

COMPARAÇÃO DE PROCEDIMENTOS PARA DESCONTAMINAÇÃO DE EXPLANTES DE MOGNO (*Swietenia macrophylla* KING¹)

Sebastião da Cunha LOPES²
Osmar Alves LAMEIRA³
Gerson Renan Luces FORTES⁴

RESUMO: O trabalho teve como objetivo comparar diferentes procedimentos para descontaminação de folhas, segmentos apical e nodal de mogno (*Swietenia macrophylla* King) provenientes de plantas crescidas em casa de vegetação. Na descontaminação dos segmentos apical e nodal foram testados nove procedimentos, duas soluções de NaClO, uma com o pH ajustado para seis, em duas concentrações 1 e 2%, e outra com o pH não ajustado na concentração de 2%; termoterapia a 40°C por uma hora; álcool a 70% por 2 e 30 minutos, e diferentes antibióticos como kanamicina, estreptomicina e ampicilina na concentração de 0,1mg.mL⁻¹. Na descontaminação de folhas foram utilizados álcool a 70 % por dois minutos; soluções de NaClO, por 15 minutos, a 0,5 ;1 e 2 % e 2% com adição de benomyl a 0,6%. Os segmentos apical e nodal foram cultivados posteriormente em ágar e as folhas em meio MS. Foi avaliada a percentagem de contaminação e diferenciado entre a contaminação por fungo e bactéria. Nos segmentos apical e nodal foi verificado, também, a percentagem de oxidação após sete dias de cultivo. A termoterapia associada ao óleo de copaíba e NaClO a 1% reduziu até 50% a contaminação por bactéria em segmento apical e nodal de mogno. A kanamicina foi o antibiótico mais eficiente para o controle de fungos, tanto em segmentos apicais quanto nodais, e ampicilina foi eficiente somente para segmentos apicais, todos com 0% de contaminação. Todos os procedimentos utilizados para a descontaminação de folhas de mogno foram eficientes, exceto o NaClO a 0,5% no controle de fungos.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: *Swietenia macrophylla*, Segmento Nodal, Assepsia, Cultura de Tecido.

COMPARISON OF DECONTAMINATION PROCEDURE OF MAHOGANY (*Swietenia macrophylla* KING) EXPLANTES

ABSTRACT: The objective of this work was to compare different procedures for the decontamination of leaves, apical and nodal mahogany plants grown in greenhouse. Nine procedures were tested for

¹ Aprovado para publicação 4.11.2003

Extraído da Dissertação apresentada pelo primeiro autor ao curso de mestrado em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas em 2000, financiada com recursos da Embrapa Amazônia Oriental.

² Engenheiro Agrônomo, M.Sc., Bolsista do CNPq

³ Engenheiro Agrônomo, Dr., Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental. E-mail: osmar@cpatu.embrapa.br

⁴ Engenheiro Agrônomo, Dr., Pesquisador da Embrapa Clima Temperado, CEP 96001-970 – Pelotas (RS)

segment decontamination: two solutions of NaOCl, one with the pH adjusted for six, in two concentrations 1 and 2%; other with the pH non adjusted in the concentration of 2%; heat therapy for 1 hour at 40°C; 70% alcohol, 2 and 30 min; 0,1 mg.mL⁻¹ kanamycin, streptomycin and ampicillin cultivated in 0,7% agar. In the decontamination of leaves was used 70% alcohol for 2 min; solutions of 0,5; 1 and 2% of NaOCl and 2,0% NaOCl added to 0,6% benomyl for 15 min. The apical and nodal segments were later cultivated in agar and the leaves in MS medium. Heat therapy associated to the copaiba oil and 1% NaOCl reduced the contamination of bacteria in mahogany apical and nodal segments up to 50%. The kanamycin was the most efficient antibiotic for the control of fungi in mahogany apical and nodal segment and ampicillin for the apical segment, both with 0% of contamination. All, but 0,5% NaOCl, procedures used for leaves decontamination were efficient in the fungi control.

INDEX TERMS: *Swietenia macrophylla*; Asepsis, Nodal Segment, Leaves Disc, Tissue Culture.

1 INTRODUÇÃO

O mogno, nome comum dado as espécies *Swietenia* spp, pertence à família Meliaceae. A espécie que ocorre no Brasil é a *Swietenia macrophylla* King. Esta espécie está distribuída naturalmente entre os paralelos de 18° Sul e 20° Norte de latitude (LAMB, 1966).

A intensa pressão de exploração gerada pela grande procura por parte do mercado externo está ocasionando a redução cada vez mais acelerada da espécie. Hoje em dia o mogno no Brasil está localizado principalmente na Região Amazônica, em reservas indígenas e em áreas protegidas por lei, principalmente, em terras indígenas, visto que cerca de um terço da área de abrangência do mogno está dentro destas áreas, ocasionando, desta forma, conflitos e invasões de terras, além de grande perda de recursos genéticos (VERÍSSIMO et al., 1995).

O mogno, além de apresentar problemas de regeneração natural, tem a produção de mudas comprometida, visto que a disseminação de sementes ocorre apenas num período do ano e a coleta se torna difícil, devido às árvores estarem localizadas no meio da mata e serem muito altas. Estes problemas têm levado a procura de alternativas para a propagação da espécie.

A utilização das técnicas de cultura de tecido e células tem auxiliado a multiplicação de muitas espécies lenhosas florestais que têm problemas para propagação (MELO et al., 1998).

A descontaminação é uma das etapas do processo de micropropagação, fazendo parte da fase um, preconizada por Murashige, (1974). As plantas provenientes de campo estão sujeitas à infestação por fungos e bactérias, na grande maioria não patogênicas. Contudo, ao se cultivarem tecidos vegetais *in vitro* o crescimento destes microorganismos pode ser acelerado a tal

ponto que passa a interferir no desenvolvimento dos explantes (GILADI; ATMAN; GOPEN, 1979).

Muitos tipos de explantes têm sido utilizados na tentativa de propagação de inúmeras espécies, entre eles: pecíolo; segmento internodal; fruto; eixo embrionário; raiz; cotilédones e folhas (FORTES, 1992). As dificuldades para o cultivo *in vitro* de plantas lenhosas, em relação às plantas herbáceas segundo relato de Young, Hutchins e Canfield (1984), está na baixa resposta a reguladores de crescimento aplicados exogenamente, na produção de compostos fenólicos é, principalmente, na ineficácia das técnicas tradicionais de desinfestação. Desta forma, protocolos de assepsia precisam ser desenvolvidos para que se possa utilizar explantes provenientes de campo, visto que a literatura sobre o assunto para o mogno ainda é escassa.

Este trabalho teve como objetivo comparar diferentes procedimentos para desinfestação de folhas, segmentos apicais e nodais de mogno provenientes de plantas crescidas em casa de vegetação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os explantes foram provenientes de plantas crescidas em casa de vegetação coberta com tela de sombrite a 50%. As sementes foram postas para germinar em substrato contendo torta de dendê e terra preta na proporção de 1:1. Os explantes foram coletados com auxílio de tesoura de poda e bisturi, em seguida foram imediatamente colocados em becker contendo água

destilada. No laboratório foram lavados com sabão líquido comercial, sendo enxaguados com água em abundância. Este experimento constou de dois ensaios, um para assepsia de segmentos apical e nodal de plantas de cinco meses de idade, outro para folhas de plantas de 12 meses de idade.

Os seguintes procedimentos de assepsia foram aplicados para os segmentos apical e nodal em câmara de fluxo laminar:

- A- 1) Imersão em hipoclorito de sódio (NaClO) a 2% por 15 minutos.
- 2) Quatro lavagens com água destilada e autoclavada.
- B- 1) Imersão em NaClO a 2% por 15 minutos.
- 2) Quatro lavagens com água destilada e autoclavada, seguido da imersão em kanamicina (0,1 mg/mL) por 30 minutos.
- C- 1) Imersão em álcool a 70% por dois minutos e lavagens com água destilada e autoclavada.
- 2) Imersão em NaClO a 2% por 15 minutos, seguido de quatro lavagens com água destilada e autoclavada.
- D- 1) Termoterapia por uma hora a 40 °C.
- 2) Imersão em NaClO a 2% com pH ajustado para 6 por 15 minutos, seguido de quatro lavagens com água destilada e autoclavada.
- E- 1) Termoterapia por uma hora a 40 °C.
- 2) Imersão em álcool a 70% por dois minutos e lavados com água destilada e autoclavada.

- 3) Imersão em NaClO a 2% com pH ajustado para 6 por 15 minutos, seguido de quatro lavagens com água destilada e autoclavada.
- F-** 1) Termoterapia por uma hora a 40 °C.
2) Imersão em álcool a 70% por dois minutos e lavados com água destilada e autoclavada.
3) Imersão em NaClO a 1% com pH ajustado para 6 por quinze minutos, seguido de quatro lavagens com água destilada e autoclavada.
- G-** 1) Termoterapia por uma hora a 40 °C.
2) Imersão em óleo de copaíba (*Copaifera* spp) por 15 minutos e lavagens com água destilada e autoclavada.
3) Imersão em NaClO a 1% com pH ajustado para 6 por 15 minutos, seguido de quatro lavagens com água destilada e autoclavada.
- H-** 1) Imersão em álcool a 70% por 30 segundos, seguido de lavagens com água destilada e autoclavada.
2) Imersão em NaClO a 2% por 15 minutos, seguido de quatro lavagens com água destilada e autoclavada.
3) Imersão em ampicilina (0,1 mg/mL) por 30 minutos.
- I-** 1) Imersão em álcool a 70% por 30 segundos, seguido de lavagem com água destilada e autoclavada.
2) Imersão em NaClO a 2% por 15 minutos, seguida de quatro lavagens com água destilada e autoclavada.
3) Imersão em estreptomicina (0,1 mg/mL) por 30 minutos.

A inoculação, após secagem dos explantes em papel estéril, foi realizada em meio contendo somente ágar a 0,7%. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas, e intensidade luminosa de $52 \text{ mmol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de irradiância fornecida por lâmpadas fluorescente brancas. Foram avaliados, visualmente, o percentual de contaminação causada por fungos e bactérias e o percentual de oxidação.

As folhas passaram por assepsia que constou de imersão em álcool a 70% por dois minutos e em diferentes soluções de NaClO a 0,5; 1 e 2% por quinze minutos e NaClO a 2%, adicionado de benomyl a 0,6%. Em seguida, foram retirados discos foliares com $0,8 \text{ cm}^2$ de área com auxílio de um vazador metálico, previamente autoclavado. O meio utilizado neste ensaio foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com 3% de sacarose e ágar a 0,7%. Os discos foliares foram inoculados individualmente em tubos de ensaio (100x20mm) com a superfície abaxial em contato com o meio. Estes foram mantidos no escuro por duas semanas, quando se fez a avaliação através de observações da percentagem de contaminação de fungos e bactérias.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os percentuais de contaminação em segmentos apicais e nodais de mogno são apresentados na Tabela 1. Foi observado que percentagens menores que 50% de contaminação por bactéria em segmentos apical

e nodal ocorreram nos procedimentos que envolveram o uso de termoterapia, óleo de copaíba e NaClO a 1% e uso de estreptomicina no segmento nodal. Percentagens de contaminação em segmento apical acima de 50% foram observadas nos demais procedimentos. Enquanto que as contaminações por fungo em segmento apical superior a 15% somente foram observadas no procedimento envolvendo a termoterapia, óleo de copaíba e NaClO a 1%. Para o segmento nodal, contaminações superior a 15% foram observadas nos procedimentos envolvendo termoterapia, óleo de copaíba e NaClO a 1% e os tratamentos contendo os antibióticos ampicilina e

estreptomicina.

A termoterapia por uma hora a 40 °C para controlar fungos foi eficiente em todos os tratamentos que os explantes foram imersos somente em NaClO, ou em tratamentos nos quais os explantes foram imersos em álcool e, posteriormente, em NaOCl. Para o controle de bactéria a termoterapia apresentou melhor resposta quando os explantes foram imersos em óleo de copaíba, em seguida no NaClO a 1%.

A utilização de antibióticos kanamicina, ampicilina e estreptomicina surtiu pouco efeito sobre a incidência de bactérias nos dois segmentos utilizados,

Tabela 1 – Percentagem (%) de contaminação em segmentos apical e nodal de mogno (*Swietenia macrophylla*) e o agente causador. Embrapa Amazônia Oriental, Belém (PA), 1999.

Procedimentos	Nº frasco Inoculado	Segmento		Agente			
		Apical	Nodal	Fundo (%)		Bactéria (%)	
				Apical	Nodal	Apical	Nodal
NaClO 2%	40	100 (n=2)	100 (n=2)	5	0	100	100
NaClO+kanamicina	40	100 (n=2)	100 (n=2)	0	0	100	100
Álcool+NaClO 2%	40	100 (n=2)	95 (n=2)	5	15	95	80
T+NaClO 2%	40	70 (n=2)	100 (n=2)	0	5	70	100
T+álcool+NaClO 2%	40	75 (n=2)	85 (n=2)	5	5	70	80
T+álcool+NaClO 1%	18	55 (n=2)	100 (n=2)	0	0	55	100
T+copaíba+NaClO	19	78 (n=2)	100 (n=2)	33	60	44	40
Álcool+NaClO+Amp.	23	80 (n=2)	92 (n=2)	0	23	80	69
Álcool+NaClO+Estr.	22	100 (n=2)	86 (n=2)	12	50	87	36

Nota: sinais convencionais utilizados

n – número de explantes

T - termoterapia

Amp. – ampicilina

Estr. – estreptomicina

exceto a estreptomicina em segmento nodal, onde o percentual de contaminação foi de 36% (Tabela 1). Enquanto que, para o controle de fungos, a kanamicina foi a mais eficiente para os dois segmentos e a ampicilina no segmento apical, ambas com 0% de contaminação. Embora a eliminação de bactérias por antibióticos não tenha sido a mais eficiente, Kritzinger et al. (1998) verificaram que pré-tratamento com fungicida e combinações de antibióticos deram bons resultados na desinfestação de rizomas de *Zantedeschia aethiopica*.

A alta incidência de bactérias de coloração esbranquiçadas, que se localizavam ao redor dos explantes, provavelmente, tenha ocorrido devido as plantas fornecedoras de explantes estarem em condições semelhantes a de campo, pela falta de tratamentos na casa de vegetação. Pelo fato de que em alguns explantes o surgimento da

contaminação ocorreu após algumas semanas da inoculação, acredita-se que eram endógenas. Para Grattapaglia e Machado (1998), a condição fitossanitária da planta matriz é importante, pois irá facilitar a descontaminação durante o isolamento, devendo-se ter cuidado durante a irrigação, molhando-se exclusivamente o substrato sem atingir as folhas.

Maene e Deberg (1987), ao manterem plantas de *Araucaria exelsa* em condições secas durante seis meses, antes da coleta dos explantes em casa de vegetação, reduziram a contaminação bacteriana de 70 para 20%.

Os procedimentos envolvendo a presença do NaClO demonstraram que no processo de assepsia de explantes de mogno, podem influenciar na oxidação dos explantes (Tabela 2). Foi observado que os segmentos utilizados nos diferentes proce-

Tabela 2 – Percentagem de oxidação em segmentos apical e nodal de mogno (*Swietenia macrophylla*) após sete dias da inoculação. Embrapa Amazônia Oriental, Belém (PA), 1999.

Procedimentos	Nº explantes observados		Oxidação %	
	Apical	Nodal	Apical	Nodal
NaClO 2%	20	20	10	15
NaClO+Kanamicina	20	20	30	15
Álcool+NaClO 2%	11	15	27	73
T+NaClO 2%	17	8	94	87
T+álcool+NaClO 2%	13	9	85	78
T+álcool+NaClO 1%	9	9	33	56
T+copaíba+NaClO	9	10	66	30
Álcool+NaClO+Amp.	10	13	70	62
Álcool+NaClO+Estr.	8	14	75	21

Nota: sinais convencionais utilizados:

T – termoterapia, Amp. – ampicilina, Estr. – estreptomicina

dimentos foram oxidados, sendo observado os menores percentuais de oxidação nos tratamentos contendo o NaClO a 2% isoladamente para os dois tipos de segmento, ou quando associado à kanamicina em segmento nodal. Apesar de McCOMB (1978) relatar que é comum o escurecimento de explantes por oxidação de polifenóis logo após a retirada da planta mãe, isto não ocorreu porque durante a retirada dos explantes das plantas em casa de vegetação não foi observado o escurecimento desses no local do corte. Entretanto, GEORGE (1993) verificou que em ápices caulinares de *Pistacia* coletados em casa de vegetação ocorriam a maior frequência de oxidação.

Nos discos foliares desinfestados não houve o surgimento de bactérias; apenas a presença de fungos foi observada na menor concentração de NaClO (Tabela 3). Estes resultados são similares com aqueles de Fortes (1992), visto que em seu experimento, utilizando diferentes concentrações de NaClO, foram observados o surgimento de agentes contaminantes principalmente fungos nas menores concentrações.

Os discos foliares, após as duas semanas em que permaneceram no escuro, mantiveram-se verdes, exceto os inoculados no meio que continha NaClO a 2%+benomyl a 0,6%, que se apresentavam despigmentados. Acredita-se que está despigmentação seja devido ao efeito fitotóxico do benomyl ao tecido foliar de mogno, apesar dos discos foliares estarem sem agentes contaminantes. Fortes (1992) também observou uma tendência para diminuição na contaminação fúngica de explantes foliares de macieira ao se adicionar benomyl a 0,6 mgL⁻¹ ao meio, porém não fez nenhum comentário a respeito do surgimento de efeito fitotóxico nesta espécie. Enquanto que Del Ponte (1999) sugeriu que as plantas matrizes de *Eucalyptus* mantidas em casa de vegetação que serviram como fornecedoras de explantes devem receber um pré-tratamento com benomyl, por um período anterior à coleta. Para o mogno, a utilização de benomyl deve ser feita de forma cautelosa observando sempre o surgimento de algum efeito fitotóxico às plantas.

Tabela 3 – Percentagem de contaminação de discos foliares de mogno (*Swietenia macrophylla*) e agentes contaminantes, sob concentrações de NaClO e benomyl. Embrapa Amazônia Oriental, Belém (PA), 1999.

NaClO (%)	Contaminação (%)	Agente	
		Fungo (%)	Bactéria (%)
0,5	25 (n=20)	25	0
1	0 (n=20)	0	0
2	0 (n=20)	0	0
2 + benomyl 0,6	0 (n=20)	0	0

Nota: n - número de explantes

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

a) a termoterapia associada ao óleo de copaíba e NaClO a 1% reduz até 44% a contaminação por bactéria em segmento apical e nodal de mogno;

b) a termoterapia associada a NaClO isoladamente ou ao álcool a 70%, seguido do NaClO a 1% reduz até 0% a contaminação por fungos para os segmentos apical e nodal de mogno;

c) a estreptomomicina associada ao álcool a 70% e NaClO a 2% reduz até 50% a contaminação por bactéria em segmento nodal de mogno;

d) a kanamicina é o antibiótico mais eficiente para o controle de fungos em segmento apical e nodal de mogno, e a ampicilina para o segmento apical, ambas com 0% de contaminação;

e) os segmentos utilizados nos diferentes procedimentos são oxidados, sendo observado os menores percentuais de oxidação nos tratamentos contendo o NaClO a 2% isoladamente para os dois tipos de segmento ou quando associado à kanamicina em segmento nodal;

f) todos os procedimentos utilizados para a assepsia de discos foliares de mogno são eficientes, exceto o NaClO a 0,5% no controle de fungos;

g) a redução do pH do NaClO não deve ser uma prática recomendada para assepsia, pois induz o aumento da oxidação nos segmentos apicais e nodais de mogno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DEL PONTE, E.M. *Micropropagação de Eucalyptus globulus ssp. Globulus Labill.* 1999. 47p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1999.

FORTES, G.R.de L. *Calogênese e organogênese “in vitro” de macieira (Malus spp.) afetada por fatores físicos, químicos e biológicos.* 1992. 163p. (Doutorado em Fitotecnia). – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG), 1992.

GEORGE, E.F. *Plant propagation by tissue culture.* Somerset: Exegetics, 1993. 574p.

—————; SHERRINGTON, P.D. *Plant propagation by tissue culture.* Eversley: Exegetics, 1984. 709p.

GILADI, I.; ALTMAN, A.; GOREN, R. A method for aseptic culture of bud explants from citrus trees. *Scientia Horticulture*, v.10, p.357-362, 1979.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS; BUSO, J.A. (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.* Brasília, DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPQ, 1998. p. 183-260.

KRITZINGER, E.M; VUUREN, R.J.V.; WOODWART, B.; RONG, I.H.; SPREETH, M.H.; SLABBERT, M.M. Elimination of external and internal contaminants in rhizomes of *Zantedeschia aethiopica* with commercial fungicides and antibiotics. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v.52, p. 61-65, 1998.

LAMB, F.B. *Mahogany of tropical America. Its ecology and management.* Ann Arbor: University of Michigan, 1966. 219p.

MAENE, F.; DEBERGH, P.C. Optimisation of the transfer of tissue cultured shoots to in vivo conditions. *Acta Horticulture*, v.212, p.335-348, 1987.

McCOMB, J.A Clonal propagation of woody plant using tissue culture with special reference to apples. *The Intern. Plant Prop. Comb. Proc.*, v. 28, p. 413-426,1978.

MELO, J.T. de.; SILVA, J.A. da.; TORRES, R.A. de A.; SILVEIRA, C.E. dos S. da, CALDAS, L.S. Coleta, propagação e desenvolvimento inicial de espécies do cerrado. In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. de. (Ed.). *Cerrado: ambiente e flora*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. p.195-231.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol*, n. 25, p. 135-166, 1974.

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

VERÍSSIMO, A.; BARRETO, P.; TARIFA, R.; UHL, C. A. Extraction of a high-value natural resource in Amazonia: The case of mahogany. *Forest Ecology and Management*, v.72, p. 39-60,1995.

YOUNG, P.M.; HUTCHINS, A.S.; CANFIELD, M.L. Use of antibiotics to control bacteria in shoot cultures of wood plants. *Plant Science Letters*, v.34, n.3, p. 203-209, 1984.