

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Protocolo para Micropropagação de Bananeira
‘Thap Maeo’

GUSTAVO ALVES PEREIRA

Ilha Solteira – SP

Junho/2012

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Protocolo para Micropropagação de Bananeira
'Thap Maeo'

GUSTAVO ALVES PEREIRA

Orientadora: Profa. Dra. Aparecida Conceição Boliari

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia - UNESP – Campus de Ilha Solteira, para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Especialidade: Sistemas de Produção

Ilha Solteira – SP

Junho/2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da UNESP - Ilha Solteira.

A474p Alves Pereira, Gustavo.
Protocolo para micropropagação de bananeira 'Thap maeo' / Gustavo Alves Pereira. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2012
121 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Especialidade: Sistemas de Produção, 2012

Orientador: Aparecida Conceição Boliani
Inclui bibliografia

1. Banana. 2. Micropropagação de plantas. 3. Multiplicação in vitro.
4. Enraizamento in vitro. 5. Regulador vegetal. 6. Desinfestação



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ILHA SOLTEIRA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Protocolo para Micropropagação de Bananeira 'Thap Maeo'

AUTOR: GUSTAVO ALVES PEREIRA

ORIENTADORA: Profa. Dra. APARECIDA CONCEIÇÃO BOLIANI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA ,
Área: SISTEMAS DE PRODUÇÃO, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. APARECIDA CONCEIÇÃO BOLIANI
Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia / Faculdade de
Engenharia de Ilha Solteira

Prof. Dr. LUIZ DE SOUZA CORREA
Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia / Faculdade de
Engenharia de Ilha Solteira

Prof. Dr. ENES FUREANI JUNIOR
Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia / Faculdade de
Engenharia de Ilha Solteira

Prof. Dr. FERNANDO ALVES DE AZEVEDO
Centro de Citricultura Sylvio Moreira - APTA / Instituto Agronômico de Campinas

Prof. Dr. JOSÉ CARLOS CAVICHIOLI
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo / APTA - Agência Paulista de
Tecnologia dos Agronegócios

Data da realização: 15 de junho de 2012.

Aos meus pais,

Niceu Alves Pereira (*in memorian*) e Enéas Porcionato Pereira pela sabedoria, dedicação e amor...

Ao meu irmão Niceu Filho, e esposa Pricila pelo apoio e carinho,

A minha irmã Ana Cristina pelo apoio e carinho,

Aos meus padrinhos Norival e Maria, pelos ensinamentos, conselhos e amor...

Aos meus primos Eduardo e Darlene, pelo incentivo, apoio e carinho,

A minha segunda família Élcio, Isaura (*In memorian*), Edilson e Edgar pelo apoio e carinho

Aos amigos Marcilio e Kátia, pelo apoio e incentivo

A minha esposa Elaine Renata de Castro Viana Pereira

A minha filha Helena Viana Pereira

Motivação e Luzes da minha vida...

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- A **DEUS**, que sempre me iluminou e me deu força para enfrentar os obstáculos do meu caminho;
- À Profa. Dra. Aparecida Conceição Boliani pela oportunidade, pela orientação, confiança, amizade e carinho;
- Ao Prof. Dr. Luiz de Souza Corrêa pela colaboração durante a realização deste trabalho,
- A Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), pela oportunidade de realização do curso de doutorado;
- Ao Prof. Dr. Enes Furlani Junior pelo apoio profissional e pela amizade durante este período;
- Aos colegas de laboratório e de curso Érica Moreira, Aline Namie Suzuki, Ednamar Gabriela Palú, Luis Lessi, Léa Carla, Danilo Aires dos Santos, Renata Capistrano Moreira Furlani, Simone Hiraki pelo convívio, amizade, e auxílio prestado;
- A todos aqueles, que de uma forma ou de outra, estiveram presentes nessa fase da minha vida.

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro”.

Albert Einstein



PROTOCOLO PARA MICROPROPAGAÇÃO DE BANANEIRA 'THAP MAEO'

Autor: Gustavo Alves Pereira

Orientadora: Aparecida Conceição Boliani

Resumo

A evolução da bananicultura brasileira foi possível em virtude dos progressos obtidos no que se refere à disponibilidade de material genético diversificado, à disponibilidade de mudas saudáveis e de boa qualidade genética, às práticas culturais de manejo pré e pós-colheita, às técnicas fitossanitárias desenvolvidas, às técnicas de nutrição e de irrigação, e à melhoria do nível técnico e organizacional do banicultor brasileiro. Métodos de propagação, como a micropropagação *in vitro*, vêm sendo desenvolvidos e aperfeiçoados, para elevar a taxa de multiplicação em curto espaço de tempo e melhorar a qualidade das mudas. O processo de micropropagação é realizado em fases, sendo estas a escolha da planta matriz, desinfestação do material, estabelecimento, multiplicação enraizamento e aclimação das mudas. Objetivou-se com este trabalho estabelecer um protocolo de micropropagação de explantes de bananeira 'Thap maeo', envolvendo as etapas de desinfestação utilizando concentrações de cloro ativo e os antibióticos ampicilina sódica e cloranfenicol, multiplicação estudando concentrações de citocininas como o 6-Benzilaminopurina (BAP) e Cinetina e no enraizamento *in vitro* verificando concentrações de auxinas como o Ácido Indol Butírico (AIB) e o Ácido Naftaleno Acético (ANA). Concluiu-se que a concentração de 2% de cloro ativo proporcionou redução de 92% e 88% respectivamente para bactérias e fungos. Para os antibióticos ampicilina sódica e cloranfenicol a concentração de 20 mg L⁻¹ reduziu em 70% de desinfestação de bactérias e fungos. Quando se utilizou os reguladores vegetais, BAP e cinetina, o maior número de brotos obtido foi na concentração de 4mg L⁻¹ conseguindo em média 3,8 brotos por explantes no 4º subcultivo. Para o enraizamento *in vitro* a concentração de 4,0 mg L⁻¹ de AIB apresentou melhor resultado com 3,2 raízes por broto.

Palavras Chave: Cultura de tecidos. *Musa* sp. Propagação.

PROTOCOL FOR MICROPROPAGATION THE BANANA 'THAP MAEO'

Abstract

The evolution of Brazilian banana was possible because of progress in relation to the availability of diverse genetic material, the availability of healthy seedlings and good quality genetics, cultural practices of management and post-harvest phytosanitary techniques developed techniques, nutrition and irrigation, and improving the technical and organizational bananicultor Brazil. Propagation methods, such as in vitro micropropagation, have been developed and improved to increase the multiplication rate in a short time and improve the quality of seedlings. The acclimatization process is performed in phases, these being the choice of the mother plant, disinfection equipment, establishment, multiplication, rooting and acclimatization of the seedlings. The objective of this study establish a protocol for micropropagation of banana explants 'Thap Maeo', involving the steps of disinfection using chlorine concentrations and antibiotic ampicillin sodium and chloramphenicol, multiplication studying concentrations of cytokinins like 6-Benzylaminopurine (BAP) and Kinetin and in vitro rooting checking concentrations of auxin and Indole Butyric acid (IBA) and Naphthalene Acetic Acid (NAA). It was concluded that the 2% concentration provided a reduction of active chlorine of 92% and 88% respectively for bacteria and fungi. For the antibiotics sodium ampicillin and chloranphenicol concentration of 20 mg.L⁻¹ reduced by 70% of disinfection of bacteria and fungi. When using the plant growth regulators, BAP and kinetin, the highest number of shoots was obtained on concentration was 4 mg L⁻¹ achieving an average of 3,8 shoots per explant in the 4th subculture. For rooting in vitro concentration of 4.0 mg L⁻¹ IBA showed the best result with 3,2 roots per shoot.

Keywords: Tissue culture. *Musa* sp. Propagation.

LISTA DE FIGURAS

3 - Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira 'Thap Maeo' (Sub Grupo AAB) submetidos a concentrações de cloro ativo

Figura 1 -	Explante de bananeira 'Thap maeo' in vitro apresentando contaminação bacteriana Ilha Solteira – SP, 2011.....	65
Figura 2 -	Porcentagem de contaminação por bactéria em explantes de bananeira 'Thap maeo' submetidas a concentrações de cloro ativo. Ilha Solteira - SP, 2011.....	66
Figura 3 -	Porcentagem de contaminação por fungo em explantes de bananeira 'Thap maeo' submetidas a concentrações de cloro ativo. Ilha Solteira – SP, 2011.....	66
Figura 4 -	Porcentagem de oxidação em explantes de bananeira 'Thap maeo' submetidas a concentrações de cloro ativo. Ilha Solteira – SP, 2011.....	67
Figura 5 -	A) Explantes de bananeira 'Thap maeo' oxidado antes da repicagem. B) Explante oxidado feito limpeza para repicagem.....	67

4 - Uso dos antibióticos ampicilina sódica e cloranfenicol no meio de cultura para o controle de contaminantes na micropropagação de bananeira 'Thap Maeo'

Figura 6 -	Porcentagem de contaminação bacteriana em explantes de bananeira 'Thap maeo' submetidas a concentrações de ampicilina sódica. Ilha Solteira – SP, 2011.....	80
Figura 7 -	Porcentagem de contaminação bacteriana em explantes de bananeira 'Thap maeo' submetidas a concentrações de cloranfenicol. Ilha Solteira – SP, 2011.....	80
Figura 8 -	Porcentagem de contaminação por fungo em explantes de bananeira 'Thap maeo' submetidas a concentrações de ampicilina sódica. Ilha Solteira – SP, 2011.....	82
Figura 9 -	Porcentagem de contaminação por fungo em explantes de bananeira 'Thap maeo' submetidas a concentrações de cloranfenicol. Ilha Solteira – SP, 2011.....	82
Figura 10 -	Porcentagem de oxidação em explantes de bananeira 'Thap maeo' submetidas a concentrações de ampicilina sódica. Ilha Solteira – SP, 2011.....	83

Figura 11 -	Porcentagem de oxidação em explantes de bananeira 'Thap maeo' submetidas a concentrações de cloranfenicol. Ilha Solteira – SP, 2011.....	84
-------------	--	----

5 - Concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) e Cinetina (CIN) para avaliação de protocolo e multiplicação na de bananeira 'Thap maeo'

Figura 12 -	Número de brotos emitidos por explante inicial de bananeira 'Thap maeo' no 1º subcultivo em meio de cultura contendo diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP). Ilha Solteira-SP, 2011.....	95
Figura 13-	Número de brotos emitidos por explante inicial de bananeira 'Thap maeo' no 2º subcultivo em meio de cultura contendo diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP). Ilha Solteira-SP, 2011.....	96
Figura 14 -	Número de brotos emitidos por explante inicial de bananeira 'Thap maeo' no 3º subcultivo em meio de cultura contendo diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP). Ilha Solteira-SP, 2011.....	96
Figura 15-	Número de brotos emitidos por explante inicial de bananeira 'Thap maeo' no 4º subcultivo em meio de cultura contendo diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP). Ilha Solteira-SP, 2011.....	98
Figura 16 -	Explante com brotos no 4º subcultivo em meio de cultura com 4 mg L ⁻¹ de 6- Benzilaminopurina (BAP) apresentando enraizamento Ilha Solteira-SP, 2011.....	99
Figura 17 -	Número de brotos emitidos por explante inicial de bananeira 'Thap maeo' no 1º subcultivo em meio de cultura contendo diferentes concentrações de cinetina. Ilha Solteira-SP, 2011.....	100
Figura 18 -	Número de brotos emitidos por explante inicial de bananeira 'Thap maeo' no 2º subcultivo em meio de cultura contendo diferentes concentrações de cinetina. Ilha Solteira-SP, 2011.	100
Figura 19 -	Número de brotos emitidos por explante inicial de bananeira 'Thap maeo' no 3º subcultivo em meio de cultura contendo diferentes concentrações de cinetina. Ilha Solteira-SP, 2011.....	101
Figura 20 -	Número de brotos emitidos por explante inicial de bananeira 'Thap maeo' no 4º subcultivo em meio de cultura contendo diferentes concentrações de cinetina. Ilha Solteira-SP, 2011.....	101

6 - Enraizamento *in vitro* de bananeira 'Thap maeo' em concentrações de Ácido Indol Butirico (AIB) e Ácido Nafatleno Acético (ANA)

- Figura 21 - Número de raízes por brotos de bananeira 'Thap Maeo' em meio de cultura contendo concentrações Ácido Indol Butitico (AIB). Ilha Solteira – SP, 2011..... 111
- Figura 22 - Número de raízes por broto de bananeira 'Thap maeo' em meio de cultura contendo diferentes concentrações de Ácido Naftaleno Acético (ANA). Ilha Solteira-SP, 2011..... 112
- Figura 23 - Brotos de bananeira 'Thap Maeo' enraizadas *in vitro* em meio de cultura sem adição de Ácido Indol Butirico (AIB) ou Ácido Naftaleno Acético (ANA), pronta para ser aclimatada. Ilha Solteira-SP, 2011..... 114

LISTA DE TABELA

3 - Desinfestação e estabelecimento in vitro de explantes de bananeira 'Thap Maeo' (SUB GRUPO AAB)' submetidos a diferentes concentrações de cloro ativo

Tabela 1	Quadrados médios da análise de variância e níveis de significância referentes à porcentagem de explantes de bananeira 'Thap maeo' contaminados por bactéria, fungos e oxidados. Ilha Solteira-SP, 2011.....	65
----------	---	----

4 - Uso dos antibióticos ampicilina sódica e cloranfenicol no meio de cultura para o controle de contaminantes na micropropagação de bananeira 'Thap Maeo'

Tabela 2	Quadrados médios da análise de variância e níveis de significância referentes à porcentagem de explantes de bananeira 'Thap maeo' contaminados por bactéria, fungos e oxidados para o uso de ampicilina sódica ao meio de cultura. Ilha Solteira-SP, 2011.....	79
----------	--	----

Tabela 3	Quadrados médios da análise de variância e níveis de significância referentes à porcentagem de explantes de bananeira 'Thap maeo' contaminados por bactéria, fungos e oxidados para o uso de cloranfenicol adicionados ao meio de cultura. Ilha Solteira-SP, 2011.....	79
----------	--	----

5. Concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) e Cinetina (CIN) para avaliação de protocolo e multiplicação na micropropagação de bananeira 'Thap maeo'

Tabela 4	Quadrados médios da análise de variância e níveis de significância referentes à porcentagem de brotos emitidos por explantes em diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) durante subcultivos de multiplicação de bananeira 'Thap maeo'. Ilha Solteira-SP, 2011.....	94
----------	--	----

Tabela 5	Quadrados médios da análise de variância e níveis de significância referentes à porcentagem de brotos emitidos por explantes em diferentes concentrações de Cinetina durante subcultivos de multiplicação de bananeira 'Thap maeo' Ilha Solteira-SP, 2011.....	94
----------	--	----

6. Enraizamento in vitro de bananeira 'Thap maeo' em concentrações de ácido indol butírico (AIB) e ácido naftaleno acético (ANA)

Tabela 6	Quadrados médios da análise de variância e níveis de significância referentes ao número de raízes emitidas por explantes em diferentes concentrações de Ácido Indol Butírico (AIB) e Ácido Naftaleno Acético (ANA) durante o enraizamento <i>in vitro</i> de bananeira 'Thap maeo'. Ilha Solteira-SP, 2011.....	111
----------	---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

AIB - Ácido Indolbutírico

ANA – Ácido Naftaleno Acético

BAP – 6- Benzilaminopurina

CIN - Cinetina

Sumário

1. Introdução.....	14
2. Revisão de literatura.....	16
2.1. Origem e distribuição geográfica da bananeira.....	16
2.2. Importância socioeconômica e alimentar da banana.....	16
2.3. Classificação botânica da bananeira.....	17
2.4. Descrição da Planta.....	20
2.5. Uso de cultivares resistentes.....	23
2.5.1. Cultivar Thap Maeo (AAB).....	26
2.6. Propagação da Bananeira.....	27
2.6.1. Propagação convencional.....	27
2.6.2. Fracionamento de rizoma.....	28
2.6.3. Propagação rápida in vivo.....	29
2.6.4. Micropropagação.....	29
2.6.5. Etapas da micropropagação.....	32
2.7. Mudas Micropropagadas.....	34
2.8. Fatores que interferem na micropropagação.....	35
2.8.1. Desinfestação.....	34
2.8.2. Microrganismos Endofíticos.....	37
2.8.3. Oxidação.....	39
2.8.4. Reguladores Vegetais.....	41
2.8.5. Variação Somaclonal.....	44
2.9. Referências.....	46
3. Desinfestação e estabelecimento in vitro de explantes de bananeira ‘Thap maeo (AAB) submetidos a diferentes concentrações de cloro ativo.....	60
3.1. Introdução.....	62
3.2. Material e métodos.....	63
3.3. Resultados e discussão.....	64
3.4. Conclusões.....	68
3.5. Referências.....	69
4 - Uso dos antibióticos ampicilina sódica e cloranfenicol no meio de cultura para micropropagação de banana ‘Thap maeo’.....	73
4.1. Introdução.....	75
4.2. Material e métodos.....	77
4.3. Resultados e discussão.....	78
4.4. Conclusões.....	84
4.5. Referência.....	84
5. Concentrações de bap e cinetina para avaliação de protocolo e multiplicação na de bananeira ‘Thap maeo’.....	89
5.1. Introdução.....	91
5.2. Material e métodos.....	92
5.3. Resultados e discussão.....	94
5.4. Conclusões.....	102

5.5. Referências.....	102
6. Enraizamento in vitro de bananeira 'Thap maeo' em diferentes concentrações de ácido indol butírico (AIB) e ácido naphatleno acético (ANA)....	106
6.1. Introdução.....	108
6.2. Material e métodos.....	109
6.3. Resultados e discussão.....	110
6.4. Conclusões.....	114
6.5. Referências.....	114
7. Considerações Finais.....	118



1 – Introdução

A Índia é o maior produtor mundial de banana com 26.996.600 toneladas de frutas produzidas em uma área de 748.100 hectares. Seguido de Filipinas com 9.013.190 toneladas de frutas produzidas em 446.400 hectares. Em terceiro lugar vem a China com 9.006.450 toneladas produzidas em 350.224 hectares e em quarto lugar está o Equador com 7.637.320 toneladas de frutas produzidas em 216.115 hectares.

O Brasil é o quinto maior produtor mundial de banana produzindo 7.090.619 toneladas de frutas, com área colhida de 492.113 hectares. No estado de São Paulo a área colhida atingiu 58.720 ha, produzindo 1.225.193 toneladas, ocupando a primeira posição no ranking de produção do país. Em segundo é o estado da Bahia com uma produção de 1.152.892 toneladas.

A evolução da bananicultura brasileira foi possível em virtude dos progressos obtidos no que se refere à disponibilidade de material genético diversificado, à disponibilidade de mudas sadias e de boa qualidade genética, às práticas culturais de manejo pré e pós-colheita, às técnicas fitossanitárias desenvolvidas, às técnicas de nutrição e de irrigação, e à melhoria do nível técnico e organizacional do bananicultor brasileiro.

As cultivares de banana mais difundidas no Brasil são: Prata, Pacovan, Prata Anã, Maça, Mysore, Terra e D'Angola, do grupo AAB, utilizadas unicamente para o mercado interno; e Nanica, Nanicão e Grande Naine, do grupo AAA, usadas principalmente para exportação e mercado interno. Em menor escala, são plantadas a 'Ouro' (AA), a 'Figo Cinza' e a 'Figo Vermelho' (ABB), a 'Caru Verde' e a 'Caru Roxa' (AAA). As variedades Prata, Prata Anã e Pacovan são responsáveis por aproximadamente 60% da área cultivada com banana no Brasil.

A variedade Thap maeo apresenta frutos externamente semelhantes aos da Maça, apresenta poucas quinas e sabor doce. É resistente à Sigatoka-amarela (*M. musicola*), Sigatoka-negra (*M. fijiensis*), mal-do-Panamá (*F. oxysporum* f. sp. *cubense*) e à broca-do-rizoma (*Cosmopolites sordidus*). Apresenta rusticidade a solos de baixa fertilidade, com produtividade média de 25 t ha⁻¹ ano⁻¹. Em solos mais férteis produz 35 t ha⁻¹ ano⁻¹

A propagação da bananeira (*Musa* sp.) pode ser feita de várias formas: por sementes (oriundas da sua inflorescência), ou vegetativamente por meio de mudas pelo método tradicional utilizando mudas tipo chifrão, chifre, chifrinho, fracionamento de rizoma ou *in vitro*. Pelo método tradicional, mesmo o material sendo de ótima qualidade, o processo é lento e permite a disseminação de doenças e pragas como Sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis*), Sigatoka-amarela (*Mycosphaerella musicola*), mal-do-Panamá (*Fusarium oxysporum f. sp. Cubense*), Broca-do-rizoma (*Cosmopolites sordidus*) e Nematóides.

A utilização de técnicas modernas de biotecnologia como a cultura de tecidos, a manipulação genética e a biologia molecular estão sendo utilizadas para o melhoramento genético de plantas permitindo assim o desenvolvimento de novas variedades. Dentre as diversas práticas de cultura de tecidos uma das mais utilizadas é a micropropagação, que atualmente é responsável pela produção de mudas de diversas espécies com fins comerciais. Essa técnica envolve o cultivo de ápices caulinares e tem como base a propagação pela organogênese direta de gemas axilares. Uma das principais vantagens são a obtenção de plantas livres de patógenos e pragas, uniformidade de produção, produz mudas o ano todo, produz rapidamente um grande número de mudas de materiais genéticos novos, em reduzido espaço físico. As desvantagens são: processo caro, necessidade de mão de obra especializada, protocolos ausentes para algumas espécies, longos períodos de pesquisas.

No Brasil, apesar da técnica de multiplicação *in vitro* de bananeira ser bastante difundida, percebe-se que há deficiência de trabalhos que visem o aumento da taxa de multiplicação de algumas cultivares importantes, levando em consideração, além das variações somaclonais, os custos de produção. Além disso, ainda hoje, há falta de domínio dessa tecnologia para novas cultivares e algumas cultivares regionais de bananeira, sendo responsável pela colocação de mudas de qualidade duvidosa no mercado, trazendo prejuízos aos agricultores.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de micropropagação da promissora variedade de bananeira 'Thap maeo', envolvendo as etapas de desinfestação, multiplicação e enraizamento *in vitro*.

2 - Revisão de Literatura

2.1 - Origem e distribuição geográfica da bananeira

Não se pode indicar com exatidão a origem da bananeira, pois ela se perde na mitologia grega e indiana. Atualmente, admite-se que seja originária do Oriente, sul da China ou Indochina. Há referências da sua presença na Índia, Malásia ou Filipinas, onde tem sido cultivada há mais de 4.000 anos (MOREIRA, 1987).

É admitido que a maioria das cultivares de bananeira (*Musa spp.*) tenha se originado no Sudoeste Asiático, ainda que haja outros centros de origem secundários como África Oriental e ilhas do Pacífico, além de um importante centro de diversidade na África Ocidental (CASTRO et al., 2008).

O Brasil representa a quinta maior produção mundial de banana com 7.090.619 de toneladas. Dentre os maiores produtores estão os estados da Bahia, São Paulo, Minas Gerais, Pará e Santa Catarina, com uma área de 240 mil hectares. São Paulo destaca-se em primeiro lugar com uma produção em 2011 de 1.225.193 toneladas em área de 58.720 (AGRIANUAL, 2012).

A bananeira está entre as culturas de maior importância econômica para os países tropicais e subtropicais. Da família das Musaceas é cultivada em todos os Estados brasileiros, desde a faixa litorânea até os planaltos do interior. Entretanto, certos fatores climáticos, como a temperatura e o regime de chuvas, impõem limites à cultura, favorecendo, por isso, sua concentração nos Estados de São Paulo, Bahia, Pará, Santa Catarina e Minas Gerais (BORGES et al., 2006).

2.2 - Importância socioeconômica e alimentar da banana

A banana é uma das frutas mais importantes do mundo, tanto no que se refere à produção quanto à comercialização. Para muitos países, além de ser um alimento complementar da dieta da população, apresenta grande relevância social e econômica, servindo como fonte de renda para muitas famílias de agricultores, gerando postos de trabalho, no campo e na cidade, e contribuindo para o desenvolvimento das regiões envolvidas em sua produção. Em outros países, a banana é um produto de exportação responsável por uma parte muito significativa

dos ingressos relativos à exportação agrícola (FIORAVANÇO, 2003).

Segundo Manica (1998), a banana tem um grande aproveitamento, pois o fruto ainda verde é utilizado para fazer farinha de banana, banana chips, tortas forrageiras ou consumido depois de cozidos. Na indústria, a banana é utilizada para o preparo de purê de banana acidificado, néctar de banana, banana-passa, banana aromatizada, banana cristalizada, banana em calda, bananada ou doce de massa de banana, essências, vinho, vinagre, geléia e aguardente. A banana é fruta de alto valor nutritivo, muito rica em açúcar e sais minerais, principalmente cálcio, fósforo e ferro, e vitaminas A, B1, B2 e C. Fácil de digerir, pode ser dada às crianças a partir dos seis meses de idade. Como quase não tem gordura, é indicada nas dietas baixas em colesterol. Pode ser consumida ao natural, como sobremesa, ou ser usada nos mais variados tipos de prato: salada de frutas, bolos, tortas, vitaminas, sorvetes, mingaus, recheios de aves e carnes, farofas, musses e sanduíches.

No Brasil, praticamente toda a produção de banana é consumida *in natura* e o seu cultivo tem papel fundamental na fixação da mão-de-obra rural. A banana constitui elemento importante na alimentação de populações de baixa renda, não só pelo alto valor nutritivo, mas também pelo baixo custo. Sabe-se que uma banana supre cerca de um quarto da quantidade de vitamina C recomendada diariamente para crianças. Contém, ainda, vitaminas A e B, muito potássio (K), pouco sódio (Na) e nenhum colesterol. Além do elevado valor nutritivo, a banana tem alto significado socioeconômico, pois mobiliza um grande contingente de mão-de-obra, permite retorno rápido ao produtor e é geradora de divisas para o País (GANGA, 2002).

2.3 - Classificação botânica da bananeira

Segundo Moreira (1999), as bananeiras existem no Brasil desde antes do seu descobrimento. Quando Pedro Álvares Cabral aqui chegou, encontrou os nativos comendo *in natura* bananas de uma cultivar muito digestiva que se supõe tratar-se da 'Branca' e outra, rica em amido, que precisava ser cozido antes do consumo, chamada de 'Pacoba' que deve ser a cultivar Pacovan. A palavra pacoba, em guarani, significa banana. Com o decorrer do tempo, verificou-se

que a 'Branca' predominava na Região Litorânea e a 'Pacovan', na Amazônica.

Conforme a sistemática botânica de classificação hierárquica, as bananeiras produtoras de frutos comestíveis são plantas de classe das Monocotiledôneas, ordem Scitaminales, família Musaceae, onde se encontram as subfamílias Heliconioideae, Strelitzioideae e Musoideae. Esta última inclui, além do gênero *Ensete*, o gênero *Musa*, constituído por quatro séries ou seções: Australimusa, Callimusa, Rhodochlamys e (Eu-) Musa (SIMMONDS, 1973). Dentro do gênero *Musa* existem no mínimo duas espécies, *M. ingens* ($2n=14$) e *M. beccarii* ($2n=18$), que não são classificáveis nestas seções. A separação entre (Eu-) Musa e Rhodochlamys é artificial e não reflete bem os graus de isolamento reprodutivo (SHEPHERD, 1990). A seção (Eu-) Musa é a mais importante, pois, além de ser formada pelo maior número de espécies do gênero, apresenta ampla distribuição geográfica e abrange as espécies de bananas comestíveis (ALVES, 1999).

A classificação proposta por Cheesman (1948) para o gênero *Musa*, e aceita atualmente em todo o mundo, baseia-se no número básico de cromossomas, que o divide em dois grupos: espécies com $n=10$ cromossomas, que pertencem às seções Australimusa e Callimusa; e espécies com $n=11$ cromossomas, que integram as seções Rhodochlamys e (Eu-) Musa. As espécies componentes dessas duas últimas seções são as que apresentam potencialidade como germoplasma útil para o melhoramento genético das variedades atualmente cultivadas. Segundo Shepherd (1990), essas espécies são: a) Seção Rhodochlamys: *M. ornata* Roxburgh, *M. velutina* Wendl & Drude, *M. laterita* Cheesman, *M. rubra* e *M. sanguinea*; b) Seção (Eu-) Musa: *M. acuminata* Colla, *M. flaviflora* Simmonds, *M. ochracea* Shepherd, *M. schizocarpa* Simmonds, *M. halabanensis* Meijer e *M. balbisiana* Colla

Na evolução das bananeiras comestíveis participaram principalmente as espécies diplóides selvagens *M. acuminata* Colla e *M. balbisiana* Colla, de modo que cada cultivar pode conter combinações variadas de genoma completo dessas espécies. Esses genomas são denominados pelas letras A (*M. acuminata*) e B (*M. balbisiana*), cujas combinações resultam grupos diplóides (AA, BB e AB), triplóides (AAA, AAB e ABB) e tetraplóides (AAAA, AAAB, AABB, ABBB) (FIGUEIREDO; BRIOSO, 2007).

A evolução da bananeira se processou em quatro etapas: 1) Ocorrência de partenocarpia por mutação, 2) Híbridação entre cultivares do grupo AA e plantas selvagens de *Musa balbisiana* (BB), 3 e 4) Cruzamentos envolvendo gametas masculinos haplóides e femininos com a mesma constituição cromossômica da planta genitora feminina formando respectivamente, indivíduos triplóides e tetraplóides. Grupo genômico é uma expressão empregada na abordagem da nomenclatura da bananeira para designar cada combinação específica entre o número básico de cromossomos das espécies *Musa acuminata* (AA) e *Musa balbisiana* (BB). Subgrupo, em bananeira, é um termo utilizado para abranger um conjunto de cultivares originados por mutação do mesmo genótipo (LIMA et al., 2003).

Os subgrupos mais comuns são: Cavendish, Gros Michel, Prata, Terra e Figo. As plantas do grupo genômico AA são normalmente delgadas, apresentando pseudocaule com muitas manchas escuras e folhas eretas e estreitas, com a base do pecíolo aberta. As plantas do grupo genômico BB apresentam cerosidade, pseudocaule sem manchas, folhas com a base do pecíolo fechada e frutos com quinhas evidentes. As plantas do grupo genômico AAA são semelhantes às do grupo AA, normalmente mais vigorosas, apresentando manchas escuras no pseudocaule, pecíolos com base aberta e pigmentação opaca na face interna das brácteas masculinas. As plantas do grupo genômico AAB apresentam, geralmente, poucas manchas escuras no pseudocaule, pecíolos com margens eretas e pigmentação brilhante na face interna das brácteas masculinas (LIMA et al., 2003).

As plantas do grupo genômico ABB apresentam cerosidade, pseudocaule praticamente sem manchas, pecíolos com base fechada, pigmentação brilhante na face interna das brácteas masculinas e frutos com três quinhas bem evidentes. As plantas do grupo genômico AAAA apresentam características semelhantes às do grupo genômico AAA, com algumas variações que dependem da origem do tetraplóide. As plantas do grupo genômico AAAB são muito vigorosas e apresentam características intermediárias entre as características dos grupos genômicos AAA e AAB. As plantas do grupo genômico AABB são semelhantes às do grupo ABB, sendo rústicas e produtivas (LIMA et al., 2003).

Na classificação de acessos desconhecidos de bananeira, devem-se

determinar, inicialmente, o número de cromossomos e a presença dos genomas A e B, para fazer a distinção entre diplóides, triplóides e tetraplóides. Caso não se disponha de infra-estrutura adequada para a contagem dos cromossomos ou para a detecção dos genomas A e B, é possível obter algum indício sobre a ploidia da planta ou a presença dos genomas A e B mediante o emprego de caracteres morfológicos (LIMA et al., 2003).

2.4 - Descrição da Planta

A bananeira é uma planta herbácea, apresentando raiz, caule, folhas, flores, frutos e sementes. O caule é representado pelo rizoma e o conjunto de bainhas das folhas de pseudocaule. Sua multiplicação se processa naturalmente no campo, por via vegetativa, pela emissão de novos rebentos a qual recebe denominações específicas de acordo com o desenvolvimento (SOUZA et al., 1999).

As principais partes da bananeira são: sistema radicular, caule subterrâneo (rizoma), pseudocaule (tronco), folhas e o cacho (engajo, raques e coração). As raízes da bananeira são inicialmente fasciculadas, apresentando-se suberosas quando maduras. De comprimento variável, podem atingir de 5 a 10 m, dependendo do genótipo e das condições edáficas. Em geral, 70% das raízes são encontradas a uma profundidade de até 20 cm (LIMA et al., 2003).

O pseudocaule termina com uma copa de folhas longas e largas com nervura central bem definida. O pseudocaule apresenta uma coloração externa verde, no entanto esta coloração pode variar a depender do genótipo e de sua origem. Genótipos com pouca pigmentação no pseudocaule tendem a se aproximar mais da espécie *Musa balbisiana* Colla e aqueles com deposição de antocianina e presença de manchas no pseudocaule tendem a se aproximar mais da espécie *Musa acuminata* Colla (STOVER; SIMMONDS, 1987).

As folhas são formadas por bainha foliar, pecíolo, nervura e limbo foliar. Sua posição varia amplamente entre grupos genômicos, sendo erectas nos diplóides e pendentes a bem arcadas nos triplóides e tetraplóides, respectivamente (SHEPHERD, 1984).

A bainha foliar apresenta base ampla que se envolvem uma na outra para formar o pseudocaule. Seu envolvimento é completo na base do pseudocaule e na

região de saída é menos envolvente dando aspecto da roseta da planta. Na parte mais alta do pseudocaule nota-se um estrangulamento em U até o início onde se iniciam os lóbulos foliares, onde surge o pecíolo da folha. O pecíolo une a bainha ao limbo, apresentando na sua parte superior um canal e na parte inferior, adquire uma forma arredondada (MOREIRA, 1999).

A coloração da parte inferior do pecíolo pode variar segundo o genótipo em estudo. As margens podem ser abertas, fechadas ou erectas com coloração diferenciada, desde púrpura, vermelha a verde (CARVALHO, 1995). Em alguns genótipos, essa faixa pode ser bem delimitada em forma de uma fita visível; em outras, presente apenas como uma linha bem discreta, e em alguns casos pode estar misturada com a cor do pecíolo e em outros estar ausente.

O prolongamento do pecíolo dá origem à nervura central, com mesma anatomia e mais fina à medida que se aproxima da parte terminal do limbo. O limbo é também formado por nervuras secundárias que se estendem desde a nervura principal até a atingir obliquamente a extremidade da folha (MOREIRA, 1999).

Quando se inicia a emergência da folha, pode-se perceber a formação de uma estrutura compacta denominada de vela, onde percebe-se um filamento (parte superior) denominado de pavio que logo desaparece. Antes da emissão da inflorescência, ocorre a emissão das últimas folhas com dimensões cada vez menores. Dentro desta, a menor de todas, a “pitoca”, com uma conformação típica, mais coriácea, podendo secar durante o desenvolvimento do cacho (MOREIRA, 1999).

Em mudas convencionais aparecem sempre manchas irregulares de cor pardo-chocolate, bem visível nas folhas. Tais manchas são formadas pela reação da antocianina ao pH do suco foliar que, nesta ocasião é mais ácido. Em mudas agregadas a mãe isso não acontece, sendo mais comum em mudas denominadas “guarda-chuva” que apresentam folhas típicas de uma planta adulta e não é aderida à planta mãe (MOREIRA, 1999).

Logo após a diferenciação foliar, surge a gema floral, (SIMMONDS, 1973). Esta fase floral é percebida pela forma cônica adquirida pelo ápice meristemático, ainda no interior do pseudocaule. A partir deste ponto, esta começa

a crescer até o rompimento da bainha foliar que a protege. Nessa fase, ocorre a formação do palmito, que confere juntamente com a fibra das bainhas, resistência à planta para suportar o peso do cacho e a formação do engaço, que é o pedúnculo da inflorescência na qual poderá ser revestido de pêlos rudimentares com comprimento e densidade variando de acordo com a cultivar. A inflorescência pode ficar em posição ereta, horizontal ou pendida para baixo (MOREIRA, 1999).

O desenvolvimento dos grupos de flores formam as pencas (mão) e cada penca apresenta um número variável de frutos (dedos) que se originam por partenocarpia. A ráquis é a continuação do engaço. É dividida em ráquis feminina, ráquis masculina e ráquis hermafrodita, conforme o sexo das pencas das flores que nela se inserem. A ráquis inicia-se na primeira penca termina no botão floral. Algumas vezes a ráquis é tida pelos produtores como a parte masculina desse órgão (MOREIRA, 1999).

O coração ou inflorescência é formado por brácteas estas vão caindo e expondo as flores masculinas que secam e caem, formando um eixo denominado de ráquis masculinas onde nota-se as cicatrizes florais, denominadas de almofadas (CARVALHO, 1995; DANTAS et al., 1999).

As brácteas que protegem as pencas são sempre caducas nos grupos femininos e podem permanecer nos grupos masculinos, a qual denominamos de “rabo sujo”, ao passo que plantas de “rabo limpo”, são aquelas onde há queda das brácteas (DANTAS, et al., 1999).

As flores são constituídas de perianto, androceu e gineceu. O perianto por apresentar cálice e a corola com mesma forma e cor, recebe a denominação de perigônio, que é a tépala maior e composta em cuja extremidade apresenta-se fendilhada resultando em uma estrutura denominada de lóbulos. O perigônio apresenta coloração creme e em alguns genótipos, apresenta manchas violáceas devido à deposição de antocianina, oposta ao perigônio existe uma peça menor, denominada de tépala livre. Esta apresenta na sua parte superior, uma estrutura fina denominada de apículo, onde abaixo dessa estrutura observa-se a formação de dobras ou rugas transversais (CARVALHO, 1995).

As flores masculinas como as femininas apresentam cinco estames (antera + filamentos) bastante semelhantes, assim como o pistilo (ovário + estilo +

estigma). Os estames das flores masculinas possuem anteras normais e os sacos polínicos estão dispostos ao longo do filamento em duas linhas paralelas. Os grãos de pólen são geralmente de cor branco-amarelada. Nas flores femininas, as anteras são atrofiadas, o filamento é mais curto e o pólen, degenerado (MOREIRA, 1999).

As flores femininas, masculinas ou hermafroditas estão reunidas em pencas separadas e protegidas cada uma delas por uma bráctea. A bráctea é sempre caduca para as femininas, podendo ou não ocorrer esse fato nas demais. A flor da bananeira comestível é completa, com os órgãos femininos e masculinos, verificando-se em algumas a atrofia das anteras (flores femininas) que formarão as pencas (frutos) e, em outras ocorre atrofia dos ovários (flores masculinas). Tal característica permite identificar os sexos das flores (DANTAS et al., 1999; MOREIRA, 1999).

A polinização da bananeira é cruzada, pois a maturação dos órgãos masculinos e femininos ocorre em épocas diferentes (dicogamia) e geralmente é feita por insetos. A polinização só é realizada objetivando o melhoramento genético já que os frutos da bananeira originam-se por paternocarpia. (JESUS, 2006).

2.5 - Uso de Variedades resistentes

A maioria das cultivares de bananeira originaram-se no Sudoeste do Continente Asiático. As cultivares de banana mais difundidas no Brasil são: Prata, Pacovan, Prata Anã, Maça, Mysore, Terra e D'Angola, do grupo AAB, utilizadas unicamente para o mercado interno; e Nanica, Nanicão e Grande Naine, do grupo AAA, usadas principalmente para exportação e mercado interno. Em menor escala, são plantadas a 'Ouro' (AA), a 'Figo Cinza' e a 'Figo Vermelho' (ABB), a 'Caru Verde' e a 'Caru Roxa' (AAA). As variedades Prata, Prata Anã e Pacovan são responsáveis por aproximadamente 60% da área cultivada com banana no Brasil (SILVA et al., 2004).

As bananas 'Pacovan', 'Prata', 'Terra' e 'Mysore' apresentam porte alto. A banana 'Maça' é altamente suscetível ao mal-do-Panamá; as cultivares Nanica,

Nanicão, Grande Naine, Terra e D'Angola apresentam alta suscetibilidade aos nematóides; e a 'Mysore' está infectada com BSV (*Banana streak vírus*, agente causal das estrias-da-bananeira). Todas essas cultivares são suscetíveis ao moko e, à exceção da 'Mysore', são também susceptíveis à sigatoka-negra (BORGES et al., 2006).

A 'Pacovan' destaca-se por sua rusticidade e produtividade; apresenta frutos 40% maiores que aqueles do tipo Prata, e um pouco mais ácidos e com quinias que permanecem mesmo depois da maturação. A 'Prata Anã', também conhecida como 'Enxerto' ou 'Prata de Santa Catarina', apresenta as pencas mais juntas que as da 'Prata', com frutos do mesmo sabor e com pontas em formato de gargalo. A 'Maçã', a mais nobre para os brasileiros, apresenta frutos com casca fina e polpa suave, que lembra a maçã. As variedades Cavendish (Nanica, Nanicão e Grande Naine), também conhecidas como banana d'água, apresentam frutos delgados, longos, encurvados, de cor amarelo-esverdeada ao amadurecer, com polpa muito doce e que são usados nas exportações. A 'Terra' e a 'D'Angola' apresentam frutos grandes, com quinias proeminentes, que são consumidos cozidos ou fritos. A 'Mysore' apresenta frutos com casca fina, de cor amarelo-pálida e polpa ligeiramente ácida, que apresentam grande adstringência quando consumidos antes do completo amadurecimento (BORGES, 2006).

Segundo Cordeiro e Mesquita (2000), a Sigatoka-amarela (*M. musicola*), Sigatoka-negra (*M. fijiensis*), mal-do-Panamá (*F. oxysporum* f. sp. *cubense*), Moko ou Murcha bacteriana da bananeira, *Ralstonia solanacearum* (Smith) raça 2 (*Pseudomonas solanacearum* (Smith)), Nematóides (*Radopholus similis* (Cobb), *Helicotylenchus multincinctus* (Cobb), *Meloidogyne* spp, e *Pratylenchus coffeae* (Zimm) (FILIP; STEKHAVEN), a Broca-do-rizoma (*Cosmopolites sordidus* Germ.) e viroses BBTV (*Banana bunchy top virus*) e CMV (*Cucumber mosaic virus*) são as principais doenças e pragas da bananeira no Brasil e no mundo.

O uso de cultivares resistentes poderá tornar-se a principal forma de controle à disposição dos produtores rurais como estratégia ideal do ponto de vista econômico, social e de preservação do meio ambiente. Por meio da utilização de cultivares resistentes, o controle genético de doenças tem sido possível; geralmente

com novas cultivares, por hibridação ou seleção dentro dos recursos genéticos existentes, apresentando-se como um dos principais meios de ação no mundo com vista ao controle de várias doenças de difícil manejo (CORDEIRO,1999).

Em virtude da grande relevância desta espécie para a população brasileira, a Embrapa iniciou o seu Programa de Melhoramento Genético da Bananeira em 1983 com o objetivo de obter híbridos tetraplóides superiores (AAAB), resistentes às principais doenças da bananeira, produtivos, com porte e ciclo reduzidos e com frutos tipo 'Prata' (SILVA et al., 2002).

Segundo Borges et al. (2006), o Programa de Melhoramento Genético da Bananeira da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (PMG Bananeira) tem recomendado, em parceria com outras instituições ou não, uma série de novas cultivares, as quais são descritas a seguir :

- **Caipira:** pertencente ao grupo AAA, de porte médio a alto, frutos pequenos e muito doces. Possui resistência à Sigatoka-negra, à Sigatoka-amarela, ao mal-do-Panamá e à Broca-do-rizoma.

- **Bucaneiro:** híbrido tetraplóide (AAAA), tipo Gros Michel, derivado de Highgate, porte médio a alto, resistente ao mal-do-Panamá e a Sigatoka negra.

- **Tropical:** híbrido do grupo AAAB da variedade Yangambi n°2, com frutos do tipo 'Maça'. Possui porte médio a alto. Os frutos grandes, grossos e com sabor semelhante aos da variedade Maça. Além de resistente à Sigatoka-amarela, é tolerante ao mal-do-Panamá.

- **Japira, Preciosa e Pacovan Ken:** híbridos de Pacovan do grupo AAAB. Possuem porte alto, apresentam número, tamanho, teores de açúcar na polpa de frutos e produtividade superiores aos da 'Pacovan'. Além de resistentes à Sigatoka-negra, apresentam resistência à Sigatoka-amarela e ao mal-do-Panamá. A depender da localidade, uma dessas cultivares pode comportar-se melhor que a outra.

- **Fhia-18:** é cultivar tetraplóide AAAB, híbrido da prata-anã é bananeira geneticamente alterada a partir de uma variedade originária de Honduras, apresenta porte médio, ciclo vegetativo de 353 dias, perfilhamento bom, os cachos podem atingir até 40 Kg, com mais de 10 pencas, possui frutos mais doces que os da 'Prata Anã' e resistência à Sigatoka-negra, principal doença da

bananeira.

- **BRS Caprichosa:** tetraplóide AAAB resultante do cruzamento do diplóide (AA) M-53 com plantas da cultivar prata comum (AAB), além de resistente à Sigatoka-negra e ao mal-do- Panamá, apresenta rendimento agrônômico até cinco vezes superior à cultivar prata comum. Seus frutos quando maduros a casca tem coloração amarelo intensa, polpa de coloração creme, com sabor e textura idênticos à cultivar prata comum e são também resistentes ao despencamento quando comparados a essa cultivar.

- **BRS Garantida:** é um tetraplóide do grupo genômico AAAB, resultante do cruzamento do diplóide (AA) M-53 com a cultivar Prata São Tomé (AAB), e foi avaliada com relação a resistência à Sigatoka-amarela e ao mal-do-Panamá, em Cruz das Almas, BA, e com relação à Sigatoka-negra, em Manaus, AM.

- **PV 03-76:** resultante híbrido tetraplóides (AAAB), mediante cruzamento de diplóide (AA) e cultivares triplóide (AAB) com boa produtividade. A variedade encontra-se em fase de avaliação em diferentes condições edafoclimáticas no Estado do Pará com características de resistência à Sigatoka-negra.

- **PA 4244:** híbrido tetraplóide (AAAB), tipo Prata, (Prata anã x M53), resistente a Sigatokas amarela e negra. A escolha da cultivar de bananeira depende da preferência do mercado consumidor e do destino da produção (indústria ou consumo *in natura*). Existem quatro padrões ou tipos principais de cultivares de bananeira: Prata, Maçã, Cavendish (Banana D'Água ou Caturra) e Terra. Dentro de cada tipo há uma ou mais cultivares.

2.5.1 - Variedade Thap Maeo (AAB)

Introduzida da Tailândia e selecionada pela EMBRAPA. É uma cultivar do grupo AAB, muito semelhante à Mysore com pseudocaule vigoroso, porte médio a alto, de cor verde-avermelhado com manchas escuras e ótimo perfilhamento. Apresenta as margens do pecíolo vermelhas. O cacho é praticamente cilindro (14 kg). Os frutos variam de pequenos a médios (78g) externamente semelhantes aos da Maçã, apresentam poucas quinas e sabor doce, mas quando consumidos antes do ponto ideal de consumo é adstringente. A cultivar é resistente às Sigatokas

amarela e negra, ao mal-do-Panamá e à Broca-do-rizoma. Apresenta rusticidade a solos de baixa fertilidade, com produtividade média de 25 $\text{há}^{-1}\text{ano}^{-1}$. Em solos mais férteis produz 35 $\text{t ha}^{-1}\text{ano}^{-1}$ (VALE, 2010).

2.6 – Propagação da Bananeira

A propagação da bananeira se dá vegetativamente, a partir da separação de brotos do rizoma da planta mãe alcançando um baixo rendimento. O método é conhecido como via vegetativa ou *in vivo* (MOREIRA, 1999).

As mudas devem ser retiradas de pomar sadio, com manejo adequado e com boas práticas agrícolas, uma vez que têm sido relatados problemas fitossanitários que são propagados através de mudas do tipo convencional, colocando em risco o empreendimento, como o mal-do-Panamá (*F. oxysporum* f. sp. *cubense*); a broca-do-rizoma (*C. sordidus*); os nematóides (*R. similis*, *H. multincinctus*, *Meloidogyne* spp, e *P. coffeae*); o moko, *R. solanacearum* raça 2 (*P. solanacearum*); a podridão-mole (*Erwinia*. spp, *E. Musea* e *E. carotovora* subsp. *carotovora*) e viroses como BBTV (*Banana bunchy top virus*) e CMV (*Cucumber mosaic vírus*) (CORDEIRO; MESQUITA, 2000).

Os métodos de propagação de bananeira, segundo Souza et al. (2000), são: propagação convencional, fracionamento de rizoma, propagação rápida *in vivo* e micropropagação ou propagação *in vitro*, os quais são descritos a seguir:

2.6.1 - Propagação convencional

Por tratar-se de frutos partenocárpicos e efetivamente estéreis, convencionalmente a banana é propagada por meio de rizomas (separação de brotos do rizoma-mãe, fracionamento do rizoma, propagação rápida). Uma bananeira pode produzir tantas mudas quanto forem as folhas emitidas até o surgimento do cacho. Em estudos realizados, foi observado que o número médio de folhas produzidas pelas mudas de bananeira durante três ciclos não foi superior a 12,5 (COSTA et al., 2007).

Dependendo da cultivar, do porte da bananeira e da idade da planta-mãe,

o potencial de produção de rebentos emitidos até o surgimento do cacho pode ser reduzido a aproximadamente 25% (BORGES et al., 2004; VUYLSTEKE; DE LANGHE, 1985).

Portanto, o método de propagação convencional de banana está entre os principais aspectos que limitam a expansão da cultura da bananeira, pois além de apresentarem baixo rendimento no número de propágulos produzidos (VUYLSTEKE, 1989), podem se constituir num poderoso mecanismo de disseminação de pragas, fungos e nematóides (SAGI et al., 1998; ROELS et al., 2005), e ocasionar perdas de até 100% na produtividade (SILVA et al., 2003).

Além da baixa taxa de multiplicação e da possibilidade de comportarem-se como vetores na disseminação de doenças as mudas obtidas pelo processo convencional de propagação, apresentam grande desuniformidade, o que dificulta o manejo do pomar. Muito embora os métodos de propagação convencional estejam sendo aperfeiçoados de modo a elevar a taxa de multiplicação e incrementar a produção de mudas de qualidade, estes métodos têm sido considerados como pouco efetivos quanto à sanidade e uniformidade das plantas obtidas (BORGES et al., 2004).

Na propagação convencional, diversos tipos de mudas podem ser utilizados: do tipo chifrinho, de 20 cm a 30 cm de altura, apresentando folhas lanceoladas, as do tipo chifre, que possuem 50 cm a 60 cm de altura, com folhas lanceoladas, as do tipo chifrão, com 60 cm a 150 cm de altura, possuindo folhas lanceoladas e folhas de planta adulta e são consideradas mudas ideais para o plantio neste método de propagação. Além dessas ainda são utilizadas as mudas do tipo guarda-chuva, do tipo rizoma e pedaços de rizoma (BORGES, 2004)

Segundo Moreira (1999), a classificação leva em consideração o peso da muda após o “escalpelamento”, ou seja, a limpeza da muda. Sendo consideradas como chifrinho até 1 kg, chifre de 1 kg a 2 kg, chifrão de 2 kg a 3 kg, muda alta de 3 kg a 5 kg. As mudas de rizomas inteiros possuem um desenvolvimento mais rápido quanto maior for o seu peso.

2.6.2 - Fracionamento de rizoma

Após a retirada do rizoma do campo, as raízes, partes necrosadas e com

sintomas de ataque da broca-do-rizoma são retiradas; eliminam-se as bainhas foliares e posteriormente fraciona-se o rizoma em quantas partes for possível levando em consideração as gemas existentes e o tamanho do rizoma a ser fracionado. Ressalta-se a importância do peso das mudas e da cultivar, uma vez que mudas pequenas poderão comprometer o processo. As mudas devem ter entre 1 kg e 1,5 kg para as cultivares do subgrupo Cavendish e para cultivares do subgrupo Prata este autor sugere um acréscimo de 30% a 40% no tamanho do rizoma (MOREIRA, 1999)

2.6.3 - Propagação rápida *in vivo*

A principal vantagem desta técnica é a de produzir muda em maior quantidade em relação aos métodos anteriormente citados, além de uma boa qualidade fitossanitária das mudas desde que os rizomas sejam livres de doenças. Para este método torna-se necessário o uso de telados ou viveiros. Após a coleta da muda no campo, é promovida a desinfestação. Em seguida retiram-se as bainhas foliares até exposição da gema apical e plantio superficial em areia lavada e esterilizada, em recipiente móvel e cobertura com saco plástico transparente (GANEM, 2008)

Após esta etapa, elimina-se a gema apical assepticamente com lâmina afiada, quebrando a dominância apical, favorecendo o desenvolvimento de gemas laterais. Retiram-se as bainhas das gemas laterais com lâmina desinfetada com álcool, expondo o meristema vegetativo. Com isso inicia-se a formação de calo e brotos. Retiram-se os brotos de no mínimo 15 cm. Os brotos devem ser plantados em recipiente de 300 mL aproximadamente, com substrato esterilizado, composto de terra vegetal, areia, esterco e pó de serra na proporção de 1:1:1:1 e levados à câmara úmida até emitirem folhas novas e raízes. Finalmente as mudas são transferidas para sacos de polietileno com 4 kg da mesma mistura utilizada anteriormente para a aclimatização antes do plantio no campo (GANEM, 2008).

2.6.4 - Micropropagação

A propagação convencional da bananeira enfrenta dificuldades, pois além

de ser lenta e apresentar uma baixa taxa de multiplicação, pode constituir uma forma de disseminação de pragas e doenças. Métodos de propagação vêm sendo desenvolvidos e aperfeiçoados com o objetivo de elevar a taxa de multiplicação e de incrementar a produção de mudas de melhor qualidade (SOUZA et al., 1999).

Entre esses métodos se destaca a micropropagação ou propagação *in vitro* que foi inspirado na tendência natural que tem a bananeira de produzir muda adventícia, a partir de ferimentos em meristema de gemas laterais. Possibilita a produção em áreas menores, de uma grande quantidade de mudas livres de doenças e de ciclos mais curtos. A micropropagação contribui para uma melhoria da sanidade e uniformidade do material cultivado em campo, bem como para a propagação de clones que apresentem melhores características agronômicas. Para o melhoramento genético desta cultura, a micropropagação é uma ferramenta útil, por meio de indução e exploração da variação somaclonal espontânea ou induzida através de agentes mutagênicos físicos ou químicos, além de apresentar um rendimento de 150 a 300 mudas por matriz, num período de 6 a 8 meses (SOUZA et al., 2000).

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação, é a aplicação mais prática e de maior impacto da cultura de tecidos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Os avanços conquistados no campo da fisiologia vegetal nos últimos 40 anos proporcionaram o desenvolvimento de tecnologias de propagação alternativas aos métodos convencionais através da cultura de tecidos (FLORES, 2003). Esta técnica de propagação vegetativa envolve a seleção da fonte de explante, desinfestação dos tecidos e a introdução em ambiente asséptico em meios de crescimento, enraizamento e aclimatização (VASIL, 1994). Tendo em vista que as plantas são obtidas em ambiente asséptico, esta técnica possui grande aplicação e aceitação mundial possibilitando o intercâmbio de material vegetal isento de patógenos entre os países, evitando assim, barreiras fitossanitárias.

A micropropagação, por ser uma técnica que permite a produção massal de plantas a partir de um mínimo de material utilizado como explante primário, é de particular importância para espécies onde o método de propagação convencional

é pouco eficiente. Esse fato pode lhe conferir ainda uma vantagem do ponto de vista ecológico na conservação *ex situ* de espécies nativas raras e ameaçadas de extinção ou ainda recalcitrantes, bem como evitando a retirada de grandes quantidades de exemplares dos habitats naturais para exploração econômica (FLORES, 2003).

As principais vantagens deste método são as altas taxas de multiplicação em comparação aos métodos tradicionais e a eliminação de doenças promovendo uma alta qualidade fitossanitária das mudas. Além disso, a micropropagação é muito utilizada para conservação de germoplasma e produção de mudas básicas de novas cultivares de bananeira desenvolvidos pelos programas de melhoramento genético (SOUZA et al., 2000).

As principais desvantagens são: tecnologia são o alto custo, a instabilidade do valor biológico (variação somaclonal) das mudas micropropagadas (FÁRIL; MELO, 1996).

Para que a aplicação da micropropagação na produção de mudas se torne viável comercialmente e possa competir com os métodos tradicionais de propagação (estaquia, enxertia, mergulhia etc), é necessário reduzir os custos de produção, que se devem, em grande parte, às perdas causadas pela contaminação *in vitro*; por desordens fisiológicas e morfológicas nas plantas; à baixa percentagem de sobrevivência das plantas no estágio de aclimatização às condições *ex vitro*; à necessidade de mão-de-obra especializada, para a intensiva manipulação dos frascos e das plantas e, sobretudo, ao elevado custo de funcionamento e manutenção das salas de crescimento com regime de luz artificial e temperatura controlada, onde as culturas *in vitro* são normalmente incubadas (ERIG; SCHUCH, 2005).

Os primeiros relatos sobre a aplicação da micropropagação, cultura de tecidos ou propagação *in vitro* de espécies do gênero *Musa* datam da década de 1960. A literatura dispõe de inúmeros trabalhos que podem confirmar o sucesso da produção de mudas de bananeira *in vitro* (BRAGA et al., 2001; LEMOS et al., 2001; DEBIASI et al., 2002; SANTOS; RODRIGUES, 2004).

Recentemente trabalhos foram realizados na micropropagação de bananeira com as variedades 'Mysore', 'IAC 2001', 'Grande naine' e 'Mysore' (PEREIRA et al.,

2009; PEREIRA et al., 2010; PEREIRA et al., 2011) e ainda alguns autores relatam sobre a qualidade genética e fitossanitária das mudas produzidas (OLIVEIRA et al., 1997; ALVARES; CALDAS, 2002; COSTA et al., 2006). Desde então tem ocorrido uma grande intensificação dos trabalhos de pesquisa a fim de tornar a técnica cada vez mais eficiente, produtiva e menos onerosa (SENDIN, 2001; SILVA et al., 2002; COSTA et al., 2007).

Com isso, no que se refere à cultura da bananeira, a propagação *in vitro* constitui uma importante ferramenta para obtenção massal de clones de genótipos elite (KOZAI et al., 1997), facilitando a distribuição, a conservação e o intercâmbio de germoplasma, além de proporcionar a rápida propagação e validação de variedades recentemente lançadas pelos programas de melhoramento genético da bananeira (GÜBBÜK; PEKMEZCI, 2004) tendo em vista as limitações dos métodos de propagação convencional.

O cultivo *in vitro* vem se tornando uma técnica cada vez mais comum no mercado visando suprir a demanda de uma produção agrícola cada vez mais tecnificada (MENDES et al., 1996) e já tem sido aplicada com sucesso para muitas espécies dentre as quais: abacaxi (MOREIRA et al., 2006; COSTA et al., 2006; SILVA et al., 2007;) e mandioca (OLIVEIRA et al., 2000; SATO et al., 2001).

2.6.5 - Etapas da micropropagação

Um trabalho de micropropagação geralmente envolve seis etapas: preparativa, estabelecimento, multiplicação, alongamento, enraizamento e, por fim, a aclimatização. Considera-se a fase inicial do cultivo *in vitro*, a preparação das plantas matrizes, destinadas ao fornecimento dos explantes primários para o cultivo. Esta etapa requer atenção especial, pois é nesta etapa que se escolhem os melhores materiais para o cultivo, sendo determinante a escolha de plantas matrizes sadias, vigorosas, isenta de qualquer tipo de estresse e em pleno crescimento vegetativo (PASQUAL et al., 2001).

A segunda etapa que envolve o processo de micropropagação é a fase de estabelecimento. Segundo Torres et al. (1998), é composta pelos seguintes procedimentos: coleta, desinfestação, isolamento e cultivo dos explantes em

meio de cultura e sob condições assépticas.

Um fator determinante da sobrevivência dos explantes durante os estágios iniciais é o meio de cultura no qual estes são inoculados. O meio de cultura deve conter em sua composição sais e vitaminas necessárias ao desenvolvimento da planta durante essa fase. Diversos tipos de meios podem ser usados no início dos cultivos (BOMFIM, 2006), e apesar de serem encontrados na literatura vários tipos de meios propostos para o cultivo de diversas espécies, para a bananeira é comum o uso do meio MS descrito por Murashige e Skoog (1962).

A terceira etapa envolve o processo de multiplicação, onde os propágulos são multiplicados em escala durante sucessivos subcultivos em meio próprio de multiplicação, de modo que as partes formadas ou são subdivididas em partes menores ou são individualizadas para formação de novos explantes (BOMFIM, 2006). No caso da bananeira o meio de multiplicação mais indicado é o meio MS acrescido de reguladores vegetais, que possuem efeito na quebra da dominância apical e na proliferação de gemas axilares.

Segundo Tombolato e Costa (1998), a concentração e o tipo de citocinina são fatores que mais influenciam na taxa de multiplicação dos explantes, sendo que para a bananeira é geralmente acrescido ao meio MS, 6-Benzilaminopurina (BAP), em concentrações variando de 0,5 a 7,5 mg L⁻¹ (OLIVEIRA et al., 2001; BRAGA et al., 2001; LIMA; MORAES, 2006). Para esta fase, Pasqual et al. (2001) atentam ainda para a importância das condições ambientais da sala de crescimento (local de armazenamento dos frascos contendo as plantas durante o cultivo) serem favoráveis, principalmente no que diz respeito a luminosidade e temperatura, tendo em vista que a fase de multiplicação é considerada a mais longa de todo o processo. Uma vez multiplicados em número suficiente, dependendo da espécie, o material geralmente é transferido para meios de alongamento e/ou enraizamento para formação de raízes adventícias, sendo que esta fase pode durar de 30 a 45 dias. Posteriormente, as mudas são transferidas para substrato ou solo apropriado visando à aclimatização finalizando assim o processo.

2.7 – Mudas Micropropagadas

As mudas micropropagadas de bananeira são produzidas em laboratório sob condições assépticas, por meio de segmentos pequenos do ápice caulinar, os explantes, sendo o cultivo feito em meio artificial e sob condições de temperatura, fotoperíodo e luminosidade controlados (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A muda produzida por cultura de tecidos permite alcançar a qualidade genética e fitossanitária desejadas, além do considerável aumento do número de plantas dentro de curto espaço de tempo (SOUZA et al., 2000). A utilização desta técnica em âmbito comercial já é realidade em diversos países. Os laboratórios comerciais trabalham com o objetivo de suprir as necessidades de material de propagação livre de doenças e de acelerar os métodos convencionais de propagação vegetativa (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

No Brasil, existem cerca de cento e dezenove laboratórios de cultura de tecidos; oitenta e nove cadastrados no sistema da Redbio-Embrapa (2008) pertencentes a instituições públicas como universidades e empresas de pesquisas governamentais. Os laboratórios da Embrapa, da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S/A. (Epagri) e Bioagro (UFV) têm como atividade principal a pesquisa, muito embora também comercialize seus produtos. Os outros laboratórios cadastrados são de empresas particulares e trabalham com uma grande diversidade de espécies, como plantas medicinais, ornamentais, essências florestais, hortaliças e frutíferas, como a Multiplanta e a Campo Biotecnologia, SBW, Banatech, etc

Diversos fatores devem ser controlados para que se obtenha êxito no processo de micropropagação, como o material propagativo a ser utilizado, o genótipo da planta, os meios de cultivo, as condições ambientais, variações somaclonais, os reguladores de crescimento utilizados e os métodos de assepsia (SOUZA; PEREIRA, 2007; LAKSHMANAN et al., 2006; SANTOS; RODRIGUES, 2004)

2.8 - Fatores que interferem na micropropagação.

2.8.1 - Desinfestação

A grande limitação da micropropagação da bananeira é a alta incidência de contaminação fúngica e/ou bacteriana, proveniente do explante ou do meio ambiente. A contaminação por bactérias é considerada a mais importante (LEIFERT et al., 1991; HAMILL et al., 1993).

Grattapaglia e Machado (1998) recomendam o uso de fungicidas e antibióticos tanto para a desinfestação dos explantes quanto, adicionados ao meio de cultura, para o controle da contaminação por fungos e bactérias endógenos da bananeira.

Para Pollock et al. (1983), o fungicida tem de apresentar amplo espectro de ação, e baixa toxicidade para as culturas (em concentrações necessárias para controlar os fungos); enquanto que os antibióticos são usados para o controle de contaminações bacterianas endógenas, que representam sério problema no estabelecimento das culturas. Os explantes, depois de reduzidos os contaminantes superficiais, podem ser transferidos para meio nutritivo contendo antibiótico (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Os antibióticos mais usados em cultura de tecidos vegetais possuem ação bacteriostática e não bactericida.

O controle de bactérias endógenas pode ser efetivado através da adição no meio de cultivo de sulfato de estreptomicina, ampicilina, carbecilina, rifampicina da trimetropina, polimixina ou cefotaxima, em diferentes concentrações (TORRES et al., 1998). Ainda, para minimizar a contaminação microbiana, inúmeros protocolos de esterilização são apresentados por diversos autores. Estes relatam o uso de substâncias como hipoclorito de sódio, etanol 70% e, em alguns casos, a adição de antibióticos ao meio de cultura (GARCIA; RAFAEL, 1990; LEIFERT et al., 1991; BUCKLEY et al., 1995; TAHPRESERT; REED, 1998).

Para o controle de fungos pode ser utilizado o fungicida Carbendazin 500 SC (Benzimidazol) em concentrações que variam de 3,3% a 6,6% por 20 minutos (NIETSCHKE, et al., 2006)

A desinfestação de explantes é iniciada com o uso de substâncias que possuem ação germicida, dentre as quais, compostos à base de cloro, como: o

hipoclorito de sódio ou hipoclorito de cálcio. O hipoclorito de sódio por ser um alvejante comercial (2 a 2,5% de cloro ativo) em sua composição e de fácil acesso é o mais utilizado em laboratórios de cultura de tecidos (GRATAPAGLIA; MACHADO, 1998). Os produtos químicos mais comumente utilizados na desinfestação são os compostos à base de cloro, como o hipoclorito de sódio (NaHClO) em várias concentrações de cloro ativo (1 a 2,5%) (CAMOLESI et al., 2007; PEREIRA et al., 2011) e o hipoclorito de cálcio $[Ca(OCl)_2]$. O etanol 70% ou absoluto por 1 a 3 minutos, devido sua toxicidade (GERRA et al., 2001; CID; ZIMMERMANN, 2006) e o formaldeído (PARDO et al., 2006). Outros produtos são relatados como o cloreto de mercúrio ($HgCl_2$) que é de difícil eliminação dependendo do tecido (PALU et al., 2011); o ácido clorídrico; o cloreto de benzalcônio; o peróxido de hidrogênio, mertiolate; isopropanol e triquartenário de amônio (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O processo de desinfestação superficial é realizado mediante a imersão do explante em álcool comercial a 70% por 5 minutos, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) comercial (2,5 % de cloro ativo) e água deionizada autoclavada, acrescido de Tween 20 (duas gotas por litro), durante 3 minutos, e lavagem em água esterilizada por três a cinco vezes (CASTRO et al., 2009).

Os diferentes agentes anti-sépticos aplicados na micropropagação são de grande importância no estabelecimento dos explantes. Perdas de 20% a 55% em vários laboratórios foram relatadas por Leifert et al. (1994), e podem inviabilizar a micropropagação comercial de mudas de bananeiras, elevando sobremaneira os custos de produção.

Um dos principais fatores a serem considerados está relacionado às condições fitossanitárias da planta-matriz, pois esta determinará a facilidade ou não em descontaminar o explante. Durante a coleta da muda que dará origem ao explante o maior nível de assepsia possível deve ser mantido com a utilização de instrumentos limpos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A utilização de produtos químicos deve ser avaliada quanto à concentração e o tempo de imersão para observar o impacto destes produtos sobre o explante. Altas concentrações e tempo elevado de imersão podem desinfestar de forma satisfatória, porém, a viabilidade dos explantes pode reduzir, provocando perdas; o

contrário pode não descontaminar o explante (CID; ZIMMERMANN, 2006).

Cid e Zimmermann, (2006), descrevem, ainda produtos como o 8-HQS (8-hidroxi-quinolinol-sulfato), Ribavirina (1-B-D-ribofuranosil-1,2,4-triazole-3 carboxamida) e PPM (Plant Preservativ Mixture), usados em cultura de tecidos de inúmeras espécies.

De acordo com Pereira et al. (2009, 2010, 2011), trabalharam com hipoclorito de sódio, e antibióticos, em diferentes variedades de banana como 'IAC 2001, 'Grande naine' e 'Mysore', demonstrando que, diferentes métodos de assepsia podem empregados para cada cultivar de banana, sendo ainda necessários ajustes para melhorar a eficiência no processo de desinfestação (BRAGA et al., 2001; CARNEIRO et al., 1999; HABIBA et al., 2002; MEDINA, 2003; OLIVEIRA et al., 2000).

2.8.2 – Microrganismos Endofíticos

Na micropropagação de plantas, inúmeros microrganismos, podem estar presentes colonizando várias partes da planta como raízes, caule e folhas, contaminando os explantes. Estes microrganismos, muito embora na cultura de tecidos apresentem o aspecto negativo da contaminação do material a ser multiplicado, implicando em grandes perdas e onerando custos dentro do laboratório (RODRIGUES, 2005; CARNEIRO et al., 2000; LIMA ; MORAES, 2006), alguns possuem um grande potencial ecológico benéfico quando são demonstradas suas aplicações na agricultura, no controle biológico, no crescimento vegetal, indução de resistência e síntese de compostos de grande importância biotecnológica (BERNARDES, 2006).

A agricultura atual tem lançado mão do uso intensivo de defensivos e fertilizantes químicos como ação de controle de pragas e deficiências nutricionais que a produção vegetal tem demandado; uma ação não ecológica que tem provocado inúmeros efeitos em toda a cadeia produtiva das espécies vegetais cultiváveis provocando profundas modificações biológicas (WEBER et al., 2000).

Segundo Azevedo et al. (2000), microrganismos endofíticos são aqueles que habitam o interior da planta em pelo menos um período do seu ciclo de vida

não provocando nenhum dano aparente.

Os microrganismos endofíticos possuem várias aplicações na produção agrícola: fixação biológica de nitrogênio e resistência a condições de estresse salino e hídrico (AZEVEDO et al., 2000), biocontrole de doenças através da resistência sistêmica induzida - RSI (OLIVEIRA et al., 2004), produção de fitohormônios e outros compostos de interesse biotecnológico como enzimas e fármacos (AZEVEDO et al., 2000). Os gêneros de maior ocorrência são: *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Burkholderia* (TEIXEIRA et al., 2007), *Bacillus* (FIGUEIREDO et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2007), *Klebsiella* (MARTÍNEZ et al., 2003).

Atualmente vários estudos têm sido conduzidos com o objetivo de isolar, identificar e estudar a diversidade de bactérias endofíticas nos tecidos de várias espécies de plantas. Teixeira et al. (2007) isolaram 482 microrganismos endofíticos em mandioca, em três estados brasileiros, em que os gêneros mais freqüentes foram: *Bacillus*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Serratia*, *Escherichia*, *Burkholderia* e *Stenotrophomonas*, sendo o gênero *Bacillus* encontrado com maior freqüência em todas as regiões amostradas. Os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* são considerados agentes de biocontrole de doenças de plantas, demonstrando o grande potencial para utilização na agricultura, com a redução do uso de produtos químicos no controle de pragas; enquanto *Enterobacter* é descrito como antagonista de *Pythium* spp. causando podridão das raízes de pepino. A espécie *Bacillus subtilis* promoveu o incremento na nodulação de raízes e no crescimento de plantas de feijoeiro (LAZZARETTI; MELO, 2005).

Há poucos relatos na literatura sobre a caracterização das bactérias endofíticas na cultura da bananeira. Weber e Freire (2003) observaram que a espécie *Burkholderia cepacia* reduziu a incidência de fusariose na bananeira cultivar Maçã, os autores também demonstraram a associação dessa bactéria nas cultivares Couruda, Prata e Pacovan, promovendo efeitos benéficos no desenvolvimento das mudas.

2.8.3 - Oxidação

Existem alguns fatores que limitam, em parte, o processo de micropropagação de algumas cultivares de bananeira e que interferem principalmente na taxa de multiplicação, entre os quais, temos a alta taxa de oxidação dos explantes, a qual é caracterizada pelo escurecimento das partes excisadas dos explantes e do meio de cultivo, influenciando na absorção dos constituintes do meio pelo explante em virtude da obstrução do tecido oxidado. Tal oxidação é resultante da liberação de compostos fenólicos *in vitro*, precursores da síntese de lignina pelo tecido injuriado. Os compostos fenólicos sofrem oxidação pelas enzimas polifenases, produzindo substâncias tóxicas que normalmente inibem o crescimento dos explantes, ocasionando, a morte dos mesmos (COSTA et al., 2006).

A oxidação fenólica pode ser minimizada pela redução de danos mecânicos e químicos nos explantes, pela modificação de ambientes, e ou pelo uso de antioxidantes (BASSAN et al., 2006). A utilização de diversos antioxidantes é relatada na literatura, tanto para bananeira quanto para outras culturas, como alternativa para a diminuição do processo de oxidação. Recomenda-se a adição dessas substâncias ao meio de cultivo ou durante o pré-tratamento, para diminuição da oxidação (CAMOLESI et al., 2007).

Em alguns casos, o uso de cloreto de mercúrio resulta num menor dano e oxidação do tecido (ZIV; HALEVY, 1983). A remoção dos polifenóis oxidados imediatamente após a desinfestação contribui para redução da oxidação em fases posteriores de cultivo. A lavagem do explante por 2 a 3 horas pode contribuir para reduzir a exudação e oxidação posterior durante o cultivo (LANE, 1979). Outra medida bastante eficaz na remoção dos fenóis oxidados consiste na transferência do explante para meios frescos a cada 1 a 4 semanas de cultivo. Para aqueles casos em que se observa intenso escurecimento em volta do explante, é necessária a transferência para meios frescos ou mesmo a mudança de lugar do explante dentro do mesmo frasco de cultura.

O ágar parece contribuir para uma maior oxidação dos explantes e esta oxidação está associada a quantidade de ágar utilizado. A redução da concentração de ágar de 0,8 para 0,4% pode resultar numa redução substancial da oxidação. Da

mesma forma, o uso de agarose e, principalmente, “gelrite” ou “phytagel” contribui significativamente para a redução do nível de oxidação fenólica. A lavagem do ágar com água deionizada contribui adicionalmente para uma menor oxidação dos tecidos injuriados (ALVES, 2007).

Segundo Van Winkle et al. (2003) dentre os antioxidantes usados, destaca-se o carvão ativado, um componente que tem sido freqüentemente adicionado aos meios de cultura de tecidos vegetais com sucesso. O carvão ativado, usado como substância antioxidante, apresenta cargas residuais, as quais são capazes de adsorver substâncias fenólicas ou seus produtos da oxidação, as quinonas. O uso de carvão ativado, contudo, pode adsorver outras substâncias do meio nutritivo tais como os reguladores de crescimento, acarretando efeitos indesejáveis ao cultivo. Uma alternativa para estes casos é ajustar a concentração de reguladores vegetais de tal forma a se obter o efeito desejado.

Costa et al. (2006) adicionando 0 e 3 g L⁻¹ de carvão ativado ao meio de cultura MS reduziram significativamente a taxa de multiplicação e o nível de oxidação de brotações de bananeira, cultivar Grande Naine. Para evitar a oxidação em explantes de bananeira Gupta (1986) verificou que o ácido ascórbico foi mais efetivo do que o ácido cítrico e o carvão ativado, na concentração de 25 mg L⁻¹. Resultados semelhantes tinham sido obtidos por Vuylsteke e De Langhe (1985).

Camolesi et al. (2007) utilizaram a combinação dos antioxidantes, ácido cítrico e citrato de potássio; no controle da oxidação *in vitro* de ápices caulinares de bananeira cultivar Maçã pré-tratados com essas substâncias. Outros antioxidantes foram testados em pré-tratamento de ápices caulinares de bananeira sendo que Jarret et al. (1985), realizando uma rápida imersão dos ápices caulinares em solução de 50 mg L⁻¹ de cisteína, antes da inoculação no meio de cultivo, também observaram redução no escurecimento dos ápices caulinares e na coloração do meio de cultivo.

O PVP (polivinilpirrolidona) é outro antioxidante que tem sido bastante empregado, visto evitar a oxidação dos explantes pela atuação das enzimas fenolases, é uma poliamida utilizada em cromatografia de separação de ácidos aromáticos, aldeídos e fenóis pela sua função adsorvente. Os fenóis são adsorvidos pelo PVP por meio de ligações de hidrogênio, o que previne a oxidação e

polimerização, além de adsorver os produtos da oxidação fenólica, ou seja, as quinonas. (PASQUAL et al., 1997). Augusto e Biasi (2002) controlaram a oxidação de amoreira-preta (*Rubus* sp.) com a adição de 1 g L⁻¹ PVP solúvel no meio sólido. De acordo com Cordeiro et al. (2002), o antioxidante PVP foi altamente eficiente no controle da oxidação em sementes de paricá. Segundo Figueiredo et al. (2001) na micropropagação de biribá (*Rollinia mucosa* Jacq Baill) a utilização de 0,5 g L⁻¹ de PVP foi eficiente no controle da oxidação. Já para o estabelecimento de embriões de guarirobeira (*Syagrus oleracea* (MART.) BECC.) o PVP a 0,4 g L⁻¹ não foi eficiente (MELO et al., 2001).

O estabelecimento das culturas *in vitro* podem apresentar melhores resultados quanto à intensidade de oxidação caso os explantes sejam cultivados no escuro ou em baixa intensidade luminosa durante as primeiras semanas de cultivo, mesmo após este período, o cultivo em condições de luminosidade intermediária contribui para prevenir a oxidação e melhorar o crescimento do explante (DURAND-CRESSWELL et al., 1982).

2.8.4 - Reguladores Vegetais

Indispensáveis ao cultivo *in vitro*, os reguladores de crescimento têm contribuído para o desenvolvimento da cultura de tecidos de plantas. De acordo com Hinojosa (2000), denomina-se regulador vegetal uma substância química sintética que compartilha com os hormônios vegetais a maioria de suas características.

As citocininas são as de caráter púrico, N⁶-furfurilaminopruina (CIN) e 6-benzilaminopurina (BAP) e a de caráter não púrico, o thidiazuron (TDZ) (CID, 2000). O ácido naftaleno acético (ANA) e o BAP são amplamente utilizados na cultura de tecidos e outros menos utilizados, como as Giberelinas (MATSUMOTO, 2000), o Ácido abscísico (LEMOS, 2000) e Poliaminas. São utilizados em todas as fases (estabelecimento, multiplicação enraizamento e aclimatação) da propagação *in vitro* dependendo do objetivo do trabalho e conforme a cultura a ser pesquisada (SOUZA; PEREIRA, 2007).

Na agricultura atual, o uso de fitorreguladores é uma prática comum e

bastante eficiente nas condições *in vivo* como, por exemplo, na indução do florescimento, de raízes e na produção de frutos sem sementes (LEÃO et al., 2004; LEDO et al., 2004; MINDELLO NETO et al., 2006), e *in vitro*, na regeneração de calos, na brotação de gemas laterais, no enraizamento entre inúmeras outras aplicações (WEBER et al., 2000; HINOJOSA, 2000; UTINO et al., 2001; LEMOS et al., 2001; COSTA, et al., 2006; SOUZA ; PEREIRA, 2007).

Na micropropagação da bananeira, o regulador de crescimento mais utilizado é um citocinina, o 6-Benzilaminopurina (BAP), aplicado na fase de multiplicação dos explantes. A concentração utilizada depende do genótipo e do tipo de explante. Alguns autores utilizam baixas concentrações para o cultivo de meristemas ou ápices caulinares na fase de estabelecimento, como 2,5 mg L⁻¹ (BERNARDI et al., 2004), 1,0 mg L⁻¹ (UTINO et al., 2001), 3,5 mg L⁻¹ (DINIZ et al., 1999) e 5,0 mg L⁻¹ (BRAGA et al., 2001). As concentrações de citocininas utilizadas na micropropagação de bananeiras na fase de multiplicação estão entre 1,0 mg L⁻¹ e 10,0 mg L⁻¹ (QUISEN et al., 2004; BERNARDI et al., 2004; BRAGA et al., 2001).

A definição do tipo e da concentração ótima de citocinina para a multiplicação *in vitro* da bananeira constitui um passo importante e dependerá do genótipo da planta; o seu uso estimula uma maior produção de brotos e alta taxa de multiplicação em micropropagação (LEMOS et al., 2001), mas o seu excesso é tóxico, podendo causar efeito negativo no comprimento do broto à medida que aumentam os níveis de BAP (COSTA et al., 2006).

Oliveira et al. (2001) em experimento com bananeira FHIA-01 (AAAB) suplementaram o meio com diferentes doses de BAP (0; 2,5; 4,0; 5,0 e 7,5 mg L⁻¹) e estimaram que na concentração de aproximadamente 4,9 mg L⁻¹ ocorreu a maior taxa de multiplicação. Observaram ainda que no desenvolvimento *in vitro* das plântulas também deve ser levada em consideração a escolha da melhor concentração de BAP. A altura das plântulas durante a multiplicação é inversamente proporcional à concentração de BAP. As plântulas obtidas nas concentrações acima de 5,0 mg L⁻¹ apresentaram tamanho reduzido, o que é indesejável no processo de micropropagação.

Lima e Moraes (2006) trabalharam com diferentes doses do BAP nas

cultivares Caipira (AAA), Thap maeo (AAB) e os híbridos JV03-44 (AAAB) e FHIA-01 (AAAB) e observaram a necessidade de se determinar concentrações ótimas distintas para cada cultivar durante o processo de multiplicação *in vitro*. Estudos realizados com diferentes concentrações de BAP com a cultivar Grande Naine demonstraram que a utilização de doses de $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP em meio de cultura com carvão ativado não exerceu nenhuma influência sobre comprimento, taxa de multiplicação, oxidação, vigor e número de raízes (COSTA et al., 2006). No caso da produção comercial de mudas micropropagadas de bananeira, sem o uso do regulador de crescimento BAP, o processo seria inviabilizado (CID, 2000).

Os trabalhos com o regulador de crescimento cinetina para bananeira são escassos tendo ainda que ser mais estudados. Muhammad et al. (2007) quando não utilizaram a cinetina ao meio obtiveram 1,3 brotos por explante. Já com a adição de 8 g L^{-1} de cinetina ao meio de cultura observou-se 4,5 brotos por explantes, concluindo que o regulador pode ser utilizado na micropropagação de bananeira Basrai na Índia.

Com relação ao Ácido Indol Butirico (AIB) vários trabalhos foram realizados visando o enraizamento *in vitro*. Molla et al. (2004), em bananeira da cultivar Bari, os quais evidenciaram maior número médio de raízes por explante com aumento do período de cultivo em meio de enraizamento *in vitro*, independentemente das concentrações de AIB estudadas. Adicionalmente, foi observado pouco incremento no número de raízes entre o 20º e 25º dia de cultivo, com maior média (8,28 raízes) aos 35 dias de cultivo *in vitro* na presença de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB.

Trabalhando com *Musa sapientum* cv. BARI-I, Rahman et al. (2004) também constataram incremento no número de raízes com o tempo de cultivo *in vitro*, embora a média obtida nesta espécie tenha sido relativamente baixa (2,83 raízes aos 30 dias de cultivo). Oliveira et al. (2008), utilizando 1 mg L^{-1} de AIB obtiveram na fase de indução de raízes em brotações de bananeira *in vitro* ocorreu até os 14 dias de cultivo em meio de enraizamento, sendo que, após esse período, houve apenas o crescimento em tamanho das raízes.

2.8.5 - Variação Somaclonal

A variação somaclonal pode ser definida como uma variabilidade genética gerada durante a cultura *in vitro* que permite o aparecimento de indivíduos diferentes da planta matriz (LARKIN; SCOWCROFT, 1981). Inicialmente, houve uma expectativa de que a variação somaclonal poderia ser útil para a geração de novos genótipos com características desejáveis.

Segundo Santos e Rodrigues et al. (2004) as variantes mais encontradas em mudas microrpropagadas da variedade 'Pacovan' foram:

- Variante de cacho (VC) - caracterizou-se por apresentar a planta com as propriedades morfológicas normais da cv. *Pacovan*, como altura da planta, coloração e forma das folhas e pseudocaule, exceto pela conformação do cacho;

- Variante variegada (VV) caracterizou-se por apresentar variegações em todas as partes da planta, das folhas ao pseudocaule incluindo o cacho. Os descendentes apresentaram o mesmo tipo de variegação dessa planta que revelou potencial para ornamentação;

- Variante morfológica da forma da folha associada a uma variação da clorofila na folha (VMFF-VCF) caracterizou-se pelo estreitamento do limbo foliar com um afilamento pronunciado na ponta da folha, deixando-a com forma lanceolada. Associada a essa característica, um dos lados da folha, geralmente o direito para quem vê a folha pela face inferior, é menor e com variegações acompanhando toda a extensão de sua borda. Em sua face superior, foram observadas pequenas manchas de coloração negra semelhante a queimaduras. A extremidade da borda que circunda toda a folha é ligeiramente mais grossa, dando um aspecto serrilhado a essa estrutura. A área foliar é menor que uma folha de planta normal;

- Variante da coloração do pseudocaule (VCP) caracterizou-se por apresentar coloração negra e brilhante no pseudocaule, acompanhando o engajo em tom opaco até chegar nas flores. Fica bem evidente a diferença da coloração quando comparada ao controle que possui tonalidade verde-clara e opaca.

De acordo com os autores citados no paragrafo anterior verificou-se os tipos de variantes encontrados e a porcentagem de variação somaclonal total

para cada tratamento estudado na cv. *Pacovan*. Observou-se que até em 5 subcultivos não houve a ocorrência de variantes e que a partir do 6.^o subcultivo foram detectadas variantes (4,8%), atingindo o máximo de 5,8% em nove subcultivos.

Entretanto, são raros os relatos de variantes com características de interesse (HWANG ; KO, 1987; NWAUZOMA et al., 2002). Na maioria dos casos, as anormalidades estão relacionadas, principalmente, à estatura da planta, coloração do pseudocaulo e pecíolo, arquitetura das folhas e formação dos cachos (DANIELLS et al., 2001), sendo, portanto, indesejáveis agronomicamente.

Segundo Castro et al. (2009) existem diferentes fatores que podem causar variação somaclonal em bananeira, tais como: composição do meio de cultura, taxa de multiplicação, origem do explante primário, número de subcultivos e determinados genótipos. Assim, o controle da ocorrência de variação somaclonal pode ser realizado mediante o cultivo *in vitro* em condições apropriadas, como a utilização de baixas concentrações de reguladores de crescimento e um limite de até cinco subcultivos para multiplicação.

A identificação dos variantes somaclonais mediante o uso de diferentes técnicas (ISRAELI et al., 1991; SMITH ; HAMILL, 1993; DAMASCO et al., 1996; BAIRU et al., 2006; VENKATACHALAM et al., 2007) e sua eliminação antes do estabelecimento em campo, preferencialmente ainda nas condições *in vitro*, tem grande significado para a propagação de bananeira *in vitro*, haja vista que evita um grande prejuízo econômico e a proliferação de materiais fora do padrão.

Alvares e Caldas, (2002) identificaram 4,6% de variantes somaclonais nas plantas micropropagadas da cultivar Nanicão (grupo AAA) e 1,5% da cultivar Prata-Anã (grupo AAB). Na cultivar Nanicão 3,6% das plantas eram anãs, 0,5% apresentavam as folhas em forma de roseta, e 0,5%, folhas variegadas.

Evidências de que o nanismo é o variante somaclonal mais comum foram confirmadas no presente experimento, em que alcançou 88% da variabilidade encontrada. Hwang e Ko (1987) registraram 75% de nanismo, e 40% entre variantes somaclonais do subgrupo Cavendish.

Devido à baixa altura, as plantas anãs poderiam ser desejáveis, porque são menos afetadas pelos ventos, e facilitam o manejo. Entretanto, apesar de os cachos

apresentarem número de frutos similar ao das plantas normais, a massa era 35% menor, com reflexo negativo na produção. Na Prata-Anã, 1,0% das bananeiras eram gigantes (110 cm mais altas do que as plantas normais) e 0,5% apresentaram deformações nos cachos. Apenas os variantes somaclonais com folhas variegadas puderam ser identificados nos estádios iniciais de desenvolvimento. Hwang e Ko (1987) também observaram maior frequência de variantes ocorrendo em bananeiras do grupo AAA (subgrupo Cavendish).

2.9 – REFERÊNCIAS

AGRIANUAL: anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo: Instituto FNP, 2012. p. 177-188.

ALVARES, M. C.; CALDAS L. S. Crescimento, produção e variação somaclonal em bananeiras micropropagadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 3, p. 415-420, 2002.

ALVES, E. J. **A cultura da banana: aspectos técnicos, sócio-econômicos e agroindustriais**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA-SPI/Cruz das Almas 1999. 585 p.

ALVES, S. A. O. **Resgate *in vitro* de híbridos interespecífico de dendezeiro (*Elaeis guineensis* x *Elaeis oleifera*)**. 2007. 55 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Instituto de Ciências Agrária, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2007.

AUGUSTO C. S. S.; BIASI, L. A. Micropropagação da amoreira-preta cv. Brazos. **Scientia Agrária**, Lavras, v. 3, n. 1-2, p. 113-132, 2002.

AZEVEDO, J. L.; Junior, W. M.; Pereira, J. O.; Araújo, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.

BASSAN, J. S.; REINIGER, L. R. S.; ROCHA, B. H. G.; SEVERO, C. R. P.; FLÔRES, A. V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de Canafístula (*Peltophorum dubirum* (SPRENG/TAUB)). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006.

BAIRU, M. W.; FENNEL, C. W.; STADEN, J. van. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa* AAA cv. Zelig). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, p. 347-351, 2006.

BERNARDES, F. S. **Rizobactérias na indução de resistência sistêmica em cultivos hidropônicos**. Campinas: IAC, 2006. 58 p.

BERNARDI, W. F.; RODRIGUES, B. I.; NETO, P. C, ANDO, A.; TULMANN NETO A.; VOLO, L. C C.; MONTES, S. M. N M. Micropropagação de baixo custo em bananeira cv. Maçã em meios com diferentes fontes de carbono e avaliação da performance em campo das mudas produzidas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 503-506, 2004.

BOMFIM, G. V. do. **Efeitos de lâminas e freqüências de irrigação e tipos e volumes de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro ornamental**. 2006. 167 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

BORGES, A. L.; OLIVEIRA, A. M. G.; RITZINGER, C. H. S. P.; ALMEIDA, C. O.; COELHO, E. F.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, L. S.; LIMA, M. B; FANCELLI, M.; FOLEGATTI, M. I. S.; FILHO, P. E. M.; SILVA, S. de; MEDINA, V M.; CORDEIRO, Z. J. M. **A cultura da banana/ Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**. 3. ed. rev. e amp. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica 2006. 110 p. (Coleção Plantar, 56).

BORGES, A. L.; SOUZA, L. da S. (Ed.). **O cultivo da bananeira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2004. 279 p.

BRAGA, M. F.; SÁ, M. E. L.; MUSTAFÁ, P. C. Avaliação de um protocolo para multiplicação *in vitro* da bananeira (*Musa* sp.) cv. Caipira (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 215-219, 2001.

BUCKLEY, P.; DEWILDE, T.; REED, B. Characterization and identification of bacteria isolated from micropropagated mint plants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, Netherlands, v. 31, p. 58-64, 1995.

CAMOLESI, M. R.; KAIHARA, E. S.; SACONI, C. G.; FARIA, R. T.; NEVES, C. S. V. J. Redução da oxidação na propagação *in vitro* da bananeira maçã. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1237-1241, 2007.

CARNEIRO, I. F.; ZICA, F. G.; CHAVES, L. J. Comparação de métodos de

descontaminação usados na fase inicial do estabelecimento em cultura *in vitro* de banana. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 89-94, 1999.

CARNEIRO, M. F.; SILVA, G. D.; XIMENES, P. A.; CARNEIRO, I. F.; BORGES, J. D. Avaliação de produtos na descontaminação de explantes de banana (*Musa* AAB cv. Maçã). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiania, v. 30, n. 1, p. 29-35, 2000.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L. **Fatores inerentes à micropropagação**. Campina Grande: Embrapa, 2006. p. 11-25. (Documentos, 148).

CARVALHO, P. C. L. **Estabelecimentos de descritores botânico agrônômico para caracterização de germoplasma de banana (*Musa* spp.)**. 1995. 174 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)- Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, 1995.

CASTRO, A. C. R. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. 385 p.

CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A.; SESTARI, I. **Manual de fisiologia vegetal: fisiologia de cultivos**. São Paulo: Ceres, 2008. 864 p.

CHEESMAN, E. E. Classification of the bananas. II. The genus *Musa* L. **Kew Bulletin**, London, n. 2, p.106-117,1948.

CID, L. P. B. Citocinina. In: CID, L. P. B. (Ed.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: EMBRAPA, 2000. 180 p.

CID, L. P. B.; ZIRMMERMANN, M. J. **A Contaminação *in vitro* de plantas**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília: 2006. 20 p. (Boletim e Pesquisa e Desenvolvimento, 122)

CORDEIRO, I. M. C. C.; LAMEIRA, O. A.; LOPES, S. C.; RIOS, M. S. Germinação *in vitro* de paricá. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 27, n. 26, p. 57-61, 2002

CORDEIRO, Z. J. M.; MESQUITA, A. L. M. Manejo integrado das pragas, doenças e plantas daninhas. In: CORDEIRO, Z. J. M (Org.). **Banana Fitossanidade**. Brasília: EMBRAPA, 2000. p. 15-20.

CORDEIRO, Z. J. M. **Doenças**. In: ALVES, E. J. (Org.). **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. Brasília: Embrapa-NPMF, 1999. p. 353-407.

COSTA A. S.; ARRIGONI-BLANK M. F.; BLANK AF.; MENDONÇA A. B.; AMANCIO V. F.; LEDO A. S. Estabelecimento de alecrim-pimenta in vitro. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 68-72, 2007.

COSTA, F. H. S.; PEREIRA, J. E. S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P. Efeito da interação entre carvão ativado e N⁶-benzilaminopurina na propagação in vitro de bananeira, cv. Grand Naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 280-283, 2006.

DANIELLS, J.; JENNY, C.; KARAMURA, D.; TOMEKPE, K. Diversity in the Genus *Musa*. In: ARNAUD, E.; SHARROCK, S. (Ed.). **Musalogue: a catalogue of Musa germplasm**. Montpellier: INIBAP, 2001. 213 p.

DAMASCO, O. P. I. D.; GODWIN, M. K.; SMITH E S. W. Gibberellic acid detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish bananas. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Collingwood, v. 36, n. 2, p. 237-241, 1996.

DANTAS, A. C. V. L.; DANTAS, J. L. L.; ALVES, E. J. Estrutura da planta. In: ALVES, E. J. **A cultura da banana**. Brasília: Embrapa-SPI, 1999. p. 47-60.

DEBIASI, C.; ZAFFARI, G. R.; GUERRA, M.P. Efeito da radiação fotossintética ativa no desenvolvimento inicial de bananeira *in vitro*. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 2, p.175-176, 2002.

DECLERCK, S., J. M. RISEDE E B. DELVAUX. Greenhouse response of micropropagated bananas inoculated with in vitro monoxenically produced arbuscular mycorrhizal fungi. **Scientia Horticulturae**, Netherlands, v. 93, n. 3-4, p. 301-309, 2002.

DINIZ, J. D. N.; HERNANDEZ, F. F. F.; GONÇALVES, A. N.; TORRES, A. C. Absorção de micronutrientes por explantes de bananeira in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 8, p. 1385-1391, 1999.

DURAND-CRESSWELL, R.; BOULAYL, M.; FRANCLLET, A. Vegetative propagation of eucaliptus. In: BONGA; DURAZAN (Ed.). **Tissue Culture in Forestry** Netherlands: The Hague, 1982. p. 15-151.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005.

FÁRIL, M.; MELO, N. F. Automação e racionalização na micropropagação industrial. **Boletim Informativo da Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas**, Lavras, n. 26, p. 2-6, 1996.

FIGUEIREDO, D. V.; BRIOSO, P. S. T.; PCR *multiplex* para a detecção de BSV e CMV em bananeiras micropropagadas. **Summa Phytopathol**, Botucatu, v. 33, n. 3, p. 229-232, 2007.

FIGUEIREDO, S. F. L.; ALBARELLO, N. VIANA, V. R. C. Micropropagation of *Rollinia mucosa* (jacq.). Baill. **In Vitro Cell Developmental Biology Plant**, Netherlands, v. 37, p. 471-475. 2001.

FIORAVANÇO, J. C. Mercado mundial de banana: produção, comércio e participação brasileira. **INFORMAÇÕES ECONÔMICAS**, São Paulo, v. 33 n.10, p. 15-27, 2003.

FLORES, P. S. **Propagação *in vitro* e *in vivo* de *Hippeastrum aulicum* (Ker-Gawler) Herb. (Amaryllidaceae)**. 2003. 154 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais)- Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

GANEM, S. T. S. **Bactérias endofíticas em explantes de bananeira tropical e galil 18**. 2008. 57f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semi-Árido)- Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, 2008.

GANGA, R. M. D. Resultados parciais sobre o comportamento de seis cultivares de banana (*Musa* spp) em Jaboticabal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém. **Anais...** Belém Embrapa/DDT, 2002. 1CD-ROM.

GARCIA, E. G.; RAFAEL, M. Control de la oxidación y contaminación em microesquejes de café (*Coffea arábica* 'Catimor') cultivados "*in vitro*". **Agronomia Tropical**, Maracay, v. 40, n. 4-6, p. 281-290, 1990.

GERRA, M. P.; VESCO, L. D.; DUCROQUET, J. P.; NODARI, R. O.; REIS, M. S. Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**,

Campinas, v. 13, n. 2, p.117-128, 2001.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/SPI, 1998. p. 183-260.

GUBBUK H, PEKMEZCI M. In vitro propagation of some new banana types (*Musa* spp.). **Turk. J. Agric**, Turquia, v. 28, p. 355-361, 2004.

GUPTA, P. F. Erradication of mosaic disease and rapid clonal multiplication of bananas and plantains through meristem tip culture. **Plant Cell Organ Culture**, Dordrecht, v. 6, n. 1, p. 33-39, 1986.

HABIBA, U.; REZA, S.; SAHA, M. L; KHAN, M. R; HADIUZZAMAN, S. Endogenous bacterial contamination during *in vitro* culture of banana: identification and prevention. **Plant Tiss Cult**, Netherlands, v. 12, n. 2, p. 117-124, 2002.

HAMILL, S. D.; SHARROC, S. L.; SMITH, M. K. Comparasion of descontamination methods used in initiation of banana Tissue cultures from field-collected suckers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 33, n. 3, p. 343-346,1993.

HINOJOSA, G. F. Auxinas. In: BARRUETO CID, L. P. **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: EMBRAPA, 2000. 180 p.

HWANG, S. C.; KO, W. H. *In vitro* somaclonal variation in bananas and its application for screening for resistance to *Fusarium* wilt. In: PERSLEY, G. J.; LANGHE, E. A. de (Ed.). **Banana and plantain breeding strategies**. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 1987. p. 151-156.

ISRAELI, Y.; REUNEVI, O.; LAHAV, E. Qualitative aspects of somaclonal variation by *in vitro* techniques. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 48, n. 2, p. 71-88, 1991.

JARRET, R. L.; RODRIGUEZ, W.; FERNANDEZ, R. Evaluation, tissue culture, propagation and dissemination of 'Saba' and 'Pelipita' plantains in Costa Rica. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 25, p.137-147, 1985.

JESUS, O. N. **Caracterização morfológica e molecular de cultivares de bananeira**. 2006. 98 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Universidade Fed

eral Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

KOZAI, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B. R. Environmental control for the large scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 51, p. 49-56, 1997.

LANE, W. D. Regeneration of pear plants from shoot meristems-tips. **Plant Science Letters**, Ireland, v.16, n. 3, p. 337-342, 1979.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 60, p. 197-214, 1981.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R.J.; AITKEN, K.S.; GROF, C.P.L.; BONNETT, G.D.; SMITH, G.R. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, Oxon, v. 41, p. 345–363, 2006.

LAZZARETTI, E.; MELO, I. S. **Influência de *Bacillus subtilis* na promoção de crescimento de plantas e nodulação de raízes de feijoeiro**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2005. 22 p. (Embrapa Meio Ambiente. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 28).

LEÃO, P. C. S.; SILVA, J. D.; SILVAL, E. E. G. Anelamento e reguladores de crescimento: efeitos sobre as medidas biométricas e qualidade de cachos da videira 'Superior Seedless'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 385-388, 2004.

LEDO, A. S.; GONDIM, T. M. S.; OLIVEIRA, T. K.; NEGREIROS, J. R. S.; AZEVEDO, F. F. Efeito de indutores de florescimento nas cultivares de abacaxizeiro RBR-1, SNG-2 e SNG-3 em Rio Branco-Acre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 395-398, 2004.

LEIFERT, C.; MORRIS, C. E.; WAITES, W. M. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants; reasons for contamination problems *in vitro*. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.13, n. 2, p.139-183, 1994.

LEIFERT, C.; CAMOTTA, H.; WRIGHT, S.M.; WAITES, B.; CHEYNE, V. A. ; WAITES, W. M. Elimination of *Lactobacillus plantarum*, *Corynebacterium spp.*, *Staphylococcus saprophyticus* and *Pseudomonas paucimobilis* from

micropropagated Hemerocallis, Chisya and Delphinium cultures using antibiotics. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 71, n. 4, p. 307-330, 1991.

LEMOS, E. E. P. Ácido abscísico. In: CID, L.; P. B. (Ed.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: EMBRAPA, 2000. 180 p.

LEMOS, E. E. P.; FERREIRA, M. S.; ALENCAR, L. M. C.; OLIVEIRA, J. G. L.; MAGALHÃES, V. S. Micropropagação de clones de banana cv.terra em Biorreator de Imersão Temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 482-487, 2001.

LICHTEMBERG, L.A.; LICHTEMBERG, P. S. F. Avanços na bananicultura brasileira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, volume especial, p. 29-36, 2011.

LIMA, J. D.; MORAES, W. S. Concentração de benzilaminopurina e avaliação de protocolo para multiplicação *in vitro* de genótipos de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 36, n.1, p.13-19, 2006.

LIMA, J. D.; MORAES, W. S. Controle de bactérias contaminantes em explantes de bananeira (Musa AAA cv. Caipira). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 36, n. 3, p.181-186, 2006.

LIMA, M. B.; SILVA, S. de O.; FERREIRA, C. F. **Banana: O produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. 182 p.

MANICA, I. **Bananas: do plantio ao amadurecimento**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 1998. 99 p.

MARTÍNEZ, L.; MELLADO, J. C.; OROZCO, J.; ROMERO, E. M. Diazotrophic bacteria associated with banana (Musa spp.). **Plant and Soil**, Netherlands, v. 257, p.35-47, 2003.

MATSUMOTO, K. Giberelinas. In: CID, L. P. B. (Ed.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: EMBRAPA, 2000. 180 p.

MEDINA, J. R. **Bactérias associadas al cultivo del plátano (Musa sp) y su relación con el aborto del racimo**. Universidade de Puerto Rico: Recinto Universitario de Mayagüez, Mayaguez: Monzon, 2003. 92 p.

MELO, B.; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões de guaribeira [*Syagrus oleracea* (MART.) BECC]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 6, p.1301-1306, 2001.

MENDES, B. M. J.; MENDES, F. J.; TULMANN NETO, A. Efficacy of banana plantlet production by micropropagation. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 12, p. 863-867, 1996.

MOLLA, M. M. H.; KHANAM, M. D.; KHATUN, M. M.; ALAMIN, M.; MALEK, M. A. In vitro rooting and ex vitro plantlet establishment of BARI banana 1 (*Musa* sp.) as influenced by different concentration of IBA (indole 3-butyric acid). **Asian Journal of Plant Sciences**, Bholakpur. v. 3, n. 2, p. 196-199, 2004.

MOREIRA, R. S.; CORDEIRO, Z. J. M. A história da banana no Brasil. In: REUNIÃO INTERNACIONAL ACORBAT, 17., 2006, Joinville. **Anais...** Joinville: ACORBAT/ACAFRUTA, 2006. v. 1, p. 48-82.

MOREIRA, R. S. **Banana**: teoria e prática de cultivo. São Paulo: Fundação Cargill, 1999. 1CD-ROM.

MOREIRA, R. S. **Banana**: teoria e prática de cultivo. Campinas: Fundação Cargill, 1987. 335 p.

MUHAMMAD, A.; RASHID, H.; HUSSAIN, I. Proliferation-rate effects of BAP and kinetin on banana (*Musa* spp. AAA Group) 'Basrai'. **Hortscience**, Netherlands, v. 42, n. 5, p. 1253-1255, 2007.

MURASHIGE, T; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

MINDELLO NETO, U. R.; TELLES, C. A.; BIASI, L. A. Enraizamento de estacas lenhosas de ameixeiras tratadas com ácido indolbutírico. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 2, p. 448-452, 2006.

NIETSCHE, S.; MARQUES, S. V.; PEREIRA, M. C. T.; SALLES, B.; XAVIER, A. A.; FRANÇA, A. C.; LIMA, C.; SILVA, L. S. Estabelecimento *in vitro* de explantes de três cultivares de bananeira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 989-991, 2006.

NWAUZOMA, A. B.; TENKOUANO, A.; CROUCH, J. H.; PILLAY, M.; VUYLSTEKE, D.; KALIO, L. A. D. Yield and disease resistance of plantain (*Musa* spp., AAB group) somaclones in Nigeria. **Euphytica**, Netherlands, v. 123, p. 323-331, 2002.

OLIVEIRA, J. P.; COSTA, F. H. S.; SCHERWINSKIPEREIRA, J. E. Micropropagation and estimates of banana plantlets production for Western Amazon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 10, p. 1429-1432, 2008.

OLIVEIRA, R. P.; NINO, A. F. P.; SILVA, F. O. X. **Produção de mudas de amora-preta por meio de cultura de tecidos**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. 23 p. (Sistemas de Produção, 6)

OLIVEIRA, R. P.; SILVA, O. S.; SILVA, K. M.; SILVEIRA, D. G. In vitro conservation of diploid banana accessions. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 2, p. 245-249, 2000.

OLIVEIRA, R. P.; SILVA, S. O. Micropopagação massal de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 4, p. 415-420, 1997.

OLIVEIRA, R. P.; GOMES, T. S.; VILARINHOS, A. D. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 12, p. 2329-2334, 2000.

OLIVEIRA, R. P.; SILVEIRA, D. G.; SILVA, S. O. Concentração de BAP e a eficiência de micropropagação de bananeira tetraplóide (grupo AAAB). **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, n. 1, p. 73-78, 2001.

PARDO, V. M. A.; FERREIRA, A. G.; NUNES, V. F. Seed disinfection methods for in vitro cultivation of epiphyte orchids from southern Brazil. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 24, n. 2, p. 217-220, 2006.

PASQUAL, M. Meios de cultura. In: PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. v. 1, 74 p.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações – introdução: fundamentos básicos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 159 p.

PEREIRA, G. A. **Uso do gene xylA – xilose isomerase como agente de seleção na transformação genética de citros**. 2004. 38 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-ESALQ Universidade de

São Paulo, Piracicaba, 2004.

PEREIRA, G. A.; CORREA, L. S.; BOLIANI, A. C. Desinfestação e estabelecimento in vitro de explantes de bananeira 'Grande naine' em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, volume especial, p. 222-226, 2011.

PEREIRA, G. A.; BOBROFF, R. L.; LENZA, J. B.; CORREA, L. S. Diferentes concentrações de agrimicina no controle de contaminações de explantes de bananeira na micropropagação. **Cultura Agronomica**, Ilha Solteira, v. 19, p. 71-76, 2010.

PEREIRA, G. A.; RIBEIRO, B. V.; MARCÍLIO, H. C.; SANTAELLA, M. B. Desinfestação e estabelecimento in vitro de explantes de bananeira 'IAC 2001' em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Tecnologia e Ciência. Agropecuária**, João Pessoa, v. 3, n. 2, p. 43-46, 2009.

POLLOCK, K.; BARFIELD, D. G.; SHIELDS, R. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. **Plant Cell**, Amsterdam, v. 2, p. 36-39. 1983.

QUISEN, R. C.; MARI, A. O.; LOPES, C. O. Propagação in vitro de bananeira cultivar prata zulu. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém, n. 42, p. 213-220, 2004.

RAHMAN, M. Z.; NASIRUDDIN, K. M.; AMIN, M. A.; ISLAM, M. N. In vitro response and shoot multiplication of banana with BAP and NAA. **Asian Journal of Plant Sciences**, Bholakpur. v. 3, n. 4, p. 406-409, 2004.

RODRIGUES, P. H. V. In vitro establishment of *Heliconia rauliniana* (Heliconiaceae). **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 62, n. 1, p. 69-71, 2005.

ROELS, S.; ESCALONA, M.; CEJAS, I.; NOCEDA, C.; RODRIGUEZ, R.; CANAL, M.J.; SANDOVAL, J.; DEBERGH, P. Optimization of plantain (*Musa AAB*) micropropagation by temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and OrganCulture**, Amsterdam, v. 82, p. 57-66, 2005.

SAGI, L.; MAY, G. D.; REMY S.; SWENNEN, R. Recent developments in biotechnological research on bananas (*Musa* spp.). **Biotech. Genet. Engineer. Rev**, Andover, v.15, p. 313-327, 1998.

SANTOS, C. C.; RODRIGUES, P. H. V. Variação somaclonal em mudas micropropagadas de bananeira, cultivar pacovan. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 2, p. 201-205, 2004.

SATO A.Y; MARIA J; SEDIYAMA T; BORÉM A; CECON PR; JUNQUEIRA C.S. Micropropagação da mandioca: influência da concentração de amônio com e sem BAP. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 48, p. 405-413, 2001.

SENDIN, A. P. P. M. **Micropropagação de bananeira dos cultivares Maçã e Grande Naine visando a produção de mudas de baixo custo**. 2001. 72 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

SHEPHERD, K. Observations on *Musa* taxonomy. In: IDENTIFICACION OF GENETIC DIVERSITY IN THE GENUS *MUSA*, 1., 1988, Los Baños **Proceedings...**Montpellier: INIBAP, 1990. 158-165 p.

SHEPHERD, K. Banana: taxonomia e morfologia. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE BANANICULTURA, 1., 1984, Jaboticabal. **Anais...**: FACVJ, 1984. v.1, p. 50-74.

SILVA, S. O.; SANTOS-SEREJO, J. A.; CORDEIRO, Z. J. Variedades. In: BORGES, A. L.; SOUZA, L. S. O. (Ed.). **Cultivo da bananeira**. Cruz das Almas. EMBRAPA, 2004. p. 45-58

SILVA, J. T. S.; NHUT, D. T.; TANAKA, M.; FUKAI, S. The effect of antibiotics on the in vitro growth response of chrysanthemum and tobacco stem transverse thin cell layers (tTCLs). **Scientia Horticulture**, Amsterdam, v. 97, p. 397-410, 2003.

SILVA, S. O. ALVES, E. J.; LIMA, M. B.; SILVEIRA, J. R. Melhoramento genético de fruteiras. In: BRUCKNER, C.; H. (Ed.). **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa: UFV, 2002. 422 p.

SILVA, A. B.; PASQUAL, M.; TEIXEIRA, J. B.; ARAUJO, A. G. Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 9, p. 1257-1260, 2007.

SMITH, M. K.; HAMILL, S. D. Early detection of dwarf off-types from

micropropagated bananas. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Collingwood, v. 33, p. 639-644, 1993.

SOUZA, A. S. Propagação. In: ALVES, E. J. (Org). **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. Brasília: Embrapa- SPI/Cruz das Almas: Embrapa-NPMF, 1999. p. 151-195.

SOUZA, A. S.; CORDEIRO, Z. J. M.; TRINDADE, A. V. Produção de mudas. In: CORDEIRO, Z. J. M. (Org.). **Banana Produção: aspectos técnicos**. Brasília: EMBRAPA, 2000. p. 39-46.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas in vitro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.

SOUZA, S.A.; LEDO, C. A. S.; SILVEIRA, D. G.; SOUZA, F. V. D.; FARIA, G. A.; NETO, H. P. S.; SANTOS SEREJO, J. S.; SILVA, K. M.; COSTA, M.A.P.C.; SOARES, T. L.; JUNGHANS, T. G.; ALMEIDA, W. B. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2006, 151 p.

STOVER, R.H.; SIMMONDS, N. W. Bananas. 3. ed. England. **Longman Scientific & Technical**. London: Longmans, 1987.

TAHPRESERT, P.; REED, B. Detection and identification of bacterial contaminants of strawberry runner explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 52, p. 53-55, 1998.

TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S.; VIEIRA, R.F.; COSTA F. E. C. HARAKAVA, R. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 42, n.1, p. 43-49, 2007.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES A. C.; CALDAS L. S.; BUSO, J. A. (Ed). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF.: CNPH – Embrapa, 1998. v. 1, p. 11-20.

UTINO, S.; CARNEIRO, I. F.; CHAVES, L. J. Crescimento e oxidação de explantes de bananeira-prata (Musa AAB) In Vitro. I. Concentrações de sais de

ferro, cobre e zinco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 225-229, 2001.

VALE, L. S. R. **Fruticultura**. Ceres: Ministério da Educação Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica Instituto Federal Goiano, 2010. 184 p.

VAN WINKLE, S.; JOHNSON, S.; PULLMAN, G. S. The impact of gelrite and activated carbon on the elemental composition of plant tissue culture media. **Plant Cell Report**, New York, v. 21, p.1175-1182, 2003.

VASIL, I. Automation in plant propagation. **Plant, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 39, n.2, p. 105-109, 1994.

VENKATACHALAM, L.; SREEDHAR, R. V.; BHAGYALAKSHMI, N. Genetic analyses of micropropagated and regenerated plantlets of banana as assessed by RAPD and ISSR markers. **In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant**, New York, v. 43, p.267-274, 2007.

VUYLSTEKE, D.; DELANGHE E. E E.. Feasibility of in vitro propagation of bananas and plantains. **Tropical Agriculture**, Amsterdam, v. 62, n. 4, p. 323-328, 1985.

VUYLSTEKE, D. **Shoot-tip culture for the propagation and exchange of Musa germplasm; practical manual for handling crop germplasm in vitro**. Rome: IBPGR, 1989. 56 p.

WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Bactérias diazotróficas em mudas de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n.11, p. 2277-2285, 2000.

WEBER, O. B.; FREIRE, F. C. O. Contribuição de bactérias diazotróficas na cultura da bananeira: perspectivas de utilização na produção integrada. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 16**. Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente. 2003. 29p.

ZIV, M.; HALEVY, A. H. Control of oxidative browning and *in vitro* propagation of *Strelitzia reginae*. **HortScience**, Netherlands, v. 18, p. 434-436, 1983.

3 - DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES DE BANANEIRA 'THAP MAEO' (SUB GRUPO AAB) SUBMETIDOS A CONCENTRAÇÕES DE CLORO ATIVO

RESUMO

O Estado de São Paulo é o maior produtor de banana do País. Em 2011 teve produção de 1.225.193 toneladas, produzidas em uma área de 58.720 hectares, seguido da Bahia com 1.152.892 toneladas. A maioria dos plantios de bananeira ainda são realizados utilizando mudas tradicionais do tipo chifrinho, chifre, chifrão e pedaços de rizoma. Outros métodos de propagação como a micropropagação *in vitro* vêm sendo desenvolvidos e aperfeiçoados, para elevar a taxa de multiplicação em curto espaço de tempo e melhorar a qualidade fitossanitária das mudas. Contudo, a contaminação por bactérias e fungos é um dos maiores problemas desta técnica. O objetivo foi avaliar a desinfestação *in vitro* utilizando concentrações de cloro ativo de explantes de bananeira 'Thap Maeo', sendo esta variedade resistente a Sigatoka negra, amarela e ao mal-do-Panamá. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado constituído de cinco tratamentos e cinco repetições, sendo cada repetição representada por cinco explantes em diferentes concentrações de cloro ativo por vinte minutos: T1 - testemunha - sem cloro ativo, T2 - 0,5% de cloro ativo, T3 - 1,0% de cloro ativo, T4 - 1,5% de cloro ativo e T5 - 2% de cloro ativo. Foram avaliadas as porcentagens de contaminação por bactérias e fungos como também a porcentagem de oxidação dos explantes. Os dados foram submetidos à análise de variância e análise de regressão. Os resultados permitiram concluir que a maior eficiência dentre os tratamentos testados foi o de imersão dos explantes em 2% de cloro ativo o qual proporcionou redução 92% e 88% respectivamente para bactérias e fungos. Esta concentração, mesmo resultando em 64% de oxidação dos explantes não foi fitotóxica, permitindo o desenvolvimento normal dos mesmos.

Palavras chave: *Musa* sp. Micropropagação. Cloro ativo.

DISINFESTATION AND *IN VITRO* ESTABLISHMENT OF BANANA EXPLANTS 'THAP MAEO (SUB GROUP AAB)' SUBJECT THE CONCENTRATIONS OF ACTIVE CHLORINE

ABSTRACT

The State of Sao Paulo is the largest producer of bananas in 2011 the country was producing 1.225.193 tons produced in an area of 58.720 hectares, followed with 1.152.892 tons of Bahia. Most banana plantations are still made using traditional type seedlings chifrinho horn chifrão and pieces of rhizome. Other methods of propagation such as in vitro micropropagation have been developed and improved to increase the multiplication rate in a short time and improve the health status of the seedlings. However, contamination by bacteria and fungi is a major problem in this technique. The objective was to evaluate the in vitro disinfection using chlorine concentrations of banana explants 'Thap Maeo', this variety is resistant to black Sigatoka, yellow and evil-the-Panama. The experimental design was completely randomized, consisting of five treatments and five replicates, each replicate represented by five explants in different concentrations of active chlorine for twenty minutes: T1 - without chlorine, T2 - 0.5% of active chlorine, T3 – 1,0% of active chlorine, T4 - 1.5% of active chlorine and T5 - 2% of active chlorine. We evaluated the percentages of contamination by bacteria and fungi as well as the oxidation percentage of explants. The data were subjected to analysis of variance and regression analysis. The results showed that the highest efficiency among the treatments tested was the immersion of explants in 2% of active chlorine which provided 82% reduction and 88% respectively for bacteria and fungi. This concentration, even resulting in 64% oxidation of the explants was not phytotoxic, allowing the normal development of the same..

keywords: *Musa* sp. Micropropagation. Ative chloro.

3.1 – INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos principais produtores mundiais de banana, ocupando o 5º lugar. Na primeira posição está a Índia com uma produção de 26.996.600 toneladas seguido por Filipinas, China e Equador com 9.013.190, 9.006.450 e 7.637.320 toneladas respectivamente. Em 2011, o país apresentou uma área colhida de 492.113 hectares, produzindo 7.090.619 toneladas de banana. O estado de São Paulo é o segundo maior do país em área colhida com 58.720 ha, produzindo 1.225.193 toneladas (AGRIANUAL, 2012).

As variedades de banana mais plantadas no Brasil são : ‘Nanica’, ‘Maçã’, ‘Prata’, ‘Thap maeo’, ‘Mysore’. A variedade ‘Thap maeo’ foi utilizada por apresentar frutos externamente semelhantes aos da banana ‘Maçã’, apresentar poucas quinas e sabor doce. É resistente às Sigatokas amarela e negra, ao mal-do-Panamá e a Broca-do-rizoma, além de apresentar rusticidade em solos com baixa fertilidade, com produtividade média de 25 t ha⁻¹ ano⁻¹. Em solos mais férteis produz 35 t ha⁻¹ ano⁻¹ (VALE, 2010).

A propagação da bananeira (*Musa* sp.) pode ser feita de várias formas: por sementes, ou vegetativamente por meio de mudas tipo chifrão, chifre e chifrinho ou *in vitro* (PEREIRA et al., 2009). Pelo método vegetativo por mudas, mesmo o material sendo de ótima qualidade, o processo é lento e permite a disseminação de doenças e pragas como mal-do Panamá, Sigatoka-negra, Sigatoka amarela e Broca do rizoma (SOUZA et al., 2006).

A utilização de técnicas modernas de biotecnologia como a cultura de tecidos, a manipulação genética e a biologia molecular estão sendo utilizadas para o melhoramento genético de plantas permitindo assim o desenvolvimento de novas variedades. Dentre as diversas práticas de cultura de tecidos uma das mais utilizadas é a micropropagação, que atualmente é responsável pela produção de mudas de diversas espécies com fins comerciais (PEREIRA, 2004).

A primeira aplicação comercial da micropropagação no Brasil foi feita por Morel (1960) ao multiplicar orquídeas, mediante cultura de ápices caulinares e regeneração de protocormos. Diminutas estruturas se diferenciavam e davam origem a embriões (CARVALHO et al., 2006).

O princípio básico para o sucesso da cultura de tecidos é, em parte, adotar medidas de prevenção e controle da contaminação microbiana (LEIFERT et al., 1994; SILVA et al., 2003). Isto em função da técnica proporcionar um ambiente favorável para o crescimento de microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos (DANTAS et al., 2002).

Os microrganismos contaminantes competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura, eliminando metabólitos tóxicos neste meio, podendo ocasionar a morte da plântula (PEREIRA et al., 2003). O sucesso da micropropagação depende da sequência de fases ou etapas, em que o êxito de cada uma é necessário para o êxito da próxima. A introdução dos explantes no meio de cultivo (estabelecimento), depende de uma assepsia eficiente deles a serem estabelecidos (GEORGE, 1993).

Na fase de estabelecimento *in vitro*, dependendo da origem do material a contaminação pode comprometer o trabalho de micropropagação. As porcentagens de contaminações podem variar entre as variedades. Quando é exógena o controle dos principais agentes contaminantes (fungos e bactérias) é considerável. Quando a contaminação é endógena as consequências podem ser limitantes, podendo haver perda de tempo, de recursos financeiros e de material genético (SOUZA et al., 2006). Para minimizar a contaminação microbiana, inúmeros protocolos de esterilização são apresentados por diversos autores. Estes relatam o uso de substâncias como hipoclorito de sódio (PEREIRA et al., 2009) e, em alguns casos, a adição de antibióticos ao meio de cultura (TANPRASERT; REED, 1998; REED et al., 1998; ERIG; SCHUCH, 2003; PEREIRA et al., 2009).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a desinfestação *in vitro* de explantes de bananeira 'Thap Maeo' utilizando concentrações de cloro ativo durante a fase de estabelecimento da cultura *in vitro*.

3.2 - MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Ilha Solteira. Os explantes utilizados foram obtidos de plantas matrizes originadas de clones de *Musa* sp. 'Thap

maeo' cultivada na Fazenda de Ensino Pesquisa e Extensão da UNESP, Campus de Ilha Solteira, localizada no município de Selvíria-MS, no período de 10 de abril a 10 de maio de 2011. Após a obtenção dos rizomas, os mesmos foram lavados para retirar o excesso de solo e raízes. Em seguida, as bainhas foram seccionadas com uma faca esterilizada, permitindo a redução de seu tamanho.

Utilizou-se água sanitária como fonte de cloro ativo (com 2,5% de cloro ativo), pelo fato da mesma ter um baixo custo. Os tratamentos utilizados foram: T1 – controle em água – sem cloro ativo; T2 - 0,5% de cloro ativo; T3 - 1% de cloro Ativo; T4 - 1,5% de cloro ativo e T5 - 2% de cloro ativo. Todos os explantes ficaram imersos na solução de cloro ativo durante vinte minutos. Este tempo foi utilizado em outros trabalhos apresentados com bons resultados pelos autores (COSTA et al., 2006; LIMA; MORAES, 2006; CARNEIRO et al., 2008; PEREIRA et al., 2009; SOUZA et al., 2010; PEREIRA et al., 2011). Os meristemas foram extraídos em condições assépticas e inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com sacarose a 30 g L^{-1} e o solidificante phytigel a $2,3 \text{ g L}^{-1}$, com pH ajustado para $5,8 \pm 1$ antes da autoclavagem (esterilização) a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ com 1 Kg cm^{-2} durante vinte minutos. A fase de estabelecimento foi realizada em sala de crescimento com temperatura $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz a uma intensidade luminosa de $30 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Os explantes foram avaliados após trinta dias contados da data de inoculação, período esse que compreende a fase de estabelecimento da cultura. Foram avaliadas as porcentagens de contaminação por bactéria e fungo como também a porcentagem de oxidação dos explantes.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos, cinco repetições, sendo cada repetição representada por cinco tubos contendo um explante cada. Os dados foram submetidos a análise de variância utilizando-se o programa SISVAR, e análise de regressão para as concentrações do cloro ativo.

3.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise de variância, pode-se observar que houve diferença significativa entre as doses de hipoclorito de sódio para as variáveis porcentagens de contaminação bacteriana, fungica e explantes oxidados. ($P < 0,05$) (Tabela 1). A

análise de regressão indicou equações de segundo grau, como melhor ajuste para todas as variáveis.

TABELA 1- Quadrados médios da análise de variância e níveis de significância referentes a porcentagem de explantes de bananeira 'Thap maeo' contaminados por bactérias, fungos e oxidados. Ilha Solteira-SP, 2011.

QUADRADOS MÉDIOS / CARACTERÍSTICAS			
	Contaminação por Bactérias (%)	Contaminação por fungos (%)	Oxidação (%)
Concentrações	5544,00*	5656,00*	864,00*
C.V. (%)	18,28	24,65	25,86

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.
C.V.(%)= Coeficiente de variação

Os contaminantes bacterianos apareceram, já nos cinco primeiros dias, na base dos explantes e no meio de cultura (Figura 1).

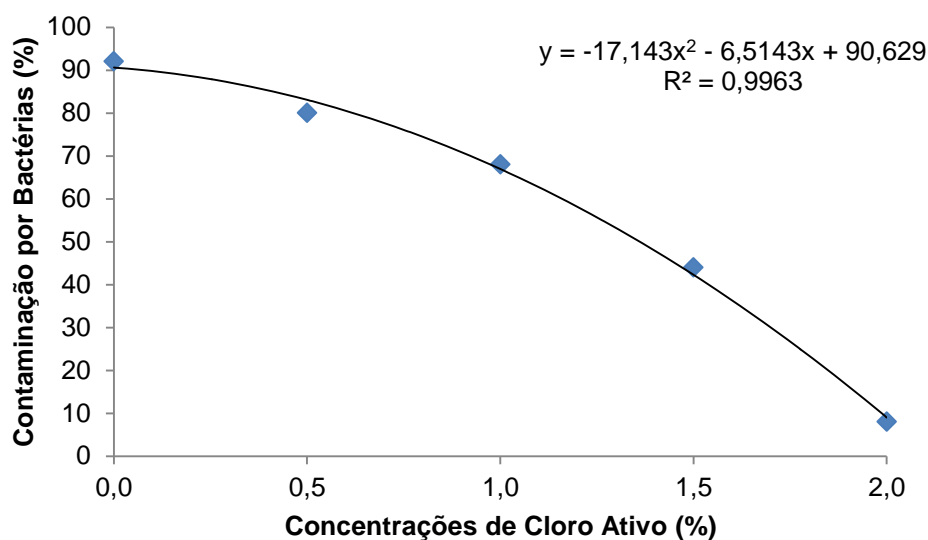
FIGURA1- Explante de bananeira 'Thap maeo' in vitro apresentando contaminação bacteriana, Ilha Solteira - SP, 2011



Fonte: PEREIRA (2011)

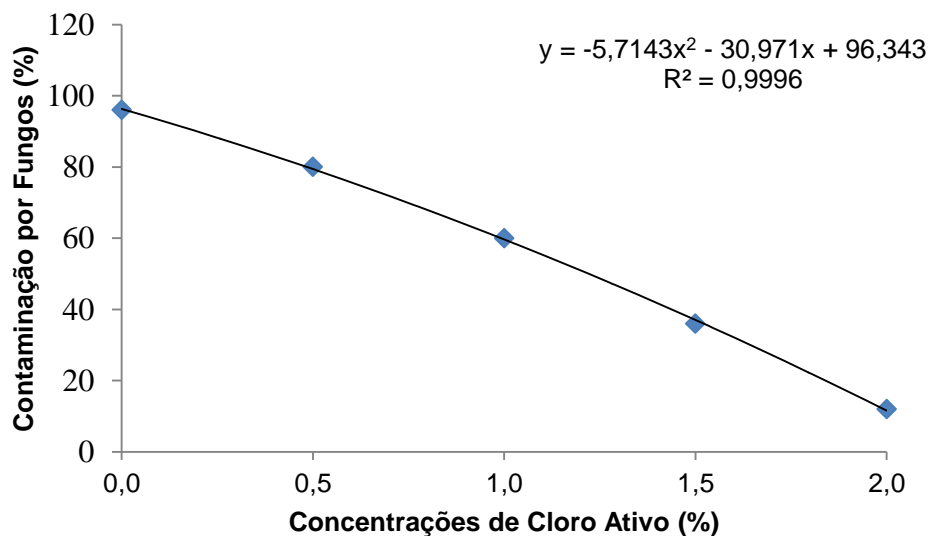
Na concentração de 2,0% de cloro ativo verificou-se taxa de 8% de contaminação por bactérias (Figura 2), mostrando assim baixa contaminação em relação ao tratamento com 0% de cloro ativo havendo 90,6% de contaminação.

FIGURA 2- Porcentagem de contaminação por bactéria em explantes de bananeira 'Thap maeo' submetidas a concentrações de cloro ativo. Ilha Solteira – SP, 2011.



Para o controle de fungos, a concentração de 2% de cloro ativo proporcionou controle de 88% de contaminantes, sendo que na concentração de 0% de cloro ativo a taxa foi de 96% de contaminação mostrando também eficiência do cloro ativo (Figura 3).

FIGURA 3 - Porcentagem de contaminação por fungo em explantes de bananeira 'Thap maeo' submetidas a concentrações de cloro ativo. Ilha Solteira – SP, 2011.



Em relação a oxidação verificou-se taxa de 64% quando se utilizou a concentração de 2% de cloro ativo (Figura 4), porém não ocasionou a morte dos mesmos permitindo o desenvolvimento e continuidade do processo de micropropagação. Essa oxidação ocorre naturalmente em bananas, sendo causadas por compostos fenólicos (Figuras 5a e 5b).

FIGURA 4 - Porcentagem de oxidação em explantes de bananeira 'Thap maeo' submetidas a concentrações de cloro ativo. Ilha Solteira – SP, 2011.

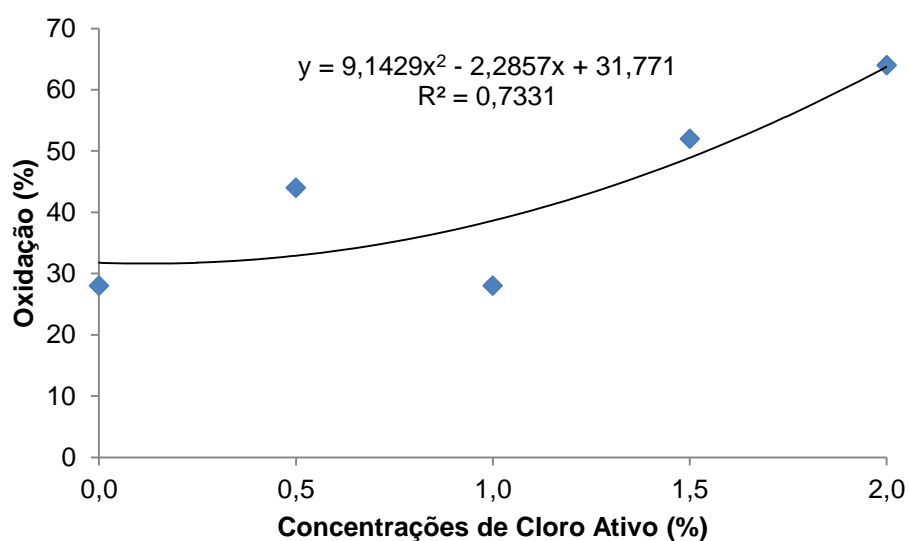
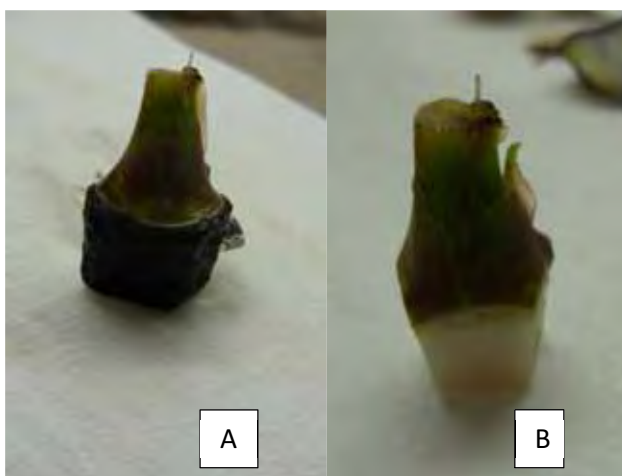


FIGURA 5 – A) Explantes de bananeira 'Thap maeo' oxidado antes da repicagem. B) explante oxidado feito limpeza para repicagem, Ilha solteira, 2011.



Fonte: PEREIRA (2011)

Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com Costa et al (2006), Lima e Moraes (2006), Carneiro et al. (2008), Pereira et al. (2009), Souza et

al. (2010), Pereira et al. (2011) em trabalhos desenvolvidos com outras variedades de banana. Corroboram também com os resultados obtidos por Vianna et al., (2003) que utilizaram como desinfestante em mamoeiro apenas hipoclorito de sódio na concentração de 1%, tendo explantes com sinais visíveis de contaminação, principalmente por bactérias. Estão de acordo também com outros autores como Picolotto et al. (2007) que utilizaram concentrações diferentes de hipoclorito de sódio em jabuticabeira e obtiveram 2% de contaminantes utilizando hipoclorito de sódio a 5%. Teixeira et al. (2008) conseguiram desinfestação adicionando 0,005% de hipoclorito de sódio ao meio de cultura para a micropropagação de *Eucalyptus pellita*. Moraes et al. (2007) obtiveram resultados semelhantes a este trabalho os quais verificaram que as concentrações de 2, 3 e 4% de hipoclorito de sódio reduziram a contaminação das gemas axilares em abacaxizeiro. Também verificaram que a concentração de 2% de hipoclorito de sódio, durante dez minutos proporcionou menor contaminação e sobrevivência de gemas axilares de abacaxizeiro. Concorda também com Chaves et al. (2004), em *Prunus* sp., que verificaram baixo índice de contaminação em explantes tratados com hipoclorito de sódio nas concentrações 0,5%, 1%, 1,5% e 2%.

Por outro lado os resultados conseguidos diferem dos dados de Palu et al. (2011) que não obtiveram êxito com hipoclorito de sódio na micropropagação de figueira, tendo que utilizar antibióticos e obtendo melhor resultado com a adição de ampicilina sódica na concentração de 250 mg L⁻¹. No estabelecimento *in vitro* de cultivares de pereira mesmo utilizando como rotina de assepsia somente álcool 70% e hipoclorito de sódio obtiveram alta taxa de contaminação bacteriana em 45,7% das gemas e 18,8% respectivamente (ERIG; FORTES 2002). Costa et al. (2007) obtiveram êxito utilizando uma baixa concentração de hipoclorito de sódio (0,8%) na micropropagação de alecrim-pimenta, discordando deste trabalho que utilizando 0,8% de cloro ativo verificou-se 70% de contaminantes

3.4 – CONCLUSÕES

- A concentração de 2% de cloro ativo proporcionou 92% de controle para bactérias, 88% para fungos, também verificou-se 64% de oxidação nos explantes, porém sem causar a morte dos mesmos.

3.5 – REFERÊNCIAS

AGRIANUAL: anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo: Instituto FNP, 2012. p. 177-188

CARNEIRO, M. F.; SILVA, G. D.; XIMENES, P. A.; CARNEIRO, I. F.; BORGES, J. D. Avaliação de produtos na descontaminação de explantes de banana (*Musa* AAB cv. Maçã). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 30, n.1, p. 29-35, 2008.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L. **Fatores inerentes à micropropagação**. Campina Grande: Embrapa, 2006. p. 11-25. (Documentos, 148).

CHAVES, A. C; SCHUCH, M.; WALMOR, B. Desinfestação de explantes de *Prunus* cv. Mr. S. 2/5 com hipoclorito de sódio e cálcio. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 2, p. 249-250, 2004.

COSTA, A. S.; ARRIGONI-BLANK M. F.; BLANK AF.; MENDONÇA A. B.; AMANCIO V. F.; LEDO A. S. Estabelecimento de alecrim-pimenta in vitro. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 25, n.1, p. 68-72, 2007.

COSTA, F. H. S.; PEREIRA, J. E. S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P. Efeito da interação entre carvão ativado e N6-benzilaminopurina na propagação in vitro de bananeira, cv. Grand Naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 280-283, 2006.

DANTAS, S.; OLIVEIRA, S.; CÂMARA, T. Contaminação microbiana no cultivo in vitro de plantas. In: LUZ, W. C. da (Org.). **Revisão anual de patologia de plantas**. 10. ed. Passo Fundo: RAPP, 2002. v.10, p. 391-407.

ERIG, A C.; FORTES, G. R. Estabelecimento de pereira (*Pyrus* spp.) *in vitro* a partir de meristemas e gemas. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria. v. 32, p. 577-582, 2002.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento in vitro de plantas de Macieira (*Malus domestica* Borkh.) CVS, Maxigala e Mastergala. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 3, p. 221-227, 2003.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. 2. ed. London: Exegetics, England, 1993. p. 98-165.

LEIFERT, C.; MORRIS, C. E.; WAITES, W. M. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants; reasons for contamination problems in vitro. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.13, n. 2, p.139-183, 1994.

LIMA, J. D.; MORAES, W. S. Controle de bactérias contaminantes em explantes de bananeira (Musa AAA cv. Caipira). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 36, n. 3, p. 181-186, 2006.

MORAES, A. M; ALMEIDA, F.A.C.; FILHO, J.C. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de gemas axilares de abacaxizeiro. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, João Pessoa. v. 1, n. 2, p. 39-44, 2007.

MOREL, G. M. Producing virus free cymbidiuns. **American Orchid Society Bulletin**, Palm Beach, v. 29, p. 495-497, 1960.

MURASHIGE, T; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

PALU, E. G.; CORREA, L. S.; SUZUKI, A. N.; BOLIANI, A. C. Uso de antibióticos para o controle de bactérias endógenas visando à micropropagação da figueira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 587-592. 2011.

PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 827-834, 2003.

PEREIRA, G. A. **Uso do gene xylA – xilose isomerase como agente de seleção na transformação genética de citros**. 2004. 38 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

PEREIRA, G. A.; RIBEIRO, B. V.; MARCÍLIO, H. C.; SANTAELLA, M. B. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira 'IAC 2001' em

diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 3, n. 2, p. 43-46, 2009.

PEREIRA, G. A.; CORREA, L. S.; BOLIANI, A. C. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira Grande naine em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, volume especial, p. 222-226, 2011.

PICOLOTTO, L.; SCHUCH, M. W.; SOUZA, J. A.; SILVA, L. C.; FERRI, J.; FACHINELLO, J. C. Efeito do hipoclorito de sódio, fotoperíodo e temperatura no estabelecimento *in vitro* de jaboticabeira. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 8, n.1, p. 18-23, 2007.

REED, B. M.; MENTZER, J.; TANPRASERT, P.; YU, X. Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut: Identification and antibiotic treatment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 52, p. 67-70, 1998.

SILVA, J. T. S.; NHUT, D. T.; TANAKA, M.; FUKAI, S. The effect of antibiotics on the *in vitro* growth response of chrysanthemum and tobacco stem transverse thin cell layers (tTCLs). **Scientia Horticulture**, Netherlands, v. 97, p. 397-410, 2003.

SOUZA, S.A.; LEDO, C. A. S.; SILVEIRA, D. G.; SOUZA, F. V. D.; FARIA, G. A.; NETO, H. P. S.; SANTOS SEREJO, J. S.; SILVA, K. M.; COSTA, M.A.P.C.; SOARES, T. L.; JUNGHANS, T. G.; ALMEIDA, W. B. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2006, 151 p.

SOUZA, D. S.; SIQUEIRA, D. L.; CECON, P. R.; SANTOS, D. Micropropagação das bananeiras 'Prata-Anã' e 'FHIA 01' a partir de explantes de plantas tratadas com paclobutrazol. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal. v. 32, n. 2, p. 561-570, 2010.

TAHPRESERT, P.; REED, B.; Detection and identification of bacterial contaminants of strawberry runner explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 52, p. 53-55, 1998.

TEIXEIRA, S. L.; RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, M. T. Utilização de hipoclorito de Sódio na esterilização de meio de cultura para multiplicação *in vitro* de Eucalyptus Pellita L. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 2, p. 185-191, 2008.

VALE, L. S. R. **Fruticultura**. Ceres: Ministério da Educação Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica Instituto Federal Goiano, 2010. 184 p.

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. **Bragantina**, Campinas, v. 56, n. 2, p. 249-254, 2003.

4 - USO DOS ANTIBIÓTICOS AMPICILINA SÓDICA E CLORANFENICOL NO MEIO DE CULTURA PARA O CONTROLE DE CONTAMINANTES NA MICROPROPAGAÇÃO DE BANANEIRA 'THAP MAEO'

Resumo

A micropropagação vem sendo desenvolvida e aperfeiçoada, para elevar a taxa de multiplicação em curto espaço de tempo e melhorar a qualidade da produção de mudas. Contudo, a contaminação microbiana é um dos maiores problemas desta técnica. Este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência da descontaminação de explantes de bananeira durante o estabelecimento *in vitro*, com o uso dos antibióticos ampicilina sódica e cloranfenicol adicionados ao meio de cultura. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado constituído de cinco tratamentos e cinco repetições, sendo cada repetição representada por cinco explantes em concentrações de ampicilina sódica e cloranfenicol por vinte minutos: Os antibióticos foram adicionados separadamente ao meio de cultura em concentrações de 0, 5, 10, 15 e 20 mg L⁻¹. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste F e análise de regressão. Foram avaliadas as porcentagens de contaminação por bactéria, fungo e oxidação dos explantes. Os resultados permitiram concluir que os antibióticos apresentaram controle sobre contaminantes endógenos nos explantes de banana 'Thap Maeo'. Quando a concentração foi de 20 mg L⁻¹ dos antibióticos proporcionou redução de 70% de desinfestação respectivamente para bactérias e fungos. Esta concentração, mesmo resultando em 64% de oxidação dos explantes não foi fitotóxica, permitindo o desenvolvimento normal dos mesmos.

Palavras-chave: *Musa* sp. Micropropagação. Descontaminantes.

USE OF THE ANTIBIOTICS SODIUM AMPICILLIN AND CHLORANPHENICOL IN GROWTH MEDIUM FOR CONTROLLING CONTAMINANTS IN THE BANANA MICROPROPAGATION 'THAP MAEO'

Abstract

Micropropagation has been developed and enhanced to increase the multiplication rate in a short time and improve the quality of seedlings. However, microbial contamination is a major problem of this technique. This study aimed to evaluate the efficiency of decontamination of banana explants during in vitro establishment, with the use of antibiotic ampicillin sodium and chloramphenicol added to the culture medium. The experimental design was completely randomized, consisting of five treatments and five replicates, each replicate represented by five explants in different concentrations of active chlorine for twenty minutes: Antibiotics were added separately to the culture medium at concentrations of 0, 5, 10, 15 and 20 mg L⁻¹. The data were submitted to ANOVA and means were compared by F test and regression analysis. We evaluated the percentage of contamination by bacteria, fungi and oxidation of the explants. The results showed that antibiotics had control over endogenous contaminants in banana explants 'Thap Maeo'. When the concentration was 20 mg of antibiotic L⁻¹ caused a reduction of 70% for respectively bacteria and fungi. This concentration, even resulting in 64% oxidation of the explants was not phytotoxic, allowing the normal development of the same. It is concluded that this concentration can be used to control contamination for micropropagation of banana 'Thap Maeo'.

keywords: *Musa* sp. Micropropagation. Descontaminants.

4.1 – INTRODUÇÃO

O estado de São Paulo é o segundo maior produtor banana do país com 1.231.823 toneladas utilizando uma área de 56.266 hectares seguido da Bahia com produção de 1.079.050 toneladas (IBGE, 2010).

A propagação da bananeira (*Musa* sp.) pode ser feita de várias formas: por sementes, ou vegetativamente por meio de mudas tipo chifrão, chifre e chifrinho ou *in vitro* (PEREIRA et al., 2009). Pelo método tradicional (rizomas), mesmo o material sendo de ótima qualidade, o processo é lento e permite a disseminação de doenças e pragas dentre as quais se destacam a Sigatoka negra e amarela, mal do Panamá (*Fusarium oxysporum* sp) e a broca do rizoma (*Cosmopolites sordidum*) (SOUZA et al., 2006).

Um dos princípios básicos para o sucesso da micropropagação depende, em parte, de medidas de controle e prevenção da contaminação microbiana (LEIFERT et al., 1994; SILVA et al., 2003) devido a esta técnica proporcionar um ambiente favorável para o crescimento de microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos (DANTAS et al., 2002).

Os microrganismos contaminantes competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura soltando, no meio, metabólitos tóxicos que podem ocasionar a morte da plântula (PEREIRA et al., 2003).

A contaminação bacteriana é bastante nociva para os cultivos realizados *in vitro*, principalmente quando a infecção ocorre por bactérias latentes ou endógenas, introduzidas sistemicamente com os explantes, impondo consideráveis limitações na fase de iniciação *in vitro* (FERREIRA et al., 2009). Os desinfestantes superficiais como álcool ou hipoclorito de sódio, muitas vezes, podem controlar apenas os fungos, mas não garantem níveis aceitáveis de controle para bactérias, o que pode ser constatado por Vianna et al. (2003), os quais utilizaram como descontaminante para os explantes de mamoeiro apenas hipoclorito de sódio em diferentes concentrações, sendo impossível conseguir explantes sem sinais visíveis de contaminação, principalmente por bactérias. Para o controle das bactérias, diversos autores citam a inclusão de antibióticos como ampicilina sódica, agrimicina, cloranfenicol, ácido nalidixico ao meio de cultura, entre eles: (WILSON; POWER,

1989; GARCIA; RAFAEL, 1990; BARROS; PASQUAL, 1991; LEIFERT et al.; 1991; PEREIRA et al., 2010; PALU et al., 2011).

Podem-se adicioná-los também ao meio de cultura por um período limitado, o necessário para a eliminação dos contaminantes Kneifel e Leonhardt (1992) e Leifert et al. (1992) ou utilizá-los na forma de imersão antes do isolamento (TANAKA et al., 1983; SCORTICHINI; CHIARIOTTI, 1988).

Muitos antibióticos apresentam efeito fitotóxico para as plantas, alterando-lhes o crescimento *in vitro* (DODDS; ROBERTS, 1985). Alguns antibióticos podem causar fitotoxicidade, esta depende da concentração à qual o tecido foi exposto e da tolerância da espécie tratada (OKKELS; PEDERSEN, 1988). Esses autores verificaram que a concentração de cloranfenicol inibiu em 50% a regeneração, em beterraba e cenoura *in vitro*. Quando se utilizou estreptomicina, a cenoura apresentou maior tolerância do que a beterraba.

Os antibióticos são usados para o controle de contaminações bacterianas endógenas, que representam sério problema no estabelecimento das culturas. Os explantes, depois de reduzidos os contaminantes superficiais, podem ser transferidos para meio nutritivo contendo antibiótico (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Esses autores citam que o antibiótico deve ser esterilizado a frio e adicionado ao meio antes da sua solidificação, e também apresentar um amplo espectro de ação. Os antibióticos mais usados em cultura de tecidos vegetais possuem ação bacteriostática e não bactericida. Em laboratórios comerciais de micropropagação de plantas, Leifert et al. (1991) identificaram 293 espécies de bactérias, das quais 13% pertenciam ao gênero *Bacillus*. As espécies deste gênero formam endósporos resistentes ao álcool e ao calor, podendo, inclusive, ser disseminadas pelo álcool utilizado na esterilização dos instrumentos e resistir à flambagem e à autoclavagem do meio de cultura, por 20 minutos a 110°C (BOXUS; TERZI, 1987; NANNETTI, 1994).

Na multiplicação *in vitro* de bananeira comumente são observados níveis elevados de contaminação por bactérias (OLIVEIRA et al. 2001; SÁ; BRAGA 2001). Embora, níveis de contaminação abaixo de 2%, nos subcultivos, são usualmente considerados como o mínimo requerido para garantir sucesso na produção (LEIFERT; WOODWARD 1998).

Na cultivar de bananeira 'Caipira', por exemplo, Braga et al. (2001) quantificaram perdas de 75% dos explantes na fase de estabelecimento. Perdas essas, causadas por *Pseudomonas maltophila*, *Bacillus* sp., *Klebseilla pneumonia* e *Hafnia alve*, que podem inviabilizar a multiplicação em nível comercial porque onera o processo de multiplicação *in vitro*.

Do ponto de vista prático, a melhor medida a ser tomada consiste no descarte do material contaminado. Entretanto, no caso da necessidade de manutenção do material vegetal contaminado, torna-se imprescindível efetuar o controle curativo dessas bactérias com o uso de antibióticos específicos. Isso, porém, nem sempre resulta em controle completo da contaminação. Assim, torna-se necessário testar antibióticos alternativos, isolados ou em combinação, tanto para utilização em meio de cultura ou banho dos explantes, como na forma de pulverização das plantas matrizes no campo (PEREIRA et al., 2003).

Este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência da descontaminação de explantes de bananeira durante o estabelecimento *in vitro*, com o uso de diferentes concentrações dos antibióticos ampicilina sódica e cloranfenicol adicionados ao meio de cultura.

4.2 - MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Micropropagação do Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio-Economia da Faculdade de Engenharia da Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Campus de Ilha Solteira - SP, no período de 10 de maio a 10 de junho de 2011. Foram utilizadas mudas de bananeira do tipo chifrinho da variedade 'Thap Maeo', procedentes da Fazenda de Ensino, Pesquisa e Extensão da Faculdade de Engenharia da UNESP, localizada em Selvíria – MS.

O experimento foi constituído da adição de concentrações do antibiótico ampicilina sódica e cloranfenicol ao meio de cultura. Os tratamentos foram os seguintes: T1 - Controle (0 mg L⁻¹ de ampicilina sódica), T2 – 5 mg L⁻¹ de ampicilina sódica, T3 – 10 mg L⁻¹ de ampicilina sódica, T4 – 15 mg L⁻¹ de ampicilina sódica, T5 – 20 mg L⁻¹ de ampicilina sódica, T6 – Testemunha (0 mg L⁻¹ de cloranfenicol), T7 –

5 mg L⁻¹ de cloranfenicol, T8 – 10 mg L⁻¹ de cloranfenicol), T9 – 15 mg L⁻¹ de cloranfenicol e T10 – 20 mg L⁻¹ de cloranfenicol.

O meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige; Skoog, 1962), suplementado com sacarose a 30 g L⁻¹ e Phytigel a 2,3 g L⁻¹, com pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (esterilização) a 120 °C com 1 kgf cm⁻² durante vinte minutos, sendo vertido em potes de vidro com capacidade de 200 ml, cada recipientente contendo 20 ml de meio. As concentrações dos antibióticos correspondentes aos tratamentos foram adicionadas ao meio de cultura após sua esterilização, dentro da câmara de fluxo laminar, com o mesmo estando morno e em estado líquido para não prejudicar a ação dos antibióticos.

Após a obtenção dos rizomas, os mesmos foram lavados em água corrente (torneira) para retirar o excesso de solo e raiz. Em seguida, as bainhas foram seccionadas com uma faca esterilizada, permitindo assim a redução de seu tamanho para 5 mm. Não foi utilizado hipoclorito de sódio na desinfestação para que o mesmo não pudesse interferir nos resultados. A extração dos meristemas foi realizada em condições assépticas em câmaras de fluxo laminar, onde foram inoculados ao meio de cultura com os respectivos tratamentos. A fase de estabelecimento foi realizada em sala de crescimento com temperatura 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas de luz a uma intensidade luminosa de 30 μmol m⁻² s⁻¹. Os explantes foram avaliados após trinta dias contados da data de inoculação, período que compreende a fase de estabelecimento da cultura. Foram avaliadas as porcentagens de contaminação por bactéria e fungo como também a porcentagem de oxidação dos explantes. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos, cinco repetições, sendo cada repetição representada por cinco tubos contendo um explante cada. Os dados foram submetidos a análise de variância utilizando-se o programa SISVAR (FERREIRA, 2008), e análise de regressão para as concentrações de ampicilina e cloranfenicol.

4.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise de variância, pode-se observar que houve diferença significativa entre as concentrações do antibióticos ampicilina (Tabela 02) e cloranfenicol (Tabela 03) para as variáveis porcentagens de contaminação

bacteriana, fungica e explantes oxidados. ($P < 0,05$). A análise de regressão indicou equações de segundo grau, como melhor ajuste para todas as variáveis.

TABELA 2- Quadrados médios da análise de variância e níveis de significância referentes à porcentagem de explantes de bananeira 'Thap maeo' contaminados por bactérias, fungos e oxidados para o uso de ampicilina sódica ao meio de cultura. Ilha Solteira-SP, 2011.

	QUADRADOS MÉDIOS / CARACTERÍSTICAS		
	Contaminação por Bactérias (%)	Contaminação por fungos (%)	Oxidação (%)
Concentrações	4544.00*	6456.00*	1064.00*
C.V. (%)	16,60	25,59	20,90

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

C.V. (%)= Coeficiente de Variação

TABELA 3- Quadrados médios da análise de variância e níveis de significância referentes à porcentagem de explantes de bananeira 'Thap maeo' contaminados por bactérias, fungos e oxidados para o uso de cloranfenicol adicionados ao meio de cultura. Ilha Solteira-SP, 2011.

	QUADRADOS MÉDIOS / CARACTERÍSTICAS		
	Contaminação por bactérias (%)	Contaminação por fungos (%)	Oxidação (%)
Concentrações	5464.00*	5624.00*	920.00*
C.V. (%)	15,91	26,91	22,73

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

C.V. (%)= Coeficiente de Variação

Os resultados obtidos utilizando o antibiótico ampicilina sódica evidenciaram que houve redução em média de 75% contaminação bacteriana. Quando se utilizou o cloranfenicol verificou-se redução de 88% (Figuras 6 e 7), essa redução foi possível devido a eficiência dos antibióticos utilizados.

FIGURA 6 – Porcentagem de contaminação bacteriana em explantes de bananeira 'Thap maeo' submetidas a concentrações de ampicilina sódica. Ilha Solteira – SP, 2011.

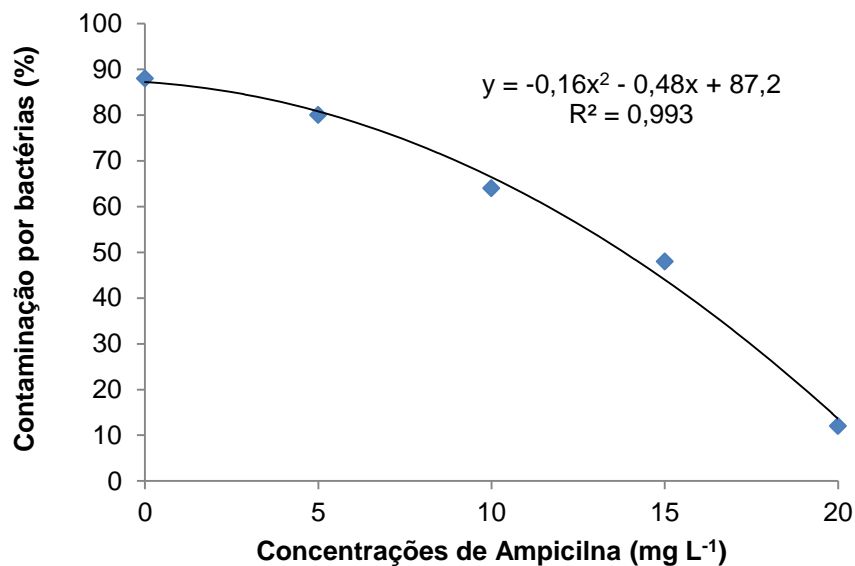
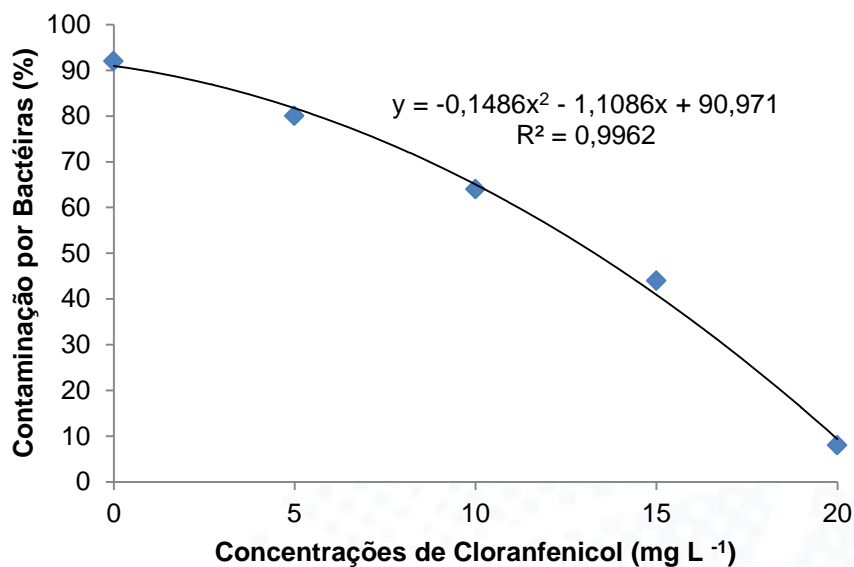


FIGURA 7 – Porcentagem de contaminação bacteriana em explantes de bananeira 'Thap maeo' submetidas a concentrações de cloranfenicol. Ilha Solteira – SP, 2011.



Resultados semelhantes foram obtidos por Carneiro et al. (2000) que utilizando outros produtos como o hipoclorito de sódio, benomyl, rifampicina, cefotaxima para a descontaminação de explantes da bananeira Maçã, obtiveram êxito adicionando 300 mg L⁻¹ de cefotaxima ao meio de cultura verificando controle

de 73,33% para bactérias, confirmando que o uso de antibióticos em alguns casos é necessário concordando com este trabalho.

Os dados obtidos neste trabalho estão de acordo com Lima e Moraes (2006) que utilizaram explantes em meio nutritivo contendo 100 mg L^{-1} rifampicina e constataram sensível redução na multiplicação de bananeira Caipira, não sendo observadas anormalidades nos explantes ou nas plântulas.

De acordo com Pereira et al. (2010) que avaliaram diferentes concentrações do bactericida agrimicina na desinfestação de explantes para micropropagação de bananeira IAC 2001, a maior eficiência dentre os tratamentos testados foi o de imersão dos explantes em 4 g L^{-1} do bactericida agrimicina por vinte minutos e as doses testadas não foram fitotóxicas aos explantes.

Em bananeira 'Mysore', Pereira et al. (2010) obtiveram taxa de contaminação de 20% na concentração de 20 mg L^{-1} dos antibióticos ampicilina sódica e cloranfenicol, concordando com os resultados obtidos neste trabalho.

Os tratamentos com 5, 10, 15 e 20 mg L^{-1} de cloranfenicol apresentaram porcentagens respectivas de 80, 64, 44 e 8% de explantes contaminados por bactéria, concordando com os dados de Héctor et al. (2005) que utilizando $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de cloranfenicol observaram que o uso de cloranfenicol no meio de cultura foi necessário para o controle de bactérias e fungos em menta japonesa, os mesmos obtiveram 60% de explantes saudios e com baixa fitotoxicidade (15,4%).

As informações obtidas no presente trabalho estão de acordo com Biasi (1995) que em cultivo *in vitro* de gemas de abacateiro usando o antibiótico cloranfenicol na concentração de 50 mg L^{-1} obteve redução de contaminação, porém não verificou diferença significativa, e conseguindo 77,4% de gemas brotadas.

Em relação a contaminação fúngica os resultados obtidos evidenciaram que na concentração de 20 mg L^{-1} ocorreu o melhor controle, apresentando redução de 96% e 78% quando se utilizou respectivamente os antibióticos ampicilina sódica e cloranfenicol. (Figuras 8 e 9)

Resultados semelhantes foram obtidos por Pereira et al. (2010) na bananeira 'Mysore' que utilizaram os mesmos antibióticos verificaram taxas de contaminação fúngica de 0% nas concentrações de 15 e 20 mg L^{-1}

Há poucos relatos de trabalhos que confirmem o uso de antibióticos para a redução da contaminação fúngica, estudos mais aprofundados devem ser realizados com a cultura da bananeira.

A redução da contaminação pode ter ocorrido durante o processo de micropropagação devido a lavagem previa das mudas em água corrente, redução do tamanho dos explantes e o estabelecimento dos explantes em meio de cultura com os antibióticos realizada em ambiente asséptico.

FIGURA 8 – Porcentagem de contaminação por fungos em explantes de bananeira 'Thap maeo' submetidas a concentrações de ampicilina sódica. Ilha Solteira – SP, 2011.

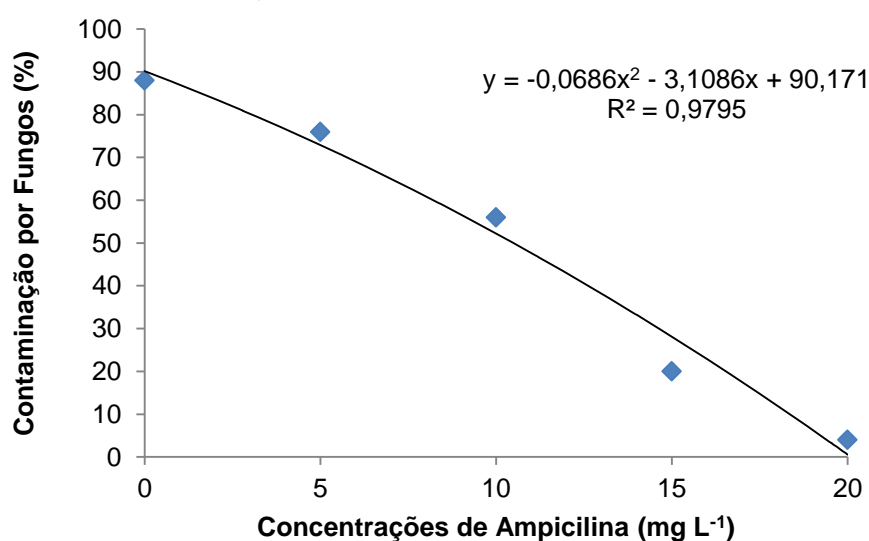
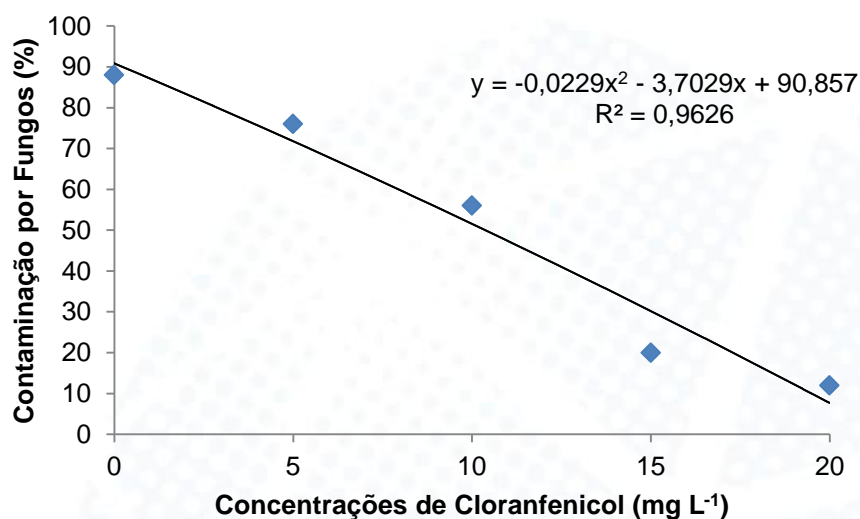


FIGURA 9 – Porcentagem de contaminação por fungos em explantes de bananeira 'Thap maeo' submetidas a concentrações de cloranfenicol. Ilha Solteira – SP, 2011.



Em relação a porcentagem de oxidação, nas concentrações de 15 e 20 mg L⁻¹ ampicilina sódica e cloranfenicol, observou-se aumento de explantes oxidados mostrando-se taxa de 52 e 64% respectivamente, porém sem ocasionar a morte dos mesmos (Figuras 10 e 11). Esse aumento pode estar ligado ao princípio ativo dos antibióticos, mas que requer mais estudos.

Pereira et al. (2010), verificaram resultados semelhantes para bananeira 'Mysore', quando foi utilizado os antibióticos ampicilina sódica e coranfenicol na concentração de 20 mg L⁻¹ obtiveram taxas de oxidação de 100%, e não causou danos aos explantes permitindo o estabelecimento normal dos mesmos.

Por outro lado as informações obtidas no trabalho diferem de Palu et al. (2011) que em micropropagação de figueira utilizaram 30 mg L⁻¹ de cloranfenicol e 250 mg L⁻¹ obtiveram 30,82% e 0% de explantes oxidados respectivamente.

Biasi et al. (1995) utilizando ácido nalidíxico, cloranfenicol e estreptomicina, em abacateiro observaram que todas as concentrações utilizadas (0, 12,5, 25, 50, 100 e 200 mg L⁻¹) desses antibióticos restringiu-se o comprimento das brotações, adicionando os antibióticos ao meio de cultura, concluindo-se que os três foram tóxicos para o abacateiro, sendo recomendados apenas em casos de extrema necessidade, dependendo da suscetibilidade do microorganismo contaminante e da concentração necessária para seu controle.

FIGURA 10 – Porcentagem de oxidação em explantes de bananeira 'Thap maeo' submetidas a concentrações de ampicilina sódica. Ilha Solteira – SP, 2011.

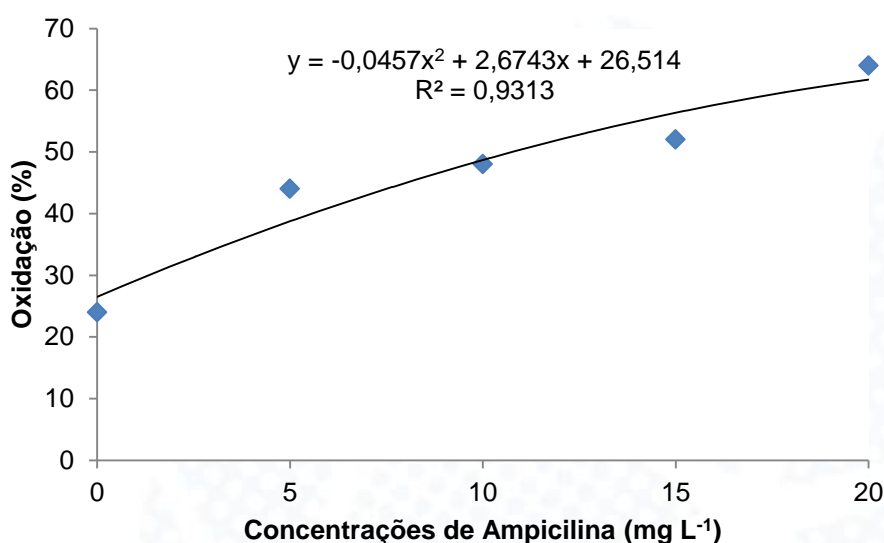
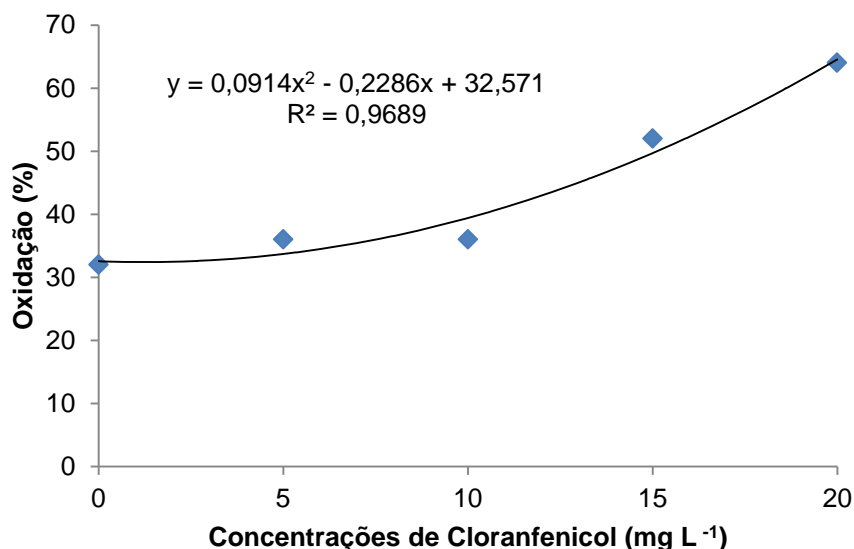


FIGURA 11 – Porcentagem de oxidação em explantes de bananeira 'Thap maeo' submetidas a concentrações de cloranfenicol. Ilha Solteira – SP, 2011.



Os antibióticos são mais caros em relação ao uso de cloro ativo, tornando este processo mais oneroso.

4.4 – CONCLUSÕES

- Os antibióticos ampicilina sódica e cloranfenicol apresentaram controle sobre contaminantes endógenos nos explantes de banana 'Thap Maeo';

- A concentração de 20 mg L⁻¹ dos antibióticos reduziu em 70% a contaminação por bactérias e fungos. Esta concentração, mesmo resultando em 64% de oxidação dos explantes não foi fitotóxica, permitindo o desenvolvimento normal dos mesmos.

4.5 – REFERÊNCIAS

BARROS, I.; PASQUAL, M. Contaminação fúngica, bacteriana e oxidação "in vitro" de explantes de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí LCH-2077-2-5-44. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 15, n. 2, p.145-153, 1991.

BIASI, L. A. Fitotoxicidade de três antibióticos na cultura in vitro de abacateiro. **Bragantia**, Campinas, v. 54, n. 2, p. 251-256, 1995.

BOXUS, P. H. ; J. M. TERZI. Big losses due to bacterial contamination can be avoided in mass propagation scheme. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 212, p. 91-103,1987.

BRAGA, M. F.; SÁ, M. E. L.; MUSTAFÁ, P. C. Avaliação de um protocolo para multiplicação *in vitro* da bananeira (*Musa sp.*) cv. Caipira (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 215-219, 2001.

CARNEIRO, M. F.; SILVA, G. D.; XIMENES, P. A.; CARNEIRO, I. F.; BORGES, J. D. Avaliação de produtos na descontaminação de explantes de banana (*Musa AAB* cv. Maçã). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiania, v. 30, n.1, p. 29-35, 2000.

DANTAS, S.; OLIVEIRA, S.; CÂMARA, T. Contaminação microbiana no cultivo *in vitro* de plantas. In: LUZ, W. C. da (Org.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. 10. ed. Passo Fundo: RAPP, 2002. v.10, p. 391-407.

DODDS, J. H.; ROBERTS, L. W. **Experiments in plant tissue culture**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1985, 232 p.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, p. 36-41, 2008.

FERREIRA, M. G. R.; SANTOS, M. R. A.; BRAGADO, A. C. R. Propagação *in vitro* de cupuaçuzeiro: desinfestação de explantes florais. **Saber Científico**, Porto Velho, v. 2, n. 2, p.37-44, 2009.

GARCIA, E.G.; RAFAEL, M. Control de la oxidación y contaminación em microesquejes de café (*Coffea arábica* 'Catimor') cultivados *in vitro*. **Agronomia Tropical**, Maracay, v. 40, n. 4-6, p. 281-290, 1990.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/SPI, 1998. p. 183-260.

HÉCTOR, E.; BARRÓN, M. L.; GODOY, L; DÍAZ, B.; TORRES, M. M. H. A. Un método para la desinfección y el establecimiento *in vitro* de la menta japonesa (*Mentha arvensis* L.). **Cultivos Tropicales**, La Habana, v. 26, n. 1, p. 69-71, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. Produção agrícola municipal. In: ----. **Cultura temporárias e permanentes**. Rio de Janeiro: IBGE, 2010. v. 37, p. 1- 89.

KNEIFEL, W.; LEONHARDT, W. Testing of different antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from plant tissue culture. **Plant cell, tissue and organ culture**, Dordrecht, v. 29, p. 139-144, 1992.

LEIFERT, C.; MORRIS, C. E.; WAITES, W. M. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants; reasons for contamination problems in vitro. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 13, n. 2, p.139-183, 1994.

LEIFERT, C.; CAMOTTA, H.; WRIGHT, S.M.; WAITES, B.; CHEYNE, V. A. ; WAITES, W. M. Elimination of *Lactobacillus plantarum*, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus saprophyticus* and *Pseudomonas paucimobilis* from micropropagated *Hemerocallis*, *Chisya* and *Delphinium* cultures using antibiotics. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 71, n. 4, p. 307-330, 1991.

LEIFERT, C.; CAMOTTA, H.; WAITES, W. M. Effect of combinations of antibiotics on micropropagated clematis, delphinium, hosta, iris and photinia plant cell, **Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 29, p. 153-160, 1992.

LEIFERT, C.; WOODWARD, S. Laboratory contamination management: the requirement for microbiological quality assurance. **Plant Cell Tissue and Organ Cult**, Netherlands, v. 52, p. 83-88, 1998.

LIMA, J. D.; MORAES, W. S. Controle de bactérias contaminantes em explantes de bananeira (*Musa* AAA cv. Caipira). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 36, n. 3, p.181-186, 2006.

NANNETTI, D. C. **Utilização da cultura de tecidos vegetais na micropropagação e manutenção de *Heliconia* sp.** 1994. 106 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Escola Superior de Agricultura de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1994.

OKKELS, F. T.; PEDERSEN, M. G. The toxicity to plant tissue and to *Agrobacterium tumefaciens* of some antibiotics. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 225, p.199-207, 1988.

OLIVEIRA, R. P.; SILVEIRA, D. G.; SILVA, S. O. Concentração de BAP e a eficiência de micropropagação de bananeira tetraplóide (grupo AAAB). **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, n. 1, p. 73-78, 2001.

PALU, E. G.; CORREA, L. S.; SUZUKI, A. N.; BOLIANI, A. C. Uso de antibióticos para o controle de bactérias endógenas visando à micropropagação da figueira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 587-592. 2011.

PEREIRA, G. A.; BOBROFF, R. L.; LENZA, J. B.; CORREA, L. S. Diferentes concentrações de agrimicina no controle de contaminações de explantes de bananeira na micropropagação. **Cultura Agronomica**, Ilha Solteira, v. 19, p. 71-76, 2010.

PEREIRA, G. A.; RIBEIRO, B. V.; MARCÍLIO, H. C.; SANTAELLA, M. B. Desinfestação e estabelecimento in vitro de explantes de bananeira 'IAC 2001' em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Tecnologia e Ciência. Agropecuária**, João Pessoa, v. 3, n. 2, p. 43-46, 2009.

PEREIRA, J. E. S.; MATTOS, M. L. T.; FORTES, G. R. L. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 827-834, 2003.

SÁ, M. E. L.; BRAGA, M. F. Avaliação de protocolo para obtenção de mudas micropropagadas de bananeira cv. prata-anã (subgrupo AAB). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 236-239, 2002.

SCORTICHINI, M.; CHIARIOTTI, A. *In vitro* culture of *Prunus persica* var. *Laevis* Gray (nectarine): detection of bacterial contaminants and possibility of decontamination by means of antibiotics. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 225, p.109-118, 1988.

SILVA, J. T. S.; NHUT, D. T.; TANAKA, M.; FUKAI, S. The effect of antibiotics on the in vitro growth response of chrysanthemum and tobacco stem transverse thin cell layers (tTCLs). **Scientia Horticulture**, Netherlands, v. 97, p. 397-410, 2003.

SOUZA, S.A.; LEDO, C. A. S.; SILVEIRA, D. G.; SOUZA, F. V. D.; FARIA, G. A.; NETO, H. P. S.; SANTOS SEREJO, J. S.; SILVA, K. M.; COSTA, M.A.P.C.; SOARES, T. L.; JUNGHANS, T. G.; ALMEIDA, W. B. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura,

2006, 151 p.

TANAKA, M.; KUMURA, M.; GOI, M. Surface-sterilization for in vitro culture of phalaenopsis flowerstalk cutting using antimicrobials. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 131, p. 321-328, 1983.

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. **Bragantina**, Campinas, v. 56, n. 2, p. 249-254, 2003.

WILSON, Z. A.; POWER, J. B. Elimination of systemic contamination in explant and protoplast cultures of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 7, p. 622-625, 1989.

5 - CONCENTRAÇÕES DE 6-BENZILAMINOPURINA (BAP) E CINETINA (CIN) PARA AVALIAÇÃO DE PROTOCOLO E MULTIPLICAÇÃO NA MICROPROPAGAÇÃO DE BANANEIRA 'THAP MAEO'

Resumo

No Brasil, apesar da técnica de multiplicação *in vitro* de bananeira ser bastante difundida, percebe-se que há deficiência de trabalhos que buscam o aumento da taxa de multiplicação de algumas cultivares importantes, levando em consideração, além das variações somaclonais, os custos de produção. A falta de domínio dessa tecnologia para as novas cultivares e algumas cultivares regionais de bananeira, está sendo responsável pela colocação de mudas de qualidade duvidosa no mercado, trazendo prejuízos aos agricultores. O objetivo deste trabalho foi avaliar concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) e Cinetina (CIN) adicionados ao meio de cultura para multiplicação de explantes de bananeira 'Thap maeo'. Os tratamentos consistiram de adição ao meio de cultura de 6-Benzilaminopurina (BAP) e Cinetina (CIN) em diferentes concentrações: Controle - 0 mg L⁻¹; 1,0 mg L⁻¹; 2,0 mg L⁻¹; 3,0 mg L⁻¹ e 4,0 mg L⁻¹). Quatro semanas após a inoculação, os ápices caulinares de cada genótipo foram divididos em duas partes e distribuídos em frascos contendo meio de cultura MS, pH 5,8 (ajustado antes da autoclavagem), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 2,3 g L⁻¹ de phytigel. No processo de multiplicação efetuaram-se quatro subcultivos, sendo 1º aos 25 dias; 2º aos 50; 3º aos 75 e o 4º aos 100 dias após a inoculação, realizando-se o cultivo das gemas laterais provenientes da subdivisão longitudinal dos explantes e, ou, do isolamento das brotações, com o corte das folhas sempre que possível. No final de cada subcultivo, os brotos foram isolados e reinoculados em meio de cultura. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos, cinco repetições, sendo cada repetição representada por cinco potes contendo um explante cada. O maior número de brotos obtido foi na concentração de 4mg L⁻¹ de Cinetina e BAP, conseguindo em média 3,8 brotos por explantes no 4º subcultivo.

Palavras-Chave: *Musa* sp. Micropropagação. Reguladores vegetais.

BAP AND KINETIN CONCENTRATIONS FOR PROTOCOL AND EVALUATION OF BANANA MULTIPLICATION 'THAP MAEO'

Abstract

In Brazil, although the technique of in vitro multiplication of banana to be widespread, it is clear that there is a lack of studies that seek to increase the multiplication rate of some important cultivars, taking into account both of somaclonal variations, production costs . The lack of mastery of this technology for new cultivars and some regional varieties of banana, is responsible for placing seedlings of dubious quality on the market, causing losses to farmers. This work aimed to evaluate a protocol for in vitro multiplication of banana for genotype 'Thap Maeo (Musa spp.). Treatments consisted of adding to the culture medium of 6-benzylaminopurine (BAP) and kinetin (KIN) at different concentrations Control - 0 mg L⁻¹, 1,0 mg L⁻¹, 2,0 mg L⁻¹, 3,0 mg L⁻¹ and 4,0 mg L⁻¹). Four weeks after inoculation, the apexes of each genotype were divided into two parts and distributed into vials containing MS medium, pH 5.8 (adjusted before sterilization), supplemented with 30 g L⁻¹ sucrose 2,3 g L⁻¹ Phytigel. In the process of multiplication effected to four subcultures, and 1 to 25 days, 2 to 50, 3 to 75 and 4 to 100 days after inoculation, and where the cultivation of lateral buds from the subdivision longitudinal explants, or, isolation of the sprouts, with the cut sheets when possible. After each subculturing, the shoots were isolated and reinoculated into the culture medium. The experimental design was completely randomized with five treatments, five replicates, each replicate represented by five pots containing plants each. The data were subjected to regression analysis by SISVAR. The highest number of shoots was obtained on concentration was 4 mg L⁻¹ BAP and Kinetin, achieving an average of 3,8 shoots per explant in the 4th subculture.

Keywords: *Musa* sp. Micropropagation. Plant regulators.

5.1 - INTRODUÇÃO

Vários programas de melhoramento genético têm sido estabelecidos nos últimos anos devido à alta incidência de patógenos que vêm atacando severamente a bananeira (SAGI et al., 1998). Assim, é crescente a demanda por mudas sadias, para o estabelecimento de novos plantios e a recuperação de bananais, o que normalmente vem sendo realizado por meio da multiplicação *in vitro* (DECLERCK et al., 2002).

A técnica de cultivo de ápices caulinares tem como base a propagação pela organogênese direta de gemas axilares (VASIL, 1994). Uma das principais vantagens é a obtenção de plantas livres de patógenos e pragas, o que reduz a dispersão de organismos fitoparasitas (DAMASCO et al., 1996). Além disso, pode fornecer rapidamente um grande número de mudas de materiais genéticos novos, em um reduzido espaço físico (VUYLSTEKE; ORTIZ 1996).

Entre as cultivares novas estão os genótipos 'Caipira' e 'Thap maeo', resistentes a Sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis*), Sigatoka-amarela (*Mycosphaerella musicola*), mal-do-Panamá (*Fusarium oxysporum f. sp. Cubense*), , o genótipo FHIA-01, resistente a Sigatoka-negra e tolerante ao mal-do-Panamá, e o genótipo PV03-44, resistente a Sigatoka-amarela e tolerante ao mal-do-Panamá. Todos são promissores para recomendação aos produtores de distintas regiões do país e carecem, assim, de protocolos ótimos para a produção comercial de suas mudas.

No Brasil, apesar da técnica de multiplicação *in vitro* de bananeira ser bastante difundida, a deficiência de trabalhos que visam o aumento da taxa de multiplicação de algumas cultivares importantes, levando em consideração, além das variações somaclonais, os custos de produção (LEMOS et al., 2001). Além disso, ainda hoje, há falta de domínio dessa tecnologia para novas cultivares e algumas cultivares regionais de bananeira, sendo responsável pela colocação de mudas de qualidade duvidosa no mercado, trazendo prejuízos aos agricultores.

Na micropropagação da bananeira, o regulador de crescimento mais utilizado é uma citocinina, o 6-Benzilaminopurina (BAP), aplicado na fase de multiplicação dos explantes. A concentração utilizada depende do genótipo e do tipo de explante. Alguns autores utilizam baixas concentrações para o cultivo de meristemas ou

ápices caulinares na fase de estabelecimento, como 2,5 mg L⁻¹ (BERNARDI et al., 2004), 1,0 mg L⁻¹ (UTINO et al., 2001), 3,5 mg L⁻¹ (DINIZ et al., 1999) e 5,0 mg L⁻¹ (BRAGA et al., 2001). As concentrações de citocininas utilizadas na micropropagação de bananeiras na fase de multiplicação estão entre 1,0 mg L⁻¹ e 10,0 mg L⁻¹ (BRAGA et al., 2001; QUISEN et al., 2004; BERNARDI et al., 2004).

Embora já existam protocolos variados, faz-se necessário avaliar a qualidade do sistema comercial de multiplicação *in vitro*, uma vez que esta é influenciada por diversos fatores como taxa de multiplicação, altura das plantas, presença e intensidade de estiolamento, forma, coloração e tamanho das folhas, formação de calos, desenvolvimento de raízes, perdas por contaminação microbiana, oxidação e eficiência da aclimatação (OLIVEIRA et al., 2001). O aprimoramento constante dos processos de multiplicação *in vitro* e o controle da qualidade das mudas, aliados à redução de custos, são essenciais para aceitação no mercado (ASSIS et al., 2000).

O objetivo deste trabalho foi avaliar concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) e Cinetina (CIN) adicionados ao meio de cultura para multiplicação de explantes de bananeira 'Thap maeo'.

5.2 - MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Micropropagação do Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio-Economia da Faculdade de Engenharia da Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Campus de Ilha Solteira – SP. Os explantes utilizados foram obtidos de plantas matrizes originadas de clones de *Musa* sp. 'Thap maeo' cultivada na Fazenda de Ensino Pesquisa e Extensão da UNESP, Campus de Ilha Solteira, localizada no município de Selvíria-MS, no período de 10 de abril a 10 de agosto de 2011. Após a obtenção dos rizomas, os mesmos foram lavados para retirar o excesso de solo e raiz. Em seguida, as bainhas foram seccionadas com uma faca estéril, permitindo assim a redução de seu tamanho a 5 mm.

Os explantes foram isolados e desinfetados por imersão em cloro ativo a 2% durante vinte minutos em constante agitação. Na sequência, os ápices caulinares

passaram por três lavagens consecutivas em água esterilizada. Em câmara de fluxo laminar, os mesmos foram reduzidos e inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), pH 5,8 (ajustado antes da autoclavagem) e suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 2,3 g L⁻¹ de Phytigel.

Os tratamentos consistiram de adição ao meio de cultura de 6-Benzilaminopurina (BAP) e Cinetina (CIN) em diferentes concentrações (Testemunha – sem BAP e CIN); 1,0 mg L⁻¹; 2,0 mg L⁻¹; 3,0 mg L⁻¹ e 4,0 mg L⁻¹). Quatro semanas após a inoculação, os ápices caulinares foram divididos em duas partes e distribuídos em frascos contendo meio de cultura MS, pH 5,8 (ajustado antes da autoclavagem), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 2,3 g L⁻¹ de phytigel.

No processo de multiplicação efetuaram-se quatro subcultivos, sendo o primeiro aos 25 dias; o segundo aos 50; o terceiro aos 75 e o quarto aos 100 dias após a inoculação, realizando-se o cultivo das gemas laterais provenientes da subdivisão longitudinal dos explantes e, ou, do isolamento das brotações, com o corte das folhas sempre que possível. No final de cada subcultivo, os brotos foram isolados e reinoculados em meio de cultura.

Os explantes, durante as fases de estabelecimento e de multiplicação foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de 23 ± 2°C, sob iluminação artificial de 30 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas de luz. Explantes contaminados foram descartados.

No início de cada subcultivo, foi avaliado o número total de explantes produzidos por frasco, para a obtenção da taxa de multiplicação absoluta, para cada tratamento. A taxa de multiplicação absoluta é o número de brotos obtidos por explante inicial em cada subcultivo de 25 dias.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos, cinco repetições, sendo cada repetição representada por cinco potes contendo um explante cada. Os dados foram submetidos a análise de regressão através do SISVAR (FERREIRA, 2008)

A partir destes dados, foi realizada a análise de regressão polinomial para estudar o comportamento das taxas de multiplicação em função das concentrações de BAP e CIN utilizada no meio de cultura.

5.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com as análises de variância, verificou-se que houve diferença significativa entre as doses dos reguladores 6- Benzilaminopurina (BAP) (Tabela 04) e cinetina (CIN) (Tabela 05) para a taxa de multiplicação absoluta e acumulada sendo a variável número de brotos emitidos por explantes ($P < 0,05$). A análise de regressão indicou equações de segundo grau, como melhor ajuste para todas as variáveis.

TABELA 4- Quadrados médios da análise de variância e níveis de significância referentes à porcentagem de brotos emitidos por explantes em diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) durante subcultivos de multiplicação de bananeira 'Thap maeo'. Ilha Solteira-SP, 2011.

	Quadrados Médios		/ Características por Subcultivo	
	1º	2º	3º	4º
Concentrações	1.30*	4.70*	5,84*	6.00*
C.V. (%)	52,70	23,34	20,70	16,70

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

C.V. (%)= Coeficiente de Variação

TABELA 5- Quadrados médios da análise de variância e níveis de significância referentes a porcentagem de brotos emitidos por explantes em diferentes concentrações de Cinetina durante subcultivos de multiplicação de bananeira 'Thap maeo'. Ilha Solteira-SP, 2011.

	Quadrados Médios		/ Características por Subcultivo	
	1º	2º	3º	4º
Concentrações	2.44*	4.14*	4.26*	6.80*
C.V. (%)	30,60	23,69	31,25	21,56

* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

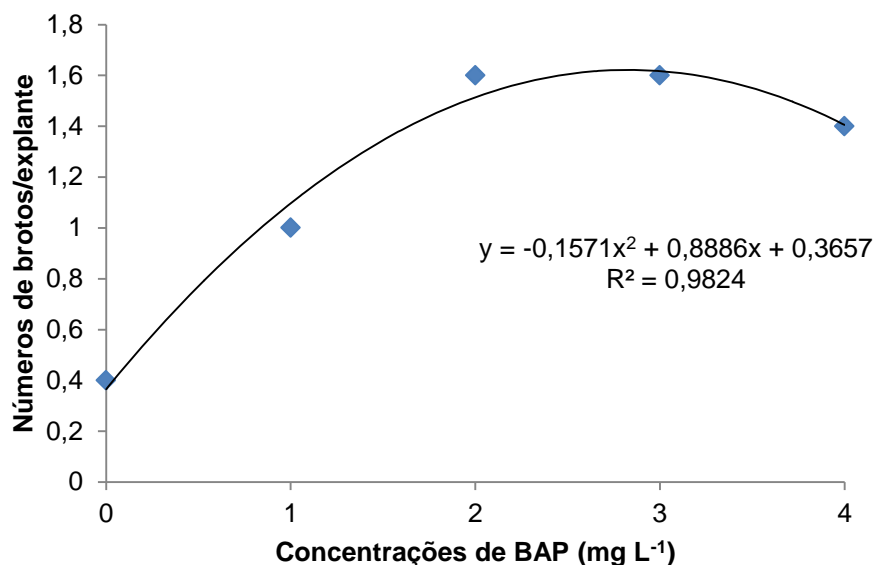
C.V. (%)= Coeficiente de Variação

A taxa de multiplicação *in vitro* variou de 1,30 a 3,8 brotos por explante inicial, em função das concentrações de BAP, ao longo dos quatro subcultivos.

No 1º subcultivo, decorridos 25 dias após a inoculação, através do cálculo da derivada no ponto máximo da curva verificou-se que a concentração de 3 mg L⁻¹ evidenciou 2,8 brotos. Em seguida foi observado redução no número de brotos com aumento da dose de BAP para 4,0 mg L⁻¹ apresentando valor médio de 1,4 brotos.

(Figura 12). O aumento na quantidade de brotos pode ser explicado devido a presença das células totipotentes. Estas são células que tem a característica de se multiplicar e quando sofre a ação de um regulador de crescimento que a estimule, ocorre a multiplicação em massa.

FIGURA 12 - Número de brotos emitidos por explante inicial de bananeira 'Thap maeo' no 1º subcultivo em meio de cultura contendo diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP). Ilha Solteira-SP, 2011.



Esse índice difere de Vuylsteke e De Langhe (1985), Banerjee e De Langhe (1985) e Wong (1986) que obtiveram taxa de multiplicação entre duas e dez plântulas por subcultivo de quatro a cinco semanas. Provavelmente, este fato deve-se ao acúmulo de BAP no explante, cujo excesso inibe a multiplicação. Uma das maneiras de tentar maximizar a produção de brotos seria alternar concentrações altas e baixas de BAP no meio de cultura, nos diferentes subcultivos.

A menor taxa de multiplicação de explantes foi a dose de 1,0 mg L⁻¹ de BAP nos quatro subcultivos ao qual verificou-se taxa média variando de 1,0 a 1,4 brotos por explante inicial (Figuras 13 e 14).

FIGURA 13 - Número de brotos emitidos por explante inicial de bananeira 'Thap maeo' no 2º subcultivo em meio de cultura contendo diferentes concentrações de 6- Benzilaminopurina (BAP). Ilha Solteira-SP, 2011.

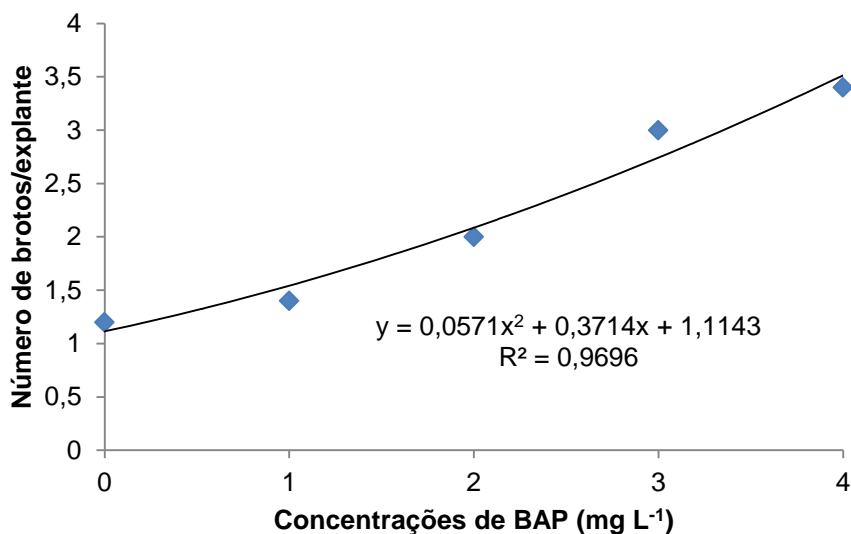
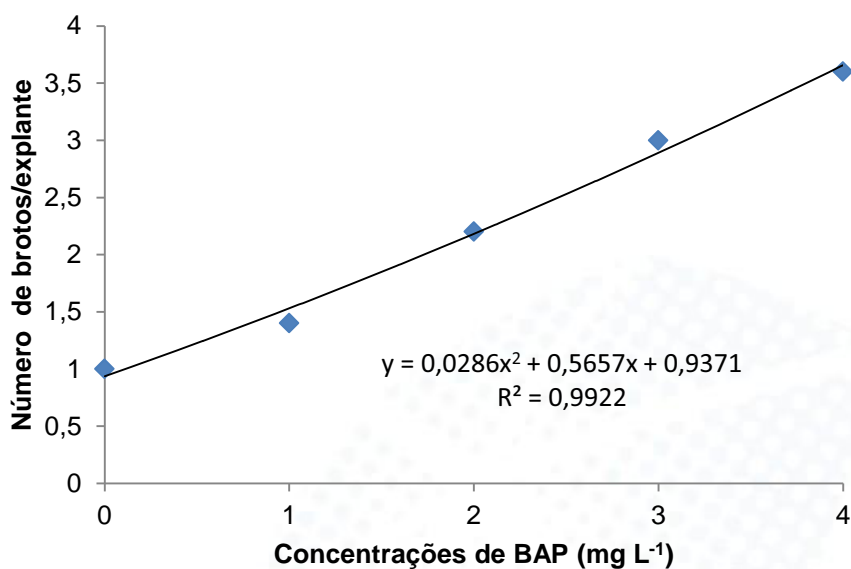


FIGURA 14 - Número de brotos emitidos por explante inicial de bananeira 'Thap maeo' no 3º subcultivo em meio de cultura contendo diferentes concentrações de 6-Bezilaminopurina (BAP). Ilha Solteira-SP, 2011.



A maior taxa de multiplicação foi obtida na concentração de 4,0 mg L⁻¹ de BAP, no 4º subcultivo aos 100 dias de cultivo, com média de 3,8 brotos por explante inicial (Figura 15). Os resultados obtidos foram superiores aos encontrados por

Braga et al.(2001), para variedade Caipira, que teve média de 2,58 e por Oliveira et al.(2001), para a variedade FHIA-01, com média de 2,44.

De acordo com vários autores, as concentrações mais utilizadas de BAP para a micropropagação *in vitro* de bananeira estão na faixa entre 2,5 mg L⁻¹ e 5,0 mg L⁻¹ e dependem de fatores como genótipo e condições de cultivo (BANERJEE; DE LANGHE, 1985; CRONAUER; KRIKORIAN, 1986; VUYLSTEKE, 1989).

Oliveira et al. (2001) obtiveram a maior taxa de multiplicação absoluta 4,96, na concentração de 7,5 mg L⁻¹ de BAP, no quinto subcultivo de brotos de bananeira FHIA 01. Contudo, Lima e Moraes (2006), ao avaliarem a taxa de multiplicação absoluta em FHIA 01, verificaram que a maior taxa foi obtida na concentração de 4,0 mg L⁻¹ de BAP no terceiro subcultivo. Outro estudo publicado por Oliveira e Silva (1997) demonstrou que as maiores taxas de multiplicação *in vitro* das cultivares triplóides, Nanicão e Grande Naine, foram obtidas no terceiro e quarto subcultivos. De acordo com os autores, a taxa de multiplicação é um dos principais indicadores para avaliar o desempenho de uma empresa produtora de mudas micropropagadas de bananeira.

Os diferentes resultados existentes na literatura podem ser explicados pela influência do genótipo, número de subcultivos, concentrações e tipos de citocininas na taxa de multiplicação (ZAERR; MAPES, 1985; POCASANGRE et al., 1994; MENDES et al., 1996; BRAGA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2001).

As taxas de multiplicação tendem a reduzir a partir do quarto subcultivo; tal fato se deve muito provavelmente ao acúmulo de citocininas nos explantes, cujo excesso pode inibir a multiplicação (BANERJEE; DE LANGHE, 1985). Sendo assim, é recomendável que durante o processo de multiplicação *in vitro* ocorra alternância de concentrações de citocininas nos diferentes subcultivos (LIMA; MORAES, 2006).

Na micropropagação de bananeiras, o uso da citocinina BAP permite a multiplicação de plantas em larga escala (CID, 2000).

Vários autores relatam o efeito das citocininas sobre a quebra da dominância apical e o favorecimento da emissão das novas brotações, mas em contrapartida são observados também efeitos na inibição do alongamento em

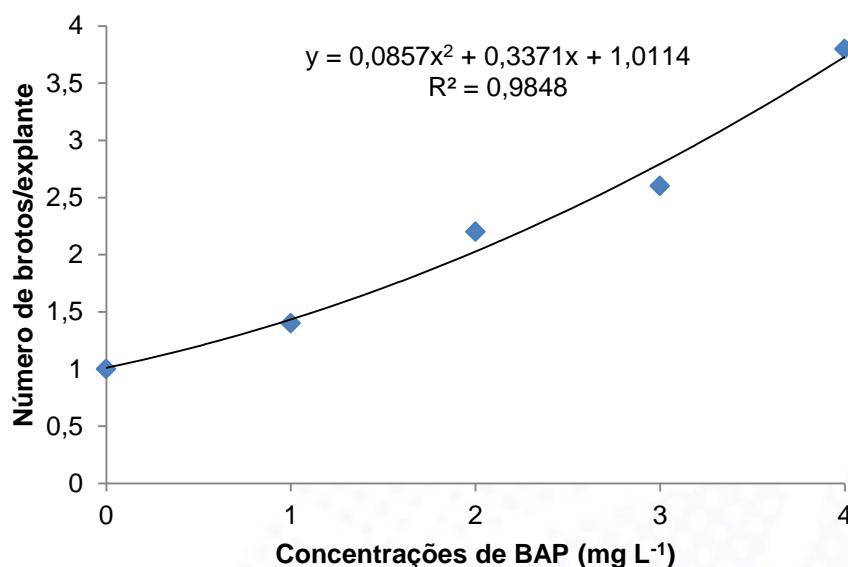
virtude do acúmulo destes reguladores nos tecidos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990; DINIZ et al., 2004; COSTA et al., 2006).

O limite máximo de concentração de BAP e CIN foi de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ este valor foi estabelecido por Domingues et al. (1995) visando evitar variação somaclonal.

Segundo Lane (1979), o efeito inibitório no crescimento é caracterizado pela ausência de alongamento, encurtamento dos entrenós e engrossamento exagerado dos caules. Resultado semelhante foi observado por Araújo et al. (2004), que constataram resposta linear decrescente na altura de explantes de gloxínia com o aumento dos níveis de BAP.

Para o 2º, 3º e 4º subcultivos a concentração de 4 mg L^{-1} também foi a que apresentou melhor resultado apresentando media de 3,6 brotos (Figuras 13,14 e 15), sendo esta concentração podendo ser recomendada para a multiplicação comercial da bananeira 'Thap maeo'.

FIGURA 15 - Número de brotos emitidos por explante inicial de bananeira 'Thap maeo' no 4º subcultivo em meio de cultura contendo diferentes concentrações de 6-Bezilaminopurina (BAP). Ilha Solteira-SP, 2011.



Durante os 3º e o 4º subcultivos observou-se formação de raízes nos explantes (Figura 16). Segundo Oliveira e Silva (1997), o enraizamento não é benéfico pois consome reserva que poderia ser utilizada para a produção de brotos.

FIGURA 16 - Explante com brotos no 4º subcultivo em meio de cultura com 4 mg L⁻¹ de 6-Bezilaminopurina (BAP) apresentando enraizamento. Ilha Solteira - SP, 2011.



Fonte: Pereira (2011)

Com relação ao regulador de crescimento cinetina verificou-se que a taxa de multiplicação *in vitro* variou de 1,30 a 3,8 brotos por explante inicial, em função das concentrações de cinetina, ao longo dos quatro subcultivos

No 1º subcultivo, decorridos 25 dias após a inoculação verificou-se tendência de aumento do numero de brotos até a concentração de 4 mg L⁻¹ com 2,6 brotos.

A taxa de multiplicação *in vitro* variou de 1,30 a 3,8 brotos por explante inicial, em função das concentrações de BAP, ao longo dos quatro subcultivos

A menor taxa de multiplicação de explantes foi a concentração de 1,0 mg L⁻¹ nos quatro subcultivos ao qual verificou-se 1,4 brotos por explante inicial (Figuras 17, 18,19 e 20).

A maior taxa de multiplicação foi obtida na concentração de 4,0 mg L⁻¹ de cinetina no 4º subcultivo aos 100 dias de cultivo, com 3,8 brotos por explante inicial (Figura 20).

FIGURA 17 - Número de brotos emitidos por explante inicial de bananeira 'Thap maeo' no 1º subcultivo em meio de cultura contendo diferentes concentrações de cinetina. Ilha Solteira-SP, 2011.

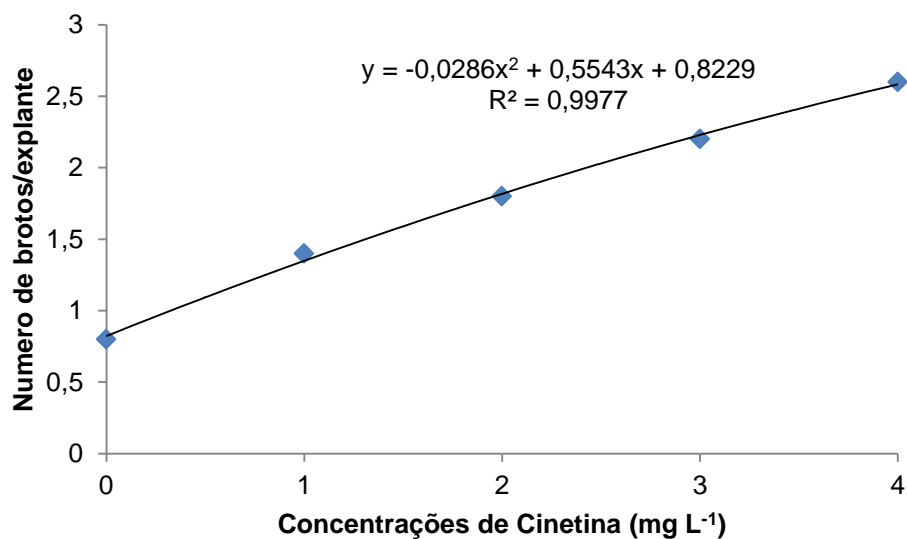


FIGURA 18 - Número de brotos emitidos por explante inicial de bananeira 'Thap maeo' no 2º subcultivo em meio de cultura contendo diferentes concentrações de cinetina. Ilha Solteira-SP, 2011.

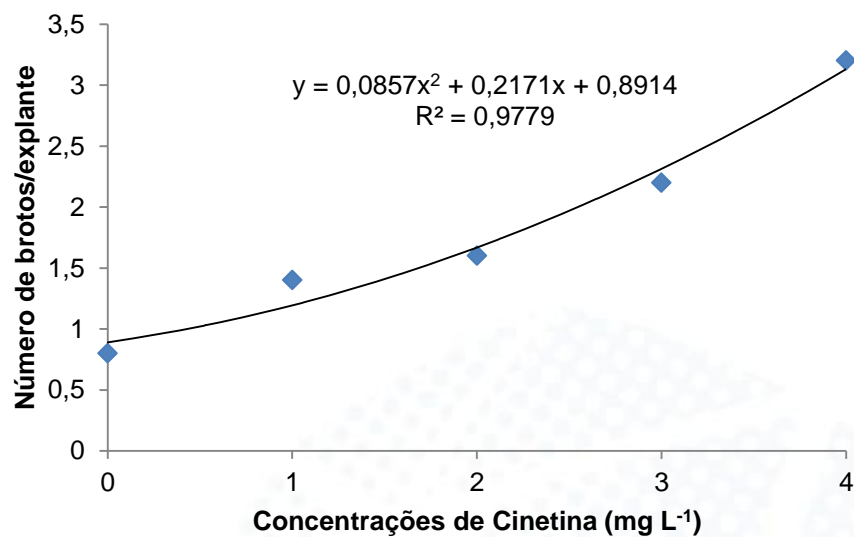


FIGURA 19 - Número de brotos emitidos por explante inicial de bananeira 'Thap maeo' no 3º subcultivo em meio de cultura contendo diferentes concentrações de cinetina. Ilha Solteira-SP, 2011.

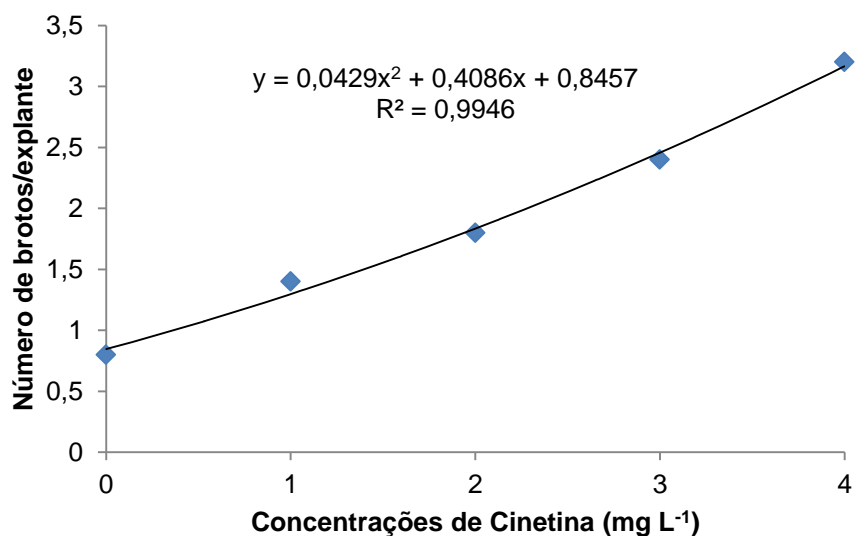
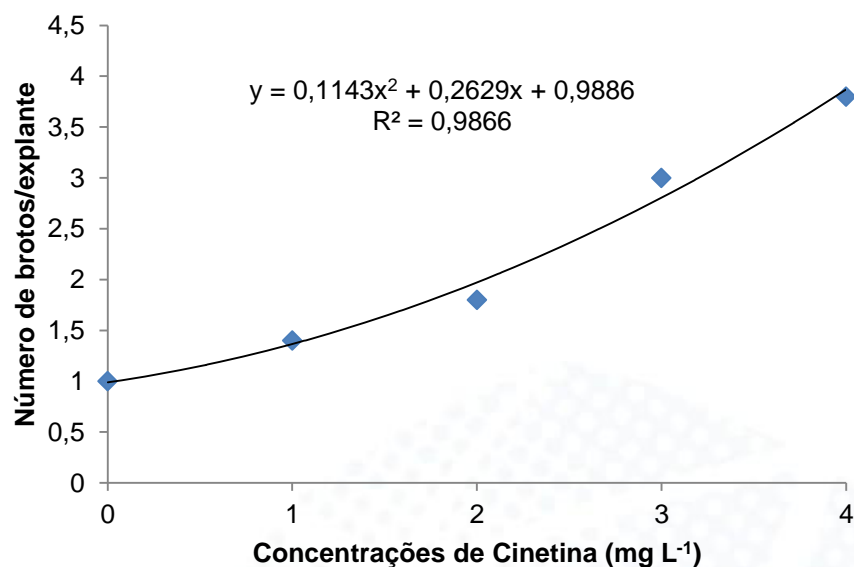


FIGURA 20 - Número de brotos emitidos por explante inicial de bananeira 'Thap maeo' no 4º subcultivo em meio de cultura contendo diferentes concentrações de cinetina. Ilha Solteira-SP, 2011.



Os resultados obtidos foram superiores aos conseguidos por Muhammad et al. (2007) que obtiveram média de 1,8 brotos em bananeira Basrai - Sub grupo AAA. Em concentrações maiores pode haver um decréscimo no número de brotos possivelmente pelo excesso de regulador o que poderia ocasionar vitrificação dos

explantes e assim formação de calos, como também aumentar a possibilidade de ocorrer variação somaclonal posteriormente a nível de campo, possibilitando o uso deste regulador na micropropagação. Porém para este regulador estudos ainda são escassos para micropropagação de bananeira.

Estudos com uso de cinetina ainda precisam serem aprofundados com relação a variação somaclonal e estudos das plantas micropropagadas em nível de campo.

5.4 - CONCLUSÕES

- O maior numero de brotos obtido foi na concentração foi de 4mg L^{-1} de Cinetina e BAP , conseguindo em média 3,8 brotos por explantes no 4º subcultivo;

5.5 – REFERENCIAS

ASSIS, M.; M. PAIVA ; ARAMANI, O. C. Micropropagação de plantas: histórico de uma empresa comercial. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte v. 21, n. 204, p. 124-126, 2000.

BANERJEE, N.; DELANGHE, E. A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). **Plant Cell Reports**, Verlag, v. 4, p.351-354, 1985.

BRAGA, M. F.; SÁ, M. E. L.; MUSTAFÁ, P. C. Avaliação de um protocolo para multiplicação *in vitro* da bananeira (*Musa* sp.) cv. Caipira (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticaval, v. 23, n. 2, p. 215-219, 2001.

CID, L. P. B. Citocinina. In: CID, L. P. B. (Ed.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: EMBRAPA, 2000. 180 p.

COSTA, F. H. S.; PEREIRA, J. E. S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P. Efeito da interação entre carvão ativado e N^6 -benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, cv. Grand Naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 280-283, 2006.

CRONAUER, S. S.; KRIKORIAN, A. D. Multiplication of *Musa* from exised stem tips. **Annals of Botany**, Paris, v. 53, n. 3, p. 321-8, 1984.

DAMASCO, O. P. I. D.; GODWIN, M. K.; SMITH E S. W. Gibberellic acid detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish bananas. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Sydney v. 36, n. 2, p. 237-241, 1996.

DECLERCK, S., J. M.; RISEDE E B.; DELVAUX. Greenhouse response of micropropagated bananas inoculated with *in vitro* monoxenically produced arbuscular mycorrhizal fungi. **Scientia Horticulturae**, Netherlands, v. 93, n. 3-4, p. 301-309, 2002.

DINIZ, J. D. N.; HERNANDEZ, F. F. F.; GONÇALVES, A. N.; TORRES, A. C. Absorção de micronutrientes por explantes de bananeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 8, p. 1385-1391, 1999.

DOMINGUES, E. T.; TULMANN NETO, A.; MENDES, B. M. J. Cultura de ápices caulinares de *Musa* sp., var. 'Maça': estabelecimento, micropropagação e enraizamento *in vitro*. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 52, n. 2, p. 387-394, 1995.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, p. 36-41, 2008.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa. CNPH, 1990. p. 99-169,

LANE, W. D. Regeneration of pear plants from shoot meristems-tips. **Plant Science Letters**, Ireland, v. 16, n. 3, p. 337-342, 1979.

LEMO, E. E. P.; FERREIRA, M. S.; ALENCAR. L. M. C.; OLIVEIRA, J. G. L.; MAGALHÃES V. S. Micropropagação de clones de banana cv. terra em Biorreator de Imersão Temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 482-487, 2001.

LIMA, J. D.; MORAES, W. S. Concentração de benzilaminopurina e avaliação de protocolo para multiplicação *in vitro* de genótipos de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 36, n. 1, p.13-19, 2006.

MENDES, B. M. J.; MENDES, F. J.; TULMANN NETO, A. Efficacy of banana plantlet production by micropropagation. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 12, p. 863-867, 1996.

MUHAMMAD, A.; RASHID, H.; HUSSAIN, I. Proliferation-rate effects of BAP and kinetin on banana (*Musa* spp. AAA Group) 'Basrai'. **Hortscience**, Netherlands, v. 42, n. 5, p. 1253-1255, 2007.

OLIVEIRA, R. P.; SILVA, S. O. Micropopagação massal de bananeira. **Pesquisa, Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 32, n. 4, p. 415-420, 1997.

OLIVEIRA, R. P.; SILVA, S. O. Avaliação da micropropagação comercial em bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 415-420, 1997.

OLIVEIRA, R. P.; SILVEIRA, D. G.; SILVA, S. O. Concentração de BAP e a Eficiência de Micropropagação de Bananeira Tetraplóide (grupo AAAB). **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, n.1, p.73-78, 2001.

POCASANGRE, L.; HOHNE, C.; RUÍZ, D.; LÓPEZ, F. Micropropagación de híbridos tetraploides y cultivares triploides de banano. In: FUNDACIÓN HONDUREÑA DE INVESTIGACIÓN AGRÍCOLA. **Programa de banano e platano**. La Lima: [s.n.], 1994. p. 36-39. (Informe Técnico)

SAGI, L.; MAY, G. D.; REMY S.; SWENNEN, R. Recent developments in biotechnological research on bananas (*Musa* spp.). **Biotech. Genet. Engineer. Rev.**, Andover, v. 15, p. 313-327, 1998.

VASIL, I. Automation in plant propagation. **Plant, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 39, n. 2, p. 105-109, 1994.

VUYLSTEKE, D. E.; ORTIZ, R. Field performance of conventional vs. in vitro propagules of plantain (*Musa* spp., AAB group). **HortScience**, Netherlands, v. 31, n. 5, p. 862-865, 1996.

VUYLSTEKE, D.; DELANGHE E. E. E. Feasibility of in vitro propagation of bananas and plantains. **Tropical Agriculture**, Amsterdam, v. 62, n. 4, p. 323-328, 1985.

VUYLSTEKE, D. **Shoot-tip culture for the propagation and exchange of Musa germplasm; practical manual for handling crop germplasm in vitro**. Rome: IBPGR, 1989. 56 p.

WONG, W. C. In vitro propagation of banana (*Musa* spp.): initiation, proliferation and development of shoot- tip cultures on defined media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.6, n. 2, p. 159-166, 1986.

ZAER, J. B.; MAPES, M. O. Action of growth regulators. In: BONGA J. M; DURZAN D. J. (ed). **Tissue culture in florestry**: Martinus Nijhoff Publishers, 1985. p. 231-255

6 - ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE BANANEIRA 'THAP MAEO' EM CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO INDOL BUTÍRICO (AIB) E ÁCIDO NAFTALENO ACÉTICO (ANA)

Resumo

O processo de micropropagação da bananeira tem início a partir de um rigoroso processo de seleção de plantas matrizes, seguido das fases de estabelecimento, multiplicação e enraizamento/alongamento *in vitro*, sendo as plantas obtidas submetidas à aclimação em casa de vegetação ou telado.

Destas etapas, o enraizamento/alongamento *in vitro* é considerado fundamental para a maioria das espécies, já que a obtenção de um sistema radicular funcional e uniforme é requisito básico para que se alcancem elevadas taxas de sobrevivência na fase de aclimação.

As principais classes de reguladores de crescimento empregados na micropropagação durante a fase de enraizamento são as auxinas, sendo os mais utilizados são o ácido naftalenoacético (ANA), o ácido indolacético (AIA) e o ácido indolbutírico (AIB). Entretanto, alguns pesquisadores aceitam a hipótese de que a redução do período de enraizamento *in vitro*, ou mesmo sua eliminação, não prejudica a sobrevivência e o posterior desenvolvimento *ex vitro* de determinadas espécies, contribuindo, dessa forma, para a redução significativa dos custos de produção e do tempo para a comercialização do material propagativo.

A importância estratégica da multiplicação rápida para atender a demanda por mudas de bananeira, este trabalho teve como objetivo avaliar o enraizamento *in vitro* de brotos obtidos através do processo micropropagação da bananeira 'Thap maeo'. Os tratamentos consistiram de Ácido Indol Butírico (AIB), em diferentes concentrações (Testemunha – sem regulador vegetal; 1,0 mg L⁻¹; 2,0 mg L⁻¹; 3,0 mg L⁻¹ e 4,0 mg L⁻¹) e Ácido Naftaleno Acético (ANA) também em diferentes concentrações (0 mg L⁻¹-testemunha; 1,0 mg L⁻¹; 2,0 mg L⁻¹; 3,0 mg L⁻¹ e 4,0 mg L⁻¹). Quatro semanas após a inoculação, foi avaliada a quantidade de raízes emitidas por broto introduzido. Os resultados obtidos permitiram concluir que o uso dos reguladores podem ser dispensados.

Palavras chave: *Musa* sp. Micropropagação. Rizogênese.

***IN VITRO* ROOTING OF BANANA 'THAP MAEO' IN CONCENTRATIONS OF INDOL BUTYRIC ACID (IBA) AND NAPHTHALENE ACETIC ACID (NAA)**

Abstract

The process of micropropagation of banana starts from a rigorous selection process cultivars, followed by phases of establishment, multiplication and rooting, elongation in vitro, the plants were obtained subject to acclimatization in the greenhouse or nursery. These steps, the rooting, elongation in vitro is considered essential for most species, as to obtain a functional root system and uniform basic requirement is intended to achieve high survival rates during the acclimatization phase. However, some researchers support the hypothesis that reducing the period of rooting, or even its elimination does not affect the survival and later ex vitro development of certain species, contributing thus to significantly reduce production costs and time for the marketing of propagation material. Given the strategic importance of rapid multiplication to meet this demand for banana plantlets, this study aimed to evaluate the in vitro rooting of shoots obtained through the process micropropagation of banana 'Thap Maeo'. Treatments consisted of Indole Butyric Acid (IBA) at different concentrations (control - 0 mg L⁻¹, 1,0 mg L⁻¹, 2,0 mg L⁻¹, 3,0 mg L⁻¹ and 4,0 mg L⁻¹) and Naphthalene Acetic acid (NAA) also at different concentrations (control 0 mg L⁻¹, 1,0 mg L⁻¹, 2,0 mg L⁻¹, 3,0 mg L⁻¹ and 4,0 mg L⁻¹). Four weeks after inoculation, was evaluated amount of roots per bud introduced. The results showed that the use of regulators may be exempted.

Keywords: *Musa* sp. Micropropagation. Rhizogenesis.

6.1 – INTRODUÇÃO

O estado de São Paulo é o segundo maior produtor banana do país com 1.231.823 toneladas utilizando uma área de 56.266 hectares seguido da Bahia com produção de 1.079.050 toneladas (IBGE, 2010). No entanto, como para muitas espécies cultivadas em grandes áreas, a bananeira é afetada por diversos problemas fitossanitários, sendo a Sigatoka-negra, causada pelo fungo *Mycosphaella fijiensis* Morelet, considerada a mais grave doença (SILVA et al., 2003) e que tem ocasionado redução significativa na produção das cultivares Prata, Prata-Anã, Nanicão e Grande Naine, atualmente as mais difundidas e plantadas.

Com isso, a micropropagação de ápices caulinares e de meristemas constitui importante ferramenta para a rápida propagação clonal massal e validação de genótipos de bananeira lançados pelos programas de melhoramento genético (GÜBBÜK; PEKMEZCI, 2004; ROCHA, 2005). Isso porque a produção de mudas utilizando métodos convencionais de propagação, além de se constituir num mecanismo de disseminação de doenças e pragas (ROELS et al., 2005), apresenta baixa taxa de multiplicação, variando entre 3 e 10 filhotes por matriz/ciclo (VUYLSTEKE; LANGHE, 1985), dependendo da cultivar e das condições de manejo da cultura.

O processo de micropropagação da bananeira tem início a partir de um rigoroso processo de seleção de plantas matrizes, seguido das fases de estabelecimento, multiplicação e enraizamento/alongamento *in vitro*, sendo as plantas obtidas submetidas à aclimação em casa de vegetação ou telado. Destas etapas, o enraizamento/alongamento *in vitro* é considerado fundamental para a maioria das espécies, já que a obtenção de um sistema radicular funcional e uniforme é requisito básico para que se alcancem elevadas taxas de sobrevivência na fase de aclimação (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998)

As principais classes de reguladores de crescimento empregados na micropropagação durante a fase de enraizamento são as auxinas, sendo os mais utilizados ácido naftalenoacético (ANA), o ácido indolacético (AIA) e o ácido indolbutírico (AIB) (HINOJOSA, 2000).

Entretanto, alguns pesquisadores aceitam a hipótese de que a redução do período de enraizamento *in vitro*, ou mesmo sua eliminação, não prejudica a sobrevivência e o posterior desenvolvimento *ex vitro* de determinadas espécies contribuindo, dessa forma, para a redução significativa dos custos de produção e do tempo para a comercialização do material propagativo (PREECE; SUTTER, 1991; GEORGE, 1996). Assim, uma possível alternativa seria submeter as células totipotentes das partes aéreas a uma fase de indução de raízes *in vitro*, seguida de uma etapa de alongamento em substrato (*ex vitro*), pois raízes mais curtas normalmente estão em fase de ativo crescimento, sendo mais adequadas ao transplante, por facilitar o manuseio, o pegamento e o posterior desenvolvimento *ex vitro* das plantas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; WOODHEAD; BIRD, 1998). Além disso, a maior permanência das plantas em meio de cultura pode proporcionar um rápido envelhecimento das raízes, tornando-as menos funcionais (PEREIRA; FORTES, 2003), ao contrário do enraizamento *ex vitro*, que pode conferir qualidades adicionais ao sistema radicular formado (DEBERGH; READ, 1991; CUZZUOL et al., 1996).

Dada a importância estratégica da multiplicação rápida para atender essa demanda por mudas de bananeira, este trabalho teve como objetivo avaliar concentração de Ácido Indol Butírico (AIB) e Ácido naftaleno Acético (ANA) no enraizamento *in vitro* de brotos obtidos através do processo micropropagação da bananeira 'Thap maeo'.

6.2 - MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Micropropagação do Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio-Economia da Faculdade de Engenharia da Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Campus de Ilha Solteira – SP. Os explantes utilizados foram obtidos de plantas matrizes originadas de clones de *Musa* sp. 'Thap maeo' cultivada na Fazenda de Ensino Pesquisa e Extensão da UNESP, Campus de Ilha Solteira, localizada no município de Selvíria-MS no período de 10 de outubro a 10 de novembro de 2011. Após a obtenção dos brotos através do processo de micropropagação, os mesmos foram separados e inoculados em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), pH 5,8

(ajustado antes da autoclavagem) e suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose e $2,3 \text{ g L}^{-1}$ de Phytigel e adicionado Ácido Indol Butírico (AIB) e Ácido Naftaleno Acético (ANA) em diferentes concentrações, sendo esta fase realizada câmara de fluxo laminar.

Os tratamentos consistiram de AIB, em diferentes concentrações (Controle – sem regulador; $1,0 \text{ mg L}^{-1}$; $2,0 \text{ mg L}^{-1}$; $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $4,0 \text{ mg L}^{-1}$) e ANA também em diferentes concentrações (testemunha – sem regulador; $1,0 \text{ mg L}^{-1}$; $2,0 \text{ mg L}^{-1}$; $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $4,0 \text{ mg L}^{-1}$). Quatro semanas após a inoculação, foi avaliada a quantidade de raízes emitidas por broto introduzido.

Os brotos foram colocados durante a fase de enraizamento em sala de crescimento à temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, sob iluminação artificial de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz. Explantes contaminados foram descartados.

Ao final do subcultivo, todos os frascos foram amostrados e avaliados externamente, quanto ao número de raízes. A partir destes dados, foi realizada a análise de regressão polinomial para estudar o comportamento das taxas de enraizamento em função da concentração de AIB e ANA utilizada no meio de cultura.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos, cinco repetições, sendo cada repetição representada por cinco potes contendo cinco explante cada. Os dados foram submetidos a análise de regressão através do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2008).

A aclimação, realizada após o enraizamento, constou da individualização e limpeza das plântulas em água corrente e o subsequente plantio em bandejas plásticas, contendo substrato Plantmax. Em seguida, as plântulas foram mantidas em casa-de-vegetação coberta com sombrite, reduzindo-se a radiação plena em 70% e 50%.

6.3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análises de variância, observou-se que não houve diferença significativa entre as doses dos reguladores AIB e ANA (Tabela 06) para a variável numero de raízes por explantes ($P < 0,05$).

TABELA 6 - Quadrados médios da análise de variância e níveis de significância referentes ao número de raízes emitidas por explantes em diferentes concentrações de Ácido Indol Butírico (AIB) e Ácido Naftaleno Acético (ANA) durante o enraizamento *in vitro* de bananeira 'Thap maeo'. Ilha Solteira-SP, 2011.

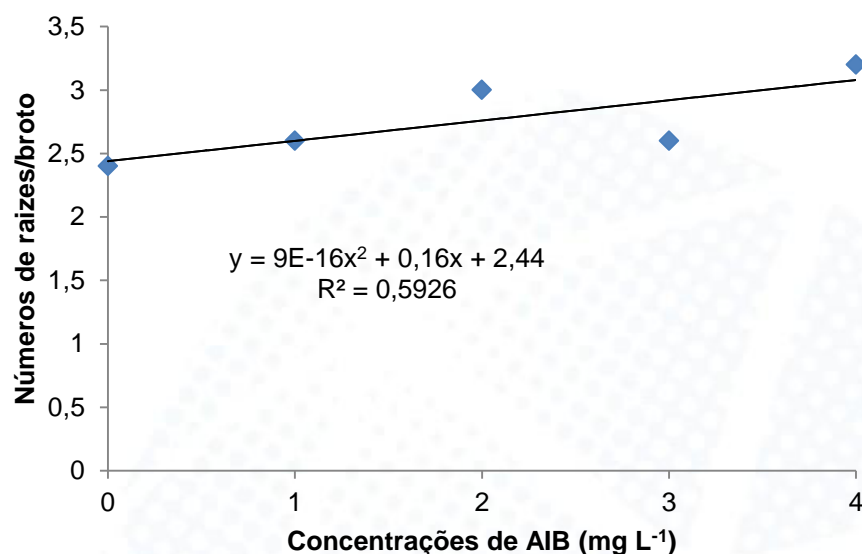
	QUADRADOS MÉDIOS / CARACTERÍSTICA	
	AIB	ANA
CONCENTRAÇÃO	0,54 ns	0.14 ns
C.V.(%)	18,55	23,00

ns não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

C.V.(%)= Coeficiente de Variação

O controle (sem o uso de regulador) apresentou número médio de 2,4 raízes, como não houve diferença significativa em relação aos outros tratamentos, é economicamente viável enraizar os brotos em meio MS sem adição de regulador vegetal. A concentração de AIB no meio de cultura que resultaram em taxas máximas de enraizamento, foi de 4,0 mg L⁻¹ ao qual foi obtido média de 3,2 raízes por broto (Figura 21)

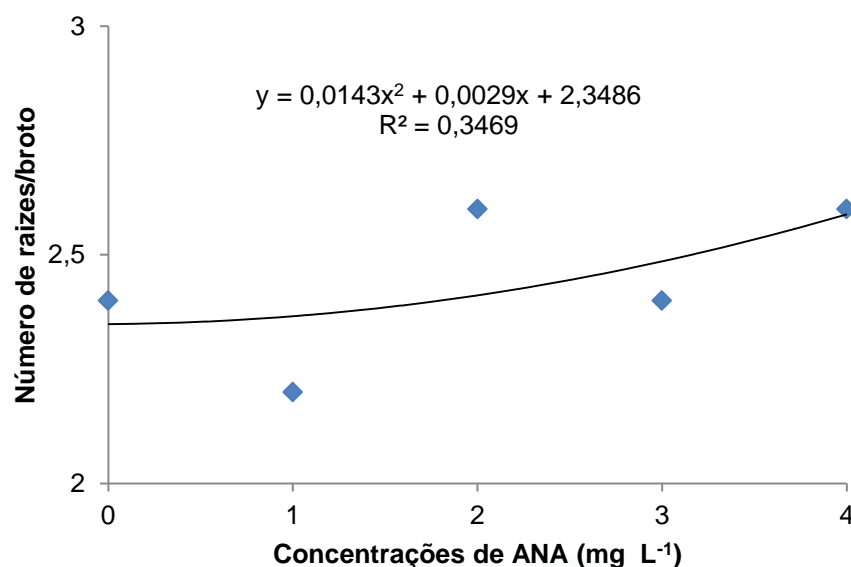
FIGURA 21 - Número de raízes por broto de bananeira 'Thap maeo' em meio de cultura contendo concentrações de Ácido Indol Butírico (AIB). Ilha Solteira-SP, 2011.



O enraizamento apresentado quando não se utilizou os reguladores de crescimento demonstra que as células promotoras de raízes necessitam de condições adequadas para o desenvolvimento sem obrigatoriamente a necessidade dos mesmos.

Para resultados obtidos verificou-se tendência de aumento com o uso de ANA ao meio de cultura. Quando não se utilizou o regulador foi obtido número de raízes de 2,4, com a utilização do regulador na concentração 4,0 mg L⁻¹ conseguindo média de de 2,6 raízes por broto porém sem diferença significativa entre os tratamentos (Figura 22).

FIGURA 22 - Número de raízes por broto de bananeira 'Thap maeo' em meio de cultura contendo diferentes concentrações de Ácido Naftaleno Acético (ANA). Ilha Solteira-SP, 2011.



Camolesi et al. (2010) obtiveram resultados superiores quando avaliaram o número de raízes na variedade Maçã verificando média de 4,2 raízes em meio de cultura MS sem adição de regulador vegetal.

Resultados semelhantes foram obtidos por Molla et al. (2004), em bananeira da cultivar Bari, os quais evidenciaram maior número médio de raízes por explante com aumento do período de cultivo em meio de enraizamento *in vitro*, independentemente das concentrações de AIB estudadas. Adicionalmente, foi observado pouco incremento no número de raízes entre o 20^o e 25^o dia de cultivo,

com maior média (8,28 raízes) aos 35 dias de cultivo *in vitro* na presença de 0,5 mg L⁻¹ de AIB.

Os resultados corroboram com Braga et al. (2001), que mostraram a não-utilização de regulador de crescimento e a redução dos nutrientes pela metade serem eficientes para aumentar o vigor vegetativo das culturas, uma vez que os brotos obtidos durante a fase de enraizamento apresentaram quase o dobro do tamanho dos brotos das fases de multiplicação. Isto era esperado, pois uma vez enraizados, os brotos têm maior capacidade de absorção dos nutrientes. Esta eficácia também foi comprovada por Oliveira e Silva (1997). Inclusive, Souza e Gonçalves (1996) sugeriram que a melhor adequação dos nutrientes favoreceria a rizogênese das plantas. Analisando diversos trabalhos, Grattapaglia e Machado (1990) verificaram que diversas espécies, principalmente herbáceas, enraízam na presença de níveis muito reduzidos de auxina, ou, simplesmente, em meio básico sem hormônio.

Os números obtidos diferem de Domingues et al. (1995) para a indução do enraizamento em plântulas de bananeira 'Maçã' *in vitro*, recomendou a utilização de 0,1 mg L⁻¹ de AIB ou ANA, em meio semi-sólido, na ausência de citocinina. Como também diferindo de Lameira (1987) que trabalhando com outras variedades de bananeira, sugeriu a utilização de 5 mg L⁻¹ de AIB.

Amin et al. (2009) obtiveram para a bananeira Basrai média de 3,5 raízes por broto utilizando o regulador AIB na concentração de 1,0 mg L⁻¹.

Segundo Gubbuk e Pekmezci (2005) onde avaliaram o uso do AIB em bananeira Grande naine e Basrai obtiveram numero de raízes de 4,42 e 4,33 respectivamente quando não utilizaram o regulador adicionado ao meio de cultura. Quando os mesmos adicionaram 1,0 mg L⁻¹ de AIB ao meio de cultura obtiveram resultados superiores com 4,73 e 5,23.

De acordo Gubbuk e Pekmezci (2004) que avaliaram o uso do AIB e ANA em três variedades de banana sendo elas Alanya 5, Anamur 10 e Bozyazy 14 do grupo Cavendish (nanica), quando não utilizaram os reguladores vegetais obtiveram em media de 6,76 raízes para as três variedade. Por outro lado com o adiconamento de 1,0 mg L⁻¹ de AIB houve um acréscimo no numero de raízes verificando-se 10,83 raízes por explante. Quando se adicionou 1,0 mg L⁻¹ de ANA houve um aumento

apresentando numero de raízes de 9,54, mostrando neste caso a eficácia dos reguladores vegetais.

O enraizamento *in vitro* de explantes de bananeira 'Thap maeo sem adição de hormônios vegetais pode ser observado na Figura 23.

FIGURA 23 - Brotos de bananeira 'Thap Maeo' enraizadas *in vitro* em meio de cultura sem adição de Ácido Indol Butirico (AIB) ou Ácido Naftaleno Acético (ANA), pronta para ser aclimatada. Ilha Solteira-SP, 2011.



Fonte: Pereira (2011)

6.4 - CONCLUSÕES

- Na fase de enraizamento *in vitro*, os resultados mostraram que o uso dos reguladores podem ser dispensados, tornando o processo mais barato.

6.5 – REFERENCIAS

AL-AMIN, M. D.; KARIM, M. R.; AMIN, M. R.; RAHMAN, S.; MAMUN, A. N. M. *In vitro* micropropagation of banana (*Musa* spp.) **J. Agril. Res**, Bangladesh, v. 34, n. 4. p. 645-659, 2009.

BORGES, A. L.; OLIVEIRA, A. M. G.; RITZINGER, C. H. S. P.; ALMEIDA, C. O.; COELHO, E. F.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, L. S.; LIMA, M. B; FANCELLI,

M.; FOLEGATTI, M. I. S.; FILHO, P. E. M.; SILVA, S. de; MEDINA, V M.; CORDEIRO, Z. J. M. **A cultura da banana/ Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**. 3. ed. rev. e amp. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 110 p. (Coleção Plantar, 56).

BRAGA, M. F.; SÁ, M. E. L.; MUSTAFÁ, P. C. Avaliação de um protocolo para multiplicação *in vitro* da bananeira (*Musa sp.*) cv. Caipira (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 215-219, 2001.

CAMOLESI, M. R.; KAIHARA, E. S.; SACONI, C. G.; FARIA, R. T.; NEVES, C. S. V. J. Redução da oxidação na propagação *in vitro* da bananeira maçã. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1237-1241, 2007.

COSTA, F. H. S.; PASQUAL, M.; PEREIRA, O. E. S.; RODRIGUES, F. A.; MIYATA, L. Y. Relação entre o tempo de enraizamento *in vitro* e o crescimento de plantas de bananeira na aclimatização. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 31-37, 2008.

CUZZUOL, G. R. F.; GALLO, L. A.; CROCOMO, O. J. Enraizamento de cravo (*Dianthus caryophyllus L.*) *in vitro* e *ex vitro*. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 53, n. 1, p. 60-66, 1996.

DEBERGH, P. C.; READ, P. E. Micropropagation. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (ed.). **Micropropagation: technology and application**. Amsterdam: Kluwer Academic, 1991. v. 24, p. 1-13.

DOMINGUES, E. T.; TULMANN NETO, A.; MENDES, B. M. J. Cultura de ápices caulinares de *Musa sp.*, var. 'Maça': estabelecimento, micropropagação e enraizamento *in vitro*. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 52, n. 2, p. 387-394, 1995.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, p. 36-41, 2008.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: in practice**. Edington: Exegetics, 1996. 1361 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa- CNPH, 1990. p. 99-169.

GUBBUK, H.; PEKMEZCI, M. *In vitro* propagation of banana (*Musa* spp.) using thidiazuron and activated charcoal. **Acta Agriculturae Scandinavica**, London, v. 56, n. 1, p. 65-69, 2005.

GUBBUK H, PEKMEZCI M. *In vitro* propagation of some new banana types (*Musa* spp.). **Turk. J. Agric**, Stambul, v. 28, p. 355-361, 2004.

HINOJOSA, G. F. Auxinas. In: CID, L. P. B: **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: EMBRAPA, 2000.180 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. Produção agrícola municipal. In: IBGE. **Cultura temporárias e permanentes**. Rio de Janeiro: IBGE, 2010. v. 37, p. 1- 89.

LAMEIRA, O. A. **Propagação *in vitro* da bananeira *Musa* sp. através da cultura de ápice caulinar**. 1987. 39 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Escola Superior de Agricultura de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1987.

MOLLA, M. M. H.; KHANAM, M. D.; KHATUN, M. M.; ALAMIN, M.; MALEK, M. A. *In vitro* rooting and ex vitro plantlet establishment of BARI banana 1 (*Musa* sp.) as influenced by different concentration of IBA (indole 3-butyric acid). **Asian Journal of Plant Sciences**, Bholakpur, v. 3, n. 2, p. 196-199, 2004.

OLIVEIRA, R. P.; SILVA, S. O. Micropopagação massal de bananeira. **Pesquisa, Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 4, p. 415-420, 1997.

PEREIRA, J.; FORTES, G. Toxicidade de antibióticos no cultivo *in vitro* da batata em meios semi sólido e líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n.11, p. 1273-1279, 2003.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 71-93.

ROCHA, H.S. **Luz e sacarose na micropopagação da bananeira "Prata Anã": alterações morfoanatómicas**. 205. 98 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)- Escola Superior de Agricultura de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

ROELS, S.; ESCALONA, M.; CEJAS, I.; NOCEDA, C.; RODRIGUEZ, R.; CANAL, M. J.; SANDOVAL, J.; DEBERGH, P. Optimization of plantain (*Musa AAB*) micropropagation by temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and OrganCulture**, Amsterdam, v. 82, p. 57-66, 2005.

SILVA, S. O.; PASSOS, A. R.; DONATO, S. L. R.; SALOMÃO, L. C. C.; PEREIRA, L. V.; RODRIGUES, M. G. V.; LIMA NETO, F. P.; LIMA, M. B. Avaliação de genótipos de bananeira em diferentes ambientes. **Ciênc. Agrotec**, Lavras, v. 24, p. 737-748, 2003.

SOUZA, S. A.; LEDO, C. A. S.; SILVEIRA, D. G.; SOUZA, F. V. D.; FARIA, G. A.; NETO, H. P. S.; SANTOS SEREJO, J. S.; SILVA, K. M.; COSTA, M. A. P. C.; SOARES, T. L.; JUNGHANS, T. G.; ALMEIDA, W. B. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2006. 151 p.

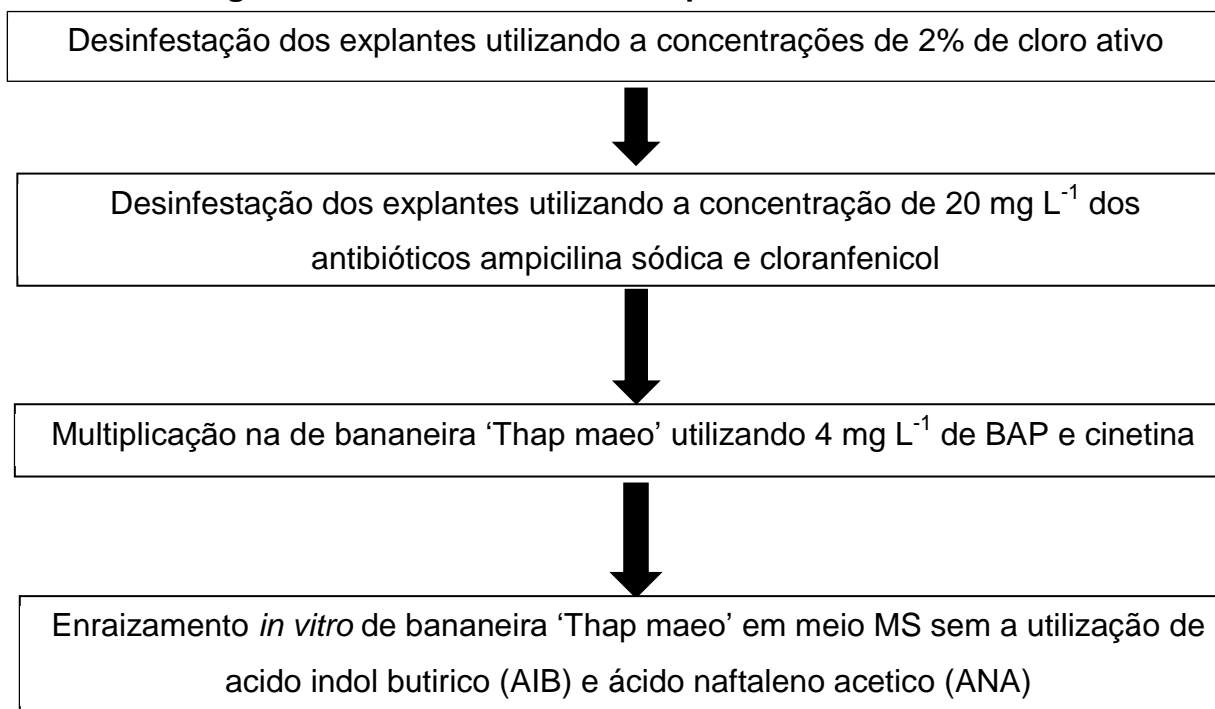
SOUZA, G. M.; GONÇALVES, A. N. Otimização de meio de cultura para bananeira (*Musa cavendishii* L.). **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 53, n.1, p. 51-59, 1996.

VUYLSTEKE, D.; DE LANGHE E. E E. Feasibility of in vitro propagation of bananas and plantains. **Tropical Agriculture**, Amsterdam, v. 62, n. 4, p. 323-328, 1985.

WOODHEAD, J. L.; BIRD, K. T. Efficient rooting and acclimation of micropropagated *Ruppia maritima* Loisel. **Journal of Marine Biotechnology**, New York, v. 6, n. 3, p. 152-156, 1998.

7 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Cronograma de estabelecimento do protocolo



- Para a desinfestação dos explantes com cloro ativo, mais trabalhos deverão ser realizados com novas concentrações e fontes de cloro ativo para se ter uma desinfestação ainda mais eficiente;

- Os antibióticos são mais caros em relação ao uso de cloro ativo, tornando este processo mais oneroso. Outros trabalhos devem ser desenvolvidos tanto com a adição ao meio de cultura como também por tempo de imersão. Diferentes antibióticos devem ser testados como também concentrações a fim de não danificar os explantes e se ter uma melhor desinfecção dos mesmos.

- Com relação ao uso de reguladores vegetais para a multiplicação de brotos o uso de BAP e CIN devem ser testados em outras concentrações avaliando-se tempo efetivo dos subcultivos, variação somaclonal e precocidade do processo de micropropagação como também a análise das plantas micropropagadas em condições de campo;

- Para o enraizamento *in vitro* outros trabalhos com fontes diferentes de reguladores podem ser testadas a fim de aumentar a quantidade de raízes e facilitar no processo de aclimação das mudas.