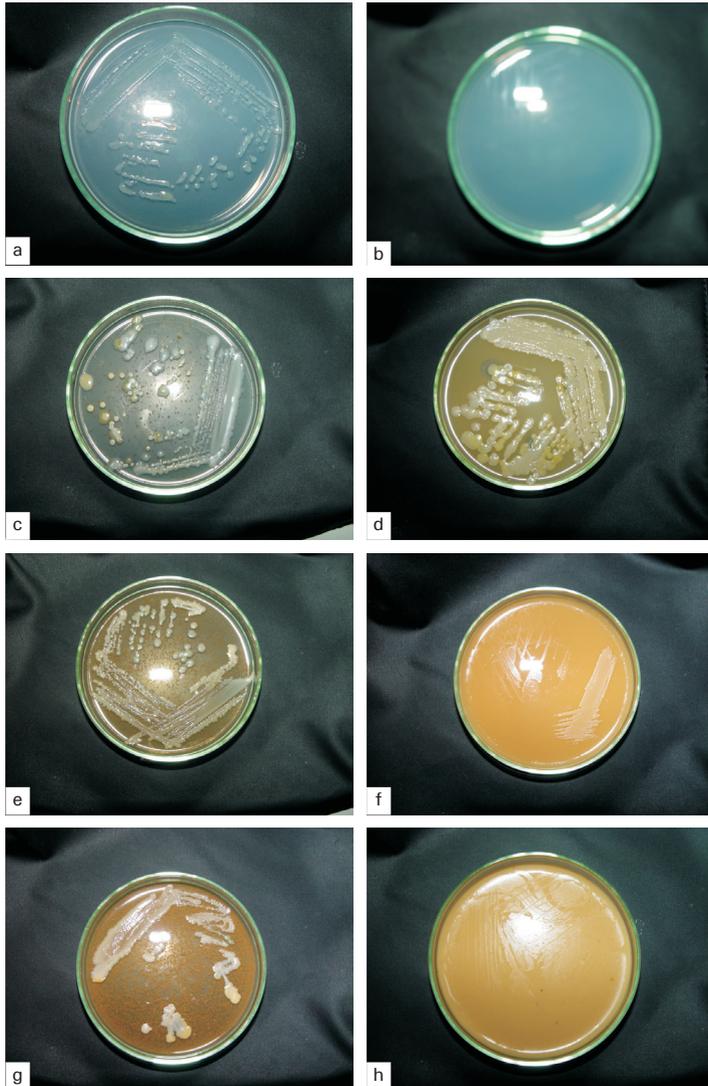
Fig. 9. Porcentagem de explantes contaminados por fungos em épocas de coleta. Tratamentos: 2 dias (1); 9 dias (2); 16 dias (3).

Esses resultados indicam que a contaminação fúngica é cultivar dependente, conforme demonstrado anteriormente por Cordeiro et al. (2002), além de ser matriz dependente, como demonstrado por Andrade et al. (2005). Assim, para identificar o efeito de cada variável, é necessário realizar experimentos com diferentes variedades e isolando cada tratamento.

Avaliação do efeito de extrato de própolis no crescimento das bactérias

O extrato de própolis foi eficiente no controle do crescimento da bactéria nas concentrações 0,5 % e 1 % (Fig. 10). No entanto, a bactéria se desenvolveu em todas as concentrações testadas nos meios contendo própolis bruta. É possível que o processo de secagem ou de autoclavagem do meio tenham afetado os princípios ativos contidos na própolis bruta. No entanto, Bianchini e Bedendo (1998), estudando o efeito da própolis em diversas espécies de bactéria, verificaram que a inclusão de extrato aquoso de própolis antes ou após a autoclavagem não afetava o resultado final. Esses autores sugerem o uso de própolis para controle de bactérias fitopatogênicas, entretanto não foram encontradas referências sobre o uso da própolis em cultura de tecidos. A própolis tem sido utilizada de maneira eficiente no controle de diversas espécies microbianas como *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Mycobacterium*, mas apresenta eficiência relativa para os gêneros *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus* e *Salmonella* (GRANGE; DAVEY, 1990). A inclusão de própolis na concentração

de 0,5 % foi testada no meio de cultivo utilizado para os testes com microestacas de manga, porém os explantes não sobreviveram nesse novo meio.



Fotos: Solange R. M. de Andrade

Fig. 10. Bactéria testada em relação aos seguintes antibióticos: controle (sem própolis) (a); Sulphamethoxazol + Trimethoprima (b); 0,1 % própolis (p/v) (c); 0,1 % própolis (v/v) (d); 0,5 % própolis (p/v) (e); 0,5 % própolis (v/v) (f); 1 % própolis (p/v) (g); 1 % própolis (v/v) (h).

Conclusões

A bactéria “B” é filogeneticamente próxima aos gêneros *Asaia* e *Swaminathania*.

Matrizes do campo apresentam uma gama de fungos, sugerindo a necessidade de utilização de fungicidas no campo experimental.

O crescimento e o desenvolvimento de fungos têm origem na região superficial dos explantes de segmentos nodais de mangueira.

O controle de crescimento de fungos em meio de cultura inoculados com segmentos nodais de mangueira exige tanto o tratamento das matrizes no campo, quanto a inclusão de fungicidas em meio de cultura.

O tratamento das matrizes com Mancozeb é eficiente para diminuir a contaminação fúngica, mas é preciso novos estudos para averiguar a necessidade de outros tratamentos.

O Carbedazim pode ser utilizado como substituto ao Benomyl nos protocolos de descontaminação superficial dos explantes.

A adição de 2 g.L⁻¹ Tebuconazole no meio de cultura é eficiente no controle do crescimento de fungos.

A contaminação fúngica é cultivar dependente.

Referências

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. LIPMAN, D. J. GAPPED BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ANDRADE, S. R. M.; PINTO, A. C. O.; FALEIRO, F. G.; CORDEIRO, M. C. R.; RAMOS, V. H. V.; TEIXEIRA, J. B. **Desenvolvimento e Avaliação de Protocolos para descontaminação de Explantes de manga Visando a Micropropagação**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005. 24 p. (Embrapa Cerrados. Boletim de Pesquisa, 153).

BENSON, E. E. Special symposium: in vitro recalcitrance. In vitro plant recalcitrance: an introduction. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 36, p. 141-148, 2000.

BIANCHINI, L.; BEDENDO, I. P. Efeito antibiótico do própolis sobre bactérias fitopatogênicas. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 55, p. 149-152, 1998.

BIASI, L. A.; KOLLER, O. C.; KAMPF, A. N. Micropropagação do abacateiro ouro verde a partir de segmentos nodais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 7, p. 1051-1058, jul. 1994.

CORDEIRO, M. C. R.; CID, L. P. B.; PINTO, A. C. de Q.; GOMES, A. C.; ANDRADE, S. R. M. de; VARGAS RAMOS, V. H. **Ensaio preliminar para o estabelecimento de um protocolo de assepsia, visando a micropropagação de cultivares de mangueira**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2002. 20 p. (Embrapa Cerrados. Boletim de Pesquisa, 43).

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI; Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB, 1995.

FERREIRA, E. M.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A.; MAFIA, R. G. Eficiência de fungicidas sistêmicos para o controle de *Cylindrocladium candelabrum* em Eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 5, set./out. 2006.

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, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPB, 1998.

GRANGE, J. M.; DARVEY, R. W. Antibacterial properties of própolis. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 38, p. 159-160, 1990.

GRATTAPLAGLIA, 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, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPB, 1998.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Apostila de Biotecnologia**. Florianópolis: CCA/UFSC, 2006. Disponível em: <http://www.ufsm.br/petagonomia/apostilas/biotecnologia_ufsc.pdf>. Acesso em: 29 jan. 2007.

HANDA, L.; SAMPAIO, P. T. B.; QUISEN, R. C. Estabelecimento in vitro de explantes de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 4., 2001, Goiânia. **Anais...** Goiânia: REDBIO, 2001. p. 97.

HOFFMANN, A.; FACHINELLO, J. C.; NACHTIGAL, J. C. Formas de propagação de plantas frutíferas. In: FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. (Ed.). **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 45-56.

HOFFMANN, A.; PASQUAL, M.; CARVALHO, G. R.; CHALFUN, N. N. J.; RAMOS, J. D. **Aplicações na propagação de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998.

JARDIM, L. S.; YUYAMA, K. Micropropagação *in vitro* de camu-camu na Amazônia Central. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 2, ago. 2005. Suplemento.

KOSOSKI, R. M.; FURLANETTO, C.; TOMITA, C. K.; CAFÉ-FILHO, A. C. Efeito de fungicidas em *Colletotrichum acutatum* e controle da antracnose do morangueiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 662-666, 2001.

KRISHNA, H.; SINGH, S. K. Biotechnological advances in mango (*Mangifera indica* L.) and their future implications in crop improvement – A review. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 223-243, 2007.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequences. In: STACKENBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic Acids Techniques in bacterail systematics**. New York: John Wiley, 1991. p. 115-175.

LEIFERT, C.; CASSELLS, A. C. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. **In Vitro Cellular Development Biology – Plant**, Columbia, v. 37, p. 133-138, 2001.

LIM, T. K.; WAI, O. C. Effects of selected fungicides *in vitro* on the mango anthracnose pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*. **Fitopatologia brasileira**, v. 11, p. 67-74, 1986.

LITZ, R. E. Biotechnology and mango improvement. **Acta Horticulturae**, v. 645, p. 85-92, 2004.

LOGANATHAN, P.; NAIR, S. *Swaminathania salitolerans* gen. nov., sp. nov., a salt-tolerant, nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacterium from wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1185-1190, 2004.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

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.

QUEIROZ, S. R. de O. D.; OLIVEIRA, V. M. S. de; RIOS, A. P. de S.; SANTANA, J. R. F. de; OSUNA, J. T. A.; CUNHA, A. C. R. da; NAPOMUCENO, C. F. Controle de contaminantes no estabelecimento *in vitro* de bulbilhos de sisal (*Agave sisalana* Perrine) coletados no município de Conceição do Coité - BA. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 2, ago. 2005. Suplemento.

RADEL, G.; ANDRADE, S. R. M.; FALEIRO, F. G.; PINTO, A. C. Q.; TEIXEIRA, J. B.; RAMOS, V. H. V.; SANTOS, J. B. Avaliação da contaminação *in vitro* por fungo, por bactéria e determinação de necrose em segmentos nodais em de duas cultivares de *Mangifera indica* L. In: ENCONTRO DE JOVENS TALENTOS DA EMBRAPA CERRADOS, 2., 2006, Planaltina, DF. **Resumos apresentados**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006. 39 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 152).

RAGHUVANSHI, S. S.; SRIVASTAVA, A. Plant regeneration of *Mangifera indica* using liquid shaker to reduce phenolic exudation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 41, n.1, p. 83-85, abr. 1995.

RAO, A. N.; SIN, Y. M.; KAHAGODA, N.; HUTCHINSON, J. F. Hutchinson, Cotyledon tissue culture of some tropical trees. In: RAO, A. N. (Ed.). **Tissue Culture of Economically Important Plants**. Singapore: COSTED and ANBS, 1981. p. 124-137. Proceedings of the International Symposium held at the Botany Department, National University of Singapore, Singapore, 28-30 April 1981.

SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; MARTINOTTO, C.; SILVA, L. C.; Controle da contaminação de explantes foliares e caulinares de pequi (*Cariocar brasiliense* CAMB.) visando o estabelecimento in vitro. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 2, ago. 2005. Suplemento.

SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Micropropagação de plantas frutíferas. In: FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. (Ed.). **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 155-173.

SINGH, S. K.; SHARMA, H. C.; SINGH, S. P.; KISHORE, P. B. K. Callus induction and root initiation from explants of zygotic embryos in mango hybrids. In: KISHOR, P. B. K. (Ed.). **Plant Tissue Culture and Biotechnology: emerging trends**. Hyderabad: Universities Press, 1999. p. 129-133.

SOUSA, S. A.; SILVA, R. P.; ALMEIDA, W. A. B.; LIMA, E. C.; VILA, M. T. R.; DIAS, N. O.; JOSÉ, A. R. S.; REBOUÇAS, T. N. H.; JOSÉ, A. R. S. Micropropagação a partir de ápice caulinar em jaqueira (*Artocarpus integrifolius* L.). **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 2, ago. 2005. Suplemento.

TAVARES, G. M.; SOUZA, P. E. Efeito de fungicidas no controle in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Ciência agrotécnica**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 52-59, jan./fev. 2005.

TEIXEIRA, R. V. R. Efeito in vitro de fungicidas em *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. e controle químico de patógenos da parte aérea do maracujazeiro em condições de campo no Distrito Federal. 67 f. Dissertação. (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, 1997.

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.

YAMADA Y.; KATSURA, K.; KAWASAKI, H.; WIDYASTUTI, Y.; SAONO, S.; SEKI, T.; UCHIMURA, T.; KOMAGATA, K. *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the alpha-Proteobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 2, p. 823-829, 2000.