

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM EXPLANTES
E MICROPROPAGAÇÃO DE BANANEIRA
TETRAPLÓIDE**

SOLANGE TEIXEIRA DE SOUZA GANEM

2008

SOLANGE TEIXEIRA DE SOUZA GANEM

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM EXPLANTES E
MICROPROPAGAÇÃO DE BANANEIRA TETRAPLÓIDE**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semi-Árido, área de concentração em Manejo das Principais Fruteiras no Semi-Árido, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

Orientadora
Prof.^a DSc. Sílvia Nietsche

JANAÚBA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

G195b Ganem, Solange Teixeira de Souza.
Bactérias endofíticas em explantes e micropropagação de
bananeira tetraplóide [manuscrito] / Solange Teixeira de Souza
Ganem. – 2008.
94 f. : il.
Bibliografia : f. 93-94.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Montes Claros – Unimontes, Programa de Pós-Graduação em
Produção Vegetal no Semi-Árido, 2008.
Orientadora: Prof.^a Dra. Sílvia Nietzsche.
1. *Musa* spp. 2. Cultura de tecidos. 3. Tetraplóides. 4.
Reguladores de crescimento. 5. Cultivo *in vitro* I. Nietzsche,
Sílvia. II. Universidade Estadual de Montes Claros. III. Título.

SOLANGE TEIXEIRA DE SOUZA GANEM

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM EXPLANTES E
MICROPROPAGAÇÃO DE BANANEIRA TETRAPLÓIDE**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semi-Árido, área de concentração em Manejo das Principais Fruteiras no Semi-Árido, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA em 31 de julho de 2008.

Prof. DSc. Marlon Cristian Toledo Pereira - UNIMONTES/Janaúba.

Prof.^a DSc. Adelica Aparecida Xavier - UNIMONTES/Janaúba.

DSc. Sebastião de Oliveira e Silva - Embrapa Mandioca e Fruticultura

**Prof.^a DSc. Sílvia Nietsche
UNIMONTES
(Orientadora)**

**JANAÚBA
MINAS GERAIS – BRASIL**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, nosso Pai, por ter permitido a realização deste trabalho juntamente com todas as pessoas que estiveram auxiliando e apoiando. Considero todos os amigos como verdadeiros autores, pois certamente eu não teria completado esta obra sem a ajuda de todos. À Jesus Cristo nosso mestre maior.

À UNIMONTES, todos os seus funcionários e professores.

Ao prof. Mauro, à Penha, Elaine, Alda e Telminha pela ajuda.

Aos funcionários, professores e estagiários do Laboratório de Fitopatologia e Solos que muito auxiliaram; Elizângela, Kelli, Felipe, Fred, Leandro, Magno, Hudson, Danilo, Regina, Edson e Lucivânia.

Aos funcionários, professores e estagiários do Laboratório de Micropropagação de mudas, Gláucia, Márcia, João, Tiago, Renata, Daiane, Elizete, Ana Júlia, Tatiele, Renata Neres, Samira, Danuza, Lidiane e Janaína.

Ao Banco do Nordeste do Brasil S/A, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apóio financeiro ao projeto.

Agradeço ao Dr. Sebastião de Oliveira e Silva, da Embrapa pela sua presença e colaboração.

Agradeço, especialmente, à Sílvia, orientadora do trabalho. Adelica, Marlon e Sidnei pela tolerância, apoio e sustentação como conselheiros.

Aos meus familiares, devo minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	i
GENERAL ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
2.1 A Cultura da Bananeira.....	5
2.2 Uso de Cultivares Resistentes	6
2.2.1 A cultivar Tropical.....	8
2.2.2 A cultivar Galil 18.....	10
2.3 Produção de Mudanças de Bananeira.....	11
2.3.1 Métodos de propagação.....	11
a) Propagação convencional.....	12
b) Fracionamento de rizoma.....	12
c) Propagação rápida <i>in vivo</i>	13
d) Propagação <i>in vitro</i>	13
2.3.2 Mudanças Micropropagadas.....	14
2.4 Métodos de Assepsia.....	16
2.5 Microrganismos Endofíticos	18
2.6 Reguladores de Crescimento.....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
CAPÍTULO I - BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM EXPLANTES DE BANANEIRA TROPICAL E GALIL 18.....	31
RESUMO.....	32
ABSTRACT.....	33
1 INTRODUÇÃO.....	34

2 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4 CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
CAPÍTULO II – MICROPROPAGAÇÃO DAS BANANEIRAS TROPICAL E GALIL 18 SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP.....	
RESUMO.....	59
ABSTRACT.....	60
1 INTRODUÇÃO	62
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	63
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
4 CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
	88

RESUMO GERAL

GANEM, Solange Teixeira de Souza. **Bactérias Endofíticas em Explantes e Micropropagação de Bananeira Tetraplóide**. 2008. 91 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semi-Árido) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG.¹

O trabalho foi realizado no Campus de Janaúba da Universidade Estadual de Montes Claros com o objetivo de avaliar dois protocolos de assepsia e um de multiplicação *in vitro* das cultivares Galil 18 e Tropical bem como identificar em nível de espécie os isolados de bactérias provenientes das contaminações dos ápices caulinares dessas cultivares de bananeira. Os explantes das cultivares foram submetidos a dois protocolos de assepsia DES1 e DES2 e a quatro diferentes concentrações de BAP 1,0, 3,0, 7,0, e 9,0 mg L⁻¹ e mais uma dose testemunha de 5,0 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina. Foram avaliadas as características de porcentagem de contaminação, taxa de multiplicação, número total de explantes, comprimento e diâmetro do pseudocaule das mudas *in vitro* e na fase de aclimatização. As contaminações foram exclusivamente de origem bacteriana. Diferenças significativas foram observadas entre os métodos de assepsia apenas para a ‘Tropical’ ($\chi^2 = 0,0291$), o método de assepsia 2 promoveu o menor índice de contaminação, com média de 7,14%. Nenhum dos doze isolados avaliados apresentou reação de hipersensibilidade. Foram classificados como bactérias do tipo Gram negativas. Sete diferentes espécies foram identificadas: *Salmonella sp*, *Pseudomonas huttiensis*; *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter gergoviae*, *Paenibacillus polymyxa*; *Erwinia chrysanthemi* biovar IV, e *Klebsiella pneumoniae pneumoniae*. Ao final do 4º subcultivo da ‘Tropical’ foram produzidas 281,07 plântulas na concentração de 6,5 mg L⁻¹ de BAP. A maior taxa de multiplicação foi obtida na dose de 7,0 mg L⁻¹, no 2º subcultivo, com média de 5,50 explantes. A ‘Galil 18’ apresentou diferença significativa menor que a testemunha no 2º subcultivo, com taxa multiplicativa média de 1,84 explantes. A análise de desdobramento apresentou efeito significativo ($p \leq 0,05$) das doses sobre o comprimento do pseudocaule das plântulas *in vitro*. Para a ‘Tropical’ foram observados incrementos no comprimento até a dose de 6,5 mg L⁻¹. Em relação ao diâmetro do pseudocaule, a ‘Galil 18’ apresentou incrementos no diâmetro até 5,9 mg L⁻¹ de BAP, enquanto que a ‘Tropical’ demonstrou incrementos lineares da ordem de 0,0241 cm para cada 1,0 mg L⁻¹ de BAP adicionado. Após aclimatização não foram

¹ Comitê Orientador: Silvia Nietsche – UNIMONTES (Orientadora).

observados efeitos significativos para o comprimento do pseudocaule nas plântulas da 'Galil 18'. Na 'Tropical' a dose de $5,5 \text{ mg L}^{-1}$ proporcionou maior crescimento das plântulas, 5,16 cm, trinta dias após a aclimatização. Os resultados do presente estudo demonstraram a grande diversidade de espécies de bactérias e a necessidade de desenvolvimento de protocolos de assepsia específicos para as diferentes cultivares de bananeira. Em relação ao BAP não houve efeito das doses para a maioria das características da 'Galil 18', entretanto doses de BAP entre $6,5$ e $7,0 \text{ mg L}^{-1}$ promoveram a maior produção de mudas e maior taxa de multiplicação *in vitro* na 'Tropical', respectivamente.

GENERAL ABSTRACT

GANEM, Solange Teixeira de Souza. **Endophytic Bacteria in Explants and Micropropagation of Tetraploid Banana**. 2008. 91 p. Dissertation (Master's degree in Plant Production) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, Minas Gerais, Brazil. ¹

The work was carried out at Campus from Janaúba of the Universidade Estadual de Montes Claros with the purpose of evaluating two asepsis protocols and one of multiplication *in vitro* of the cultivars Galil 18 and Tropical as well as to identify, in species level, the isolated of bacteria coming from contaminations of the shoot tip apices of those cultivars. The cultivars' explants were submitted to two asepsis protocols, DES1 and DES2, and to four different concentrations of BAP 1,0; 3,0; 7,0 and 9,0 mg L⁻¹ and one more control dose of 5,0 mg L⁻¹ of 6-benzilaminopurine. The characteristics of contamination percentage, multiplication rate, total number of explants, length and diameter of the pseudostem of the plants *in vitro* and in the acclimatization phase were appraised. The contaminations were exclusively from bacterial source. Significant differences were observed between the asepsis methods just for the Tropical ($\chi^2 = 0,0291$). The method of asepsis 2 provided the smallest index of contamination, with average of 7,14%. None of the twelve evaluated isolated presented hypersensitivity reaction. They were classified as bacteria of the type Gram negatives. Seven different species were identified: *Salmonella sp.*, *Pseudomonas huttiensis*, *Enterobacter clocae*, *Enterobacter gergoviae*, *Paenibacillus polymyxa*; *Erwinia chrysanthemi* biovar IV, and *klebsiella pneumoniae pneumoniae*. At the end of the 4nd subculture of the 'Tropical', 281,07 plantules were produced in the concentration of 6,5 mg L⁻¹ of BAP. The greatest multiplication rate was obtained in the dose of 7,0 mg L⁻¹, in the 2nd subculture, with average of 5,50 explants. Galil 18 presented smaller significant difference than the control in the 2nd subculture, with medium multiplicative rate of 1,84 explants. The unfolding analysis presented significant effect ($p \leq 0,05$) of the doses on the length until the dose 6,5 mg L⁻¹. In relation to the pseudostem diameter, 'Galil 18' presented increments in until 5,9 mg L⁻¹ of BAP, while the 'Tropical' demonstrated lineal increments around 0,0241 cm for each 1,0 mg L⁻¹ of added BAP. After the acclimatization, significant effects were not observed for the pseudostem length in the plantules of 'Galil 18'. In the 'Tropical', the dose of 5,5 mg L⁻¹ provided larger growth in the plantules, 5,16 cm, thirty days after the acclimatization. The results of the present work demonstrated the great

¹ Advisor Committee: Silvia Nietsche – UNIMONTES (Advisor).

diversity of bacteria's species and the need of development of specific asepsis protocols for the different banana cultivars. Concerning to BAP, there was not effect of the doses for most of the characteristics of 'Galil 18'; however, dose between 6,5 and 7,0 mg L⁻¹ promoted the largest production of plants and larger rate of *in vitro* multiplication in the 'Tropical', respectively.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a produção de banana se dá em todos os estados da federação, com uma área de aproximadamente 509 mil hectares e uma produção de 7 milhões de toneladas. Minas Gerais destaca-se em quinto lugar com uma produção, em 2007, de 541.399 toneladas em uma área de 38.561 hectares e rendimento de 14.775 kg ha⁻¹ (IBGE, 2008). Na região Norte de Minas, a produção foi de 227.297 toneladas em uma área de 10.762 hectares e rendimento de 21.120 kg ha⁻¹.

Segundo Souto *et al.* (2001), após testes realizados pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig), a cultura da banana foi introduzida na Região do Norte de Minas Gerais no início da década de 80, onde os primeiros plantios ocorreram pelos produtores do Perímetro Irrigado do Gorutuba, situados em Porteirinha/MG, com a cultivar Nanicão, que sofreu intenso ataque de nematóides, comprometendo a sua viabilidade na região. Esta cultivar foi substituída gradativamente pela 'Prata-Anã' devido a sua grande aceitação, melhor remuneração e qualidade dos frutos.

No Norte de Minas Gerais, a fruticultura tem gerado cerca de 60 mil empregos sendo, 40 mil indiretos e 20 mil empregos diretos com um homem por hectare fixo e dois por contratação temporária (ABANORTE, 2008). A Região tem se despontado como pólo importante da fruticultura nacional, considerando a informação da ABANORTE (Associação dos Bananicultores do Norte de Minas Gerais), são aproximadamente 12 mil hectares de banana atualmente na região. O Norte de Minas Gerais é o principal pólo produtor de banana de Minas Gerais, fornecendo aproximadamente 50% de toda a banana comercializada em 2007 nas unidades da Ceasa-MG (CEASA, 2008). Esta região tem como mercados consumidores os estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Brasília/DF, Minas Gerais e Goiânia/GO (ABANORTE, 2008).

Além da ‘Prata-Anã’ e da ‘Grande Naine’, por exemplo, outras cultivares têm sido implantadas na região com o intuito de diversificar a bananicultura que tem a sua maior área plantada com a ‘Prata-Anã’; solucionar problemas fitossanitários, introduzindo cultivares resistentes às principais pragas, bem como diminuir o alto custo dos insumos e as contaminações ao meio ambiente. Dentre as cultivares resistentes às doenças podemos destacar a ‘Tropical’ do tipo ‘Maçã’, que apresenta resistência ao mal-de-Sigatoka-amarela (*Mycosphaerella musicola* - Leach) e tolerância ao mal-do-Panamá (*Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *Cubense* E. F. (Smith) Snyder & Hansen) e a ‘Galil 18’, que possui resistência ao mal-de-Sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis* - Morelet) e moderada resistência à Sigatoka-amarela (*M. musicola*) (EMBRAPA, 2003; TODA FRUTA, 2007).

Mudas de qualidade que proporcionem eficiência e segurança nos projetos de implantação ou substituição de bananais é um dos principais gargalos da cadeia produtiva da banana. A escolha da muda de qualidade é o primeiro passo para a certeza de sucesso do empreendimento. A muda micropropagada permite alcançar a qualidade desejada, pois tem certificada a qualidade genética e fitossanitária, 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 objetivo de satisfazer as necessidades de material de propagação livre de doenças e de acelerar os métodos convencionais de propagação vegetativa (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Cordeiro e Moreira (2006) reafirmam que o material propagativo é um dos principais problemas técnicos enfrentados pela bananicultura brasileira na atualidade que, segundo os autores, podem ser atribuídas à falha na difusão das informações científicas e tecnológicas ou sua geração.

Em laboratórios de micropropagação, as contaminações causadas por bactérias e fungos (leveduras, principalmente) são as principais causas de perdas de material propagativo, sendo os fungos, *Penicillium* spp; *Cladosporium* spp; *Aspergillus* spp; *Botrytis cinérea* (Pers.); *Alternaria* spp; *Phoma* spp e *Fusarium* spp; bactérias Gram negativas como: *Pseudomonas* spp; *Xanthomonas* spp; *Agrobacterium radiobacter*; *Erwinia* spp; *E. carotovora* (J.R.Jones); dentre outras e Gram positivas como: *Bacillus* spp; *Lactobacillus plantarum*; *Staphylococcus* spp; *Actinomyces* spp. (LEIFERT *et al.*, 1994; PEREIRA *et al.*, 2003).

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

Dentre os produtos utilizados para redução das contaminações durante o processo de micropropagação têm-se o álcool, produtos a base de cloro, os antibióticos, fungicidas (BERNARDI *et al.*, 2004; RIOS, 2006) e os aldeídos (formaldeído) (PARDO *et al.*, 2006).

Diferentes métodos de assepsia utilizados, tanto para banana quanto para outras espécies têm sido testados, uma vez que cada espécie, em vários experimentos, tem demonstrado comportamento diferenciado, resultado provável da influência dos genótipos em relação aos métodos adotados (LIMA e MORAES, 2006; PEREIRA *et al.*, 2003).

Recentemente, inúmeros estudos vêm demonstrando o potencial dos microorganismos que habitam o interior de uma planta, em pelo menos um período do seu ciclo de vida não provocando nenhum dano aparente, sendo designados por microorganismos endofíticos (AZEVEDO *et al.*, 2000) e que eventualmente podem contaminar ou não, meios de cultivo em cultura de tecidos

tem recebido atenção especial. Estes microrganismos possuem um grande potencial ecológico benéfico quando são demonstradas suas aplicações na agricultura no controle biológico (BERNARDES, 2006), no crescimento vegetal (MEHAZ *et al.*, 2001), indução de resistência e síntese de compostos de grande importância biotecnológica (ROMEIRO, 2007).

Atualmente vários trabalhos têm sido conduzidos com o objetivo de isolar, identificar e estudar a diversidade de bactérias endofíticas nos tecidos de várias espécies de plantas e suas interações (TEIXEIRA *et al.*, 2007; FIGUEIREDO *et al.*, 2003; MARIANO *et al.*, 2004). Os gêneros de maior ocorrência são: *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Burkholderia* (MARIANO *et al.*, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2007), *Bacillus* (FIGUEIREDO *et al.*, 2003, TEIXEIRA *et al.*, 2007), *Klebsiella* (MARTÍNEZ *et al.*, 2003).

Um outro aspecto de grande relevância na micropropagação é o uso de fitorreguladores, sendo considerada uma prática indispensável à mesma (HINOJOSA, 2000). O principal objetivo da adição de fitorreguladores é a de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônio nos explantes, sendo as citocininas favoráveis ou até necessárias. Na micropropagação da bananeira o regulador de crescimento mais utilizado é o Benzilaminopurina (BAP), sendo mais comum para o cultivo de meristemas ou ápices caulinares pequenos na fase de estabelecimento e na fase de multiplicação *in vitro* (GRATTAPAGLIA e MACHADO 1998; JOSEKUTTY *et al.*, 2003; BERNARDI *et al.*, 2004; BRAGA *et al.*, 2000).

Os principais objetivos do presente trabalho foram a adequação de doses de BAP, estabelecimento de metodologias de assepsia de ápices caulinares e identificação, no nível de espécies, dos microrganismos isolados das cultivares Tropical e Galil 18.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A Cultura da Bananeira

O Brasil desponta com uma produção de banana de 7 milhões de toneladas, dentre os maiores produtores estão os estados da Bahia, São Paulo, Santa Catarina, Pará e Minas Gerais, com uma área de 509 mil hectares (TABELA 1). Minas Gerais destaca-se em quinto lugar com uma produção em 2007 de 541.399 toneladas em área de 38.561 hectares e rendimento de 14.775 kg ha⁻¹ ano⁻¹ (IBGE, 2008). Porém estes rendimentos não refletem a realidade dos perímetros irrigados que possuem melhor nível tecnológico, onde as cultivares tipo Prata podem alcançar 30 ton ha⁻¹ ano⁻¹, as do subgrupo Cavendish em torno de 45 ton ha⁻¹ ano⁻¹ (CORDEIRO *et al.*, 2006). A banana é uma das frutas de consumo “in natura”, mais importantes no mundo, detém o quarto lugar em termos de importância alimentar. Uma banana supre cerca de um quarto da quantidade total de vitamina C recomendada por dia para uma criança, é rica em carboidratos (24%), em fibras (6-7%), em minerais como Ca, Mg, K, P e Fe, além das vitaminas A e B (AGRIANUAL, 2005). O consumo anual “per capita” no Brasil é de 30 kg (MOREIRA e CORDEIRO, 2006).

A localização da região Norte-Mineira é altamente favorável com relação à distância dos mercados consumidores, pois se encontra entre os mercados da região Sudeste e Sul e os mercados da região Nordeste do Brasil, tendo o escoamento da produção facilitado e outro aspecto a considerar está relacionado às condições climáticas da região.

Segundo Borges *et al.* (2000), a temperatura ótima para o desenvolvimento de bananeiras comerciais está em torno de 28 °C. O Norte de Minas Gerais por se caracterizar como região de semi-árido tem também facilitado o manejo das principais doenças que acometem a cultura. As

condições climáticas associadas ao manejo da irrigação têm proporcionado baixa incidência de doenças, oferta regular do produto e boa qualidade dos frutos.

TABELA 1- Área plantada (ha), produção (t) e rendimento médio (kg ha⁻¹) nos principais Estados produtores de banana.

Estados	Ano/2007		
	Área (ha)	Produção (t)	Rendimento Médio (kg ha ⁻¹)
Bahia	84.548	1.258.036	14.880
São Paulo	50.280	1.084.841	21.576
Santa Catarina	30.971	618.895	20.296
Pará	44.223	567.811	12.878
Minas Gerais	38.561	541.399	14.775
Total	248.583	4.070.982	16.881

Fonte IBGE 2007.

2.2 Uso de Cultivares Resistentes

A produção de banana em larga escala tem sido possível por meio de um controle sistemático, geralmente químico, das principais doenças que infectam os bananais (FAO, 2003). 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 multicinctus* (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 pragas da bananeira no Brasil e no mundo.

Com o crescimento da produção de banana em todo mundo, a intensificação da comercialização gerou um aumento no uso de insumos e de agroquímicos, com o intuito de ampliar a produtividade e a redução das perdas por pragas e doenças. Essa utilização extensiva de produtos químicos nas lavouras tem levado à contaminação do meio ambiente; pela eliminação de resíduos, por exemplo, e diversos efeitos negativos no ambiente e na população têm sido relatados. Desde o início dos anos noventa tem se observado um aumento da sensibilização da opinião pública diante das questões sócio-ambientais (FAO, 2003).

O aumento dos preços de insumos, como fertilizantes, agroquímicos têm levado os empresários do setor agrícola a buscarem meios alternativos de redução de custos e aumento da sustentabilidade do agronegócio (FAO, 2003). 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). As cultivares

Japira e Vitória foram geradas a partir do cruzamento entre as cultivares Pacovan (AAB) como parental feminino e M53 (AA) como parental masculino. Com isso a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária tem trabalhado com o desenvolvimento de cultivares resistentes e tolerantes às principais doenças, lançando várias cultivares e avaliando acessos como a Caipira, Prata Zulu, Ouro, Thap Maeo, PVO3 e PC 42-01. Outro exemplo foi a cultivar Pacovan Ken, novo híbrido tipo “Prata”, resistente à Sigatoka-negra, gerado na Embrapa a partir da cultivar Pacovan (EMBRAPA, 2004).

A Fundação Hondurenha de Investigação Agrícola iniciou o programa de melhoramento de musáceas em 1959 e desde então vem realizando trabalhos de desenvolvimento de cultivares resistentes. Diplóides melhorados com características agrônômicas de produção comercialmente viáveis e resistência às principais doenças era o foco do programa (MORÁN, 2006). O diplóide SH-3142 foi utilizado como progenitor masculino dos híbridos FHIA-01, FHIA-18, FHIA-21 e FHIA-25. O grupo FHIA (01, 02, 03, 18, 20 e 21) se mostra altamente tolerante ao ataque do fungo *M. fijiensis* (EMBRAPA, 2004).

2.2.1 A cultivar Tropical

A cultivar Tropical é um híbrido tetraplóide (AAAB), gerado na Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas/BA, oriunda do cruzamento da cultivar Yangambi nº 2 com o diplóide (AA) M53. A maioria de suas características é semelhante às da cultivar Maçã, tanto no desenvolvimento quanto no rendimento. Apresenta-se superior a esta em relação às doenças sendo resistente à Sigatoka-amarela (*M. musicola*) e tolerante ao mal-do-Panamá (*F. oxysporum* f. sp. *cubense*). Suscetível à Sigatoka-negra (*M. fijiensis*) e moderadamente suscetível à Broca-do-rizoma (*C. sordidus*) e nematóides. A cultivar Tropical foi avaliada pela Embrapa na região de Petrolina/PE, Cruz das

Almas/BA, no ecossistema Trópico Semi-Úmido e no Semi-Árido, sob irrigação. Possui porte semelhante ao da ‘Maçã’, de 3,0 m a 3,5 m podendo ser plantada com os mesmos espaçamentos adotados para esta cultivar (3,0 m x 2,0 m ou 4,0 m x 2,0 m x 2,0m em fileira dupla). Alcança produtividades semelhantes, 10 a 30 ton ha⁻¹, dependendo do nível tecnológico adotado e das condições edafoclimáticas da região em que a cultivar for implantada. O seu ciclo é de 590 dias (plantio à colheita). Exigente em solos profundos para seu bom desenvolvimento, apresentando bom perfilhamento. Os frutos maduros apresentam casca amarela, polpa esbranquiçada e sabor doce com baixa acidez, semelhante à ‘Maçã’. As análises físico-químicas (TABELA 2) mostraram que o teor de Sólidos Solúveis Totais, acidez (Acidez Total Titulável) e a relação SST/ATT foram semelhantes às da ‘Maçã’, o que poderia facilitar a adoção e preferência pelos produtores e consumidores (EMBRAPA, 2003).

TABELA 2 - Análise físico-química da cultivar Tropical comparada com a cultivar Maçã. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA, 2003.

Variedade	SST (° Brix)	pH	ATT (%)	SST/ATT
Tropical	25,8	4,31	0,55	46,9
Maçã	26,8	4,33	0,64	41,9

SST: Teor de sólidos solúveis totais; ATT: acidez total titulável, em porcentagem de ácido málico; SST/ATT: relação Brix/acidez.

Fonte: Embrapa/2003.

2.2.2 A cultivar Galil 18

Cultivar tetraplóide do grupo AAAB, originada da FHIA 18 que é um híbrido gerado pela Fundação Hondurenha de Investigação Agrícola (FHIA), produz frutos tipo Prata, com características externas semelhantes aos frutos da cultivar Prata-anã, sendo rústica e resistente a doenças. Segundo a FHIA, a maioria das suas características são semelhantes à cultivar FHIA 18 (TODA FRUTA 2007, FHIA).

Em sua morfologia apresenta porte médio a alto, com 3,0 m a 4,0 m de altura; pseudocaulo vigoroso e resistente ao acamamento, suas folhas são decumbentes. O período que compreende do plantio à floração é de 270 a 300 dias, dependendo do manejo, das condições climáticas, irrigação e época do ano. A formação do cacho para colheita ocorre entre 105 e 119 dias, dependendo também da época do ano, a segunda floração cerca de 500 a 600 dias após o plantio. Possui cacho médio, cresce a um ângulo de 45° do pseudocaulo, alcançando 20 a 35 Kg de peso em condições normais de produção, com 120 a 160 frutos por cacho em 8 a 10 pencas; os frutos são retos e de tamanho médio (16 a 20 cm) e quando maduros de coloração amarelo vivo. Resistente ao mal-do-Panamá (*F. oxysporum* f. sp. *cubense*), moderadamente resistente à Sigatoka-negra (*M. fijiensis*) e ao nematóide *Radophilus similis*, moderadamente suscetível à Sigatoka-amarela (*M. musicola*).

Em condições de manejo adequado da irrigação, adubação e manejo cultural, as plantas são vigorosas, crescem bem em altitudes de 0 a 1000 m do nível do mar, em maiores altitudes o desenvolvimento é lento. Os solos devem ser bem drenados sem risco de encharcamento, preferencialmente solos com textura média. A precipitação média deve ser bem distribuída (2.000 mm ano⁻¹) ou adotar irrigação e a temperatura média ideal de cultivo é de 28 °C, sendo tolerante a frio. A densidade de plantio é de 1600 plantas por hectare; com

adubação de acordo com análise do solo. A desfolha deve ser quinzenalmente e o desbaste quatro meses após o plantio.

2.3 Produção de Mudanças de Bananeira

A produção de mudas de 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). Essas 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. multicinctus*, *Meloidogyne* spp, e *P. coffeae*); o moko, *R. solanacearum* raça 2 (*P. solanacearum*); a Podridão-mole (*Erwinia*. spp, *E. Musa* e *E. carotovora* subsp. *carotovora*) e viroses como BBTV (*Banana bunchy top virus*) e CMV (*Cucumber mosaic virus*) (CORDEIRO e MESQUITA, 2000).

2.3.1 Métodos de propagação

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:

e) Propagação convencional

Na propagação convencional, diversos tipos de mudas podem ser utilizados. As 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. 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.

f) Fracionamento de rizoma

Após a retirada do rizoma do campo, as raízes, partes necrosadas e 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. Moreira (1999) ressalta a importância do peso 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, para cultivares do subgrupo Prata este autor sugere um acréscimo de 30% a 40% no tamanho do rizoma.

g) 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.

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, expondo o meristema vegetativo. Faz-se fermento do meristema com lâmina desinfetada com álcool. 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.

h) Propagação *in vitro*

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 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 agrônomicas. 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; BALLESTERO, 2002).

2.3.2 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 e MACHADO, 1998). Deve-se ter um cuidado especial quanto à escolha da muda (planta-matriz), que deverá estar indexada e que dará origem a um explante livre de problemas fitossanitários que normalmente são propagados através de mudas do tipo convencional, como o mal-do-Panamá (*F. oxysporum* f. sp. *cubense*); a broca-do-rizoma (*C. sordidus*); os nematóides (*R. similis*, *H. multicinctus*, *Meloidogyne* spp, e *P. coffeae*); o moko-da-bananeira, *R. solanacearum* (*P. solanacearum*) raça 2; a Podridão-mole (*Erwinia* spp, *E. musea* e *E. carotovora* subsp. *carotovora*) e viroses como BBTV (*Banana bunchy top virus*) e CMV

(*Cucumber mosaic virus*) (CORDEIRO e MESQUITA, 2000; SOUZA *et al.*, 2000; CORDEIRO e MATOS, 2000).

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 suprir as necessidades de material de propagação livre de doenças e de acelerar os métodos convencionais de propagação vegetativa (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

No Brasil, atualmente, 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 investigação, 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.

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).

Diversos fatores devem ser controlados para que se obtenha êxito no processo de micropropagação, como o material propagativo a ser utilizado (explante), o genótipo da planta, os meios de cultivo, as condições ambientais,

variações somaclonais, os reguladores de crescimento utilizados e os métodos de assepsia (SOUZA e PEREIRA, 2007; SANTOS e RODRIGUES, 2004; LAKSHMANAN *et al.*, 2006).

2.4 Métodos de Assepsia

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 Leifet *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, e 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 e ZIMMERMANN, 2006).

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) 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 e ZIMMERMANN, 2006) e o formaldeído (PARDO *et al.*, 2006), que possui a capacidade de inativar

proteínas, visto que forma ligações cruzadas com vários grupos funcionais nas proteínas (TORTORA *et al.*, 2000). Outros produtos são relatados como o cloreto de mercúrio (HgCl_2) que é de difícil eliminação dependendo do tecido (KALIMUTHU *et al.*, 2006); o ácido clorídrico; o cloreto de benzalcônio; o peróxido de hidrogênio, mertiolate; isopropanol e triquartenário de amônio (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Cid e Zimmermann, 2006, descrevem, ainda produtos como o 8-HQS (8-hidroxi-quinolinol-sulfato), Virazole® (1-B-D-ribofuranosil-1,2,4-triazole-3-carboxamida) e PPM (Plant Preservativ Mixture), usados em cultura de tecidos de inúmeras espécies.

Os métodos de assepsia mais utilizados na fase de estabelecimento de bananeiras são imersões em álcool em solução a 70 % (ZAIDAN *et al.*, 1999; BIANCHI *et al.*, 2003) ou 90 % (RIOS, 2006) produto comercial, com imersões que variam de trinta segundos a cinco minutos, após este procedimento outra imersão em solução de hipoclorito de sódio ou cálcio (ASSAREH e SARDABI, 2005) em concentrações que variam de 1% a 2,5% de cloro ativo, adicionado Tween 20 e mantidos sob agitação nesta solução por períodos que variam de dez a trinta minutos e três lavagens com água destilada e esterilizada no final do processo (DOMINGUES *et al.*, 1995; BRAGA *et al.*, 2001; SÁ e BRAGA, 2001; LIMA e MORAES, 2006; COSTA *et al.*, 2006). Outros agentes de desinfestação podem ser utilizados como o fungicida Derosal® 500 SC (Benzimidazol) em concentrações que variam de 3,3% a 6,6% por 20 minutos (NIETSCHE, *et al.*, 2006) ou adicionados ao meio de cultura, como benomyl (Benlate) nas concentrações 100, 200 e 300 mg L⁻¹, bactericidas ou bacteriostáticos como os antibióticos rifampicina (100, 200 e 300 mg L⁻¹) e cefotaxima (200, 300 e 400 mg L⁻¹) também são aplicados com imersão por 20 minutos dos explantes já reduzidos (CARNEIRO *et al.*, 2000).

De acordo com diversos trabalhos realizados, diferentes métodos de assepsia são empregados demonstrando que, para cada cultivar de banana, são

necessários ajustes para melhorar a eficiência no processo de desinfestação (BRAGA *et al.*, 2001; CARNEIRO e CHAVES, 1999; HABIBA *et al.*, 2002; MEDINA, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2000).

2.5 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 e 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). Este contexto tem também estimulado a busca de alternativas que proporcionem uma adequação a uma agricultura sustentável e natural (MARIANO *et al.*, 2004).

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* (MARIANO *et al.*, 2004; 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 (LAÇAVA *et al.*, 2004). A espécie *Bacillus subtilis* promoveu o incremento na nodulação de raízes e no crescimento de plantas de feijoeiro (LAZZARETTI e 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.

Os estudos recentes indicam a importância dos microrganismos endofíticos na agricultura, dado o potencial que possuem na resolução de inúmeras questões como minimização do uso de fertilizantes e defensivos químicos, diminuição dos custos de produção, biorremediação, além da sustentabilidade ambiental.

2.6 Reguladores de Crescimento

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 de crescimento uma substância química sintética que compartilha com os hormônios vegetais a maioria de suas características. As principais classes de fitorreguladores empregados na micropropagação são as auxinas, dentre elas os mais utilizados são o ácido naftalenoacético (ANA), o ácido indolacético (AIA) e o ácido indolbutírico (AIB) (HINOJOSA, 2000). 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 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 (SOUZA e 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; NETO *et al.*, 2006; LEDO *et al.*, 2004), e *in vitro*, na regeneração de calos, na brotação de gemas laterais, no enraizamento entre inúmeras outras

aplicações (COSTA, *et al.*, 2006; HINOJOSA, 2000; UTINO *et al.*, 2001; LEMOS *et al.*, 2001; SOUZA e PEREIRA, 2007; WEBER *et al.*, 2000).

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.*, 2001b), 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; JOSEKUTTY *et al.*, 2003; 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 do comprimento do broto à medida que aumentam os níveis de BAP (COSTA *et al.*, 2006).

Oliveira *et al.*, 2001 em experimento com 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 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).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABANORTE - Associação dos Bananicultores do Norte de Minas Gerais. Disponível em: <<http://www.abanorte.com.br/contact-info>>. Acesso em: 05 jan. 2008.

AGRIANUAL 2005. Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira. 2005. p. 220-229.

ASSAREH, H. M.; SARDABI, H. Macropropagation and micropropagation of *Ziziphus spina-christi*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 5, p. 459-465, 2005.

AZEVEDO, J. L. *et al.* Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 3, n. 1, 2000.

BALLESTERO, S. **Banano**. 2002. CD-ROM.

BORGES, A. L.; SOUZA, L. S.; ALVES, E. J. Exigências edafoclimáticas. In: CORDEIRO, Zilton José Maciel (Org.). **Banana. Produção**: aspectos técnicos. Brasília: EMBRAPA, 2000, p. 17-23.

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

BERNARDI, W. F. *et al.* Micropropagação de baixo custo em bananeira cv. maçã em meios com diferentes fontes de carbono e avaliação da performance em campo das mudas produzidas. 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=>>. Acesso em: 23 out. 2007.

BIANCHI, V. J. *et al.* Estabelecimento *in vitro* de marmeleiro: efeito do tipo de explante e tempo de imersão em hipoclorito de sódio. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, n. 2, p. 177-179, 2003.

BRAGA, M. F; LISEI DE SA, M. E; 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. *et al.* 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**, Goiânia, v.29, n.2, p. 89-94, 1999.

CARNEIRO, M. F. *et al.* Avaliação de produtos na descontaminação de explantes de banana (*Musa* AAB cv. MAÇÃ). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.30, n.1, p. 29-35, 2000.

CEASA – CENTRAL DE ABASTECIMENTO S/A. Disponível em: <<http://minas.ceasa.mg.gov.br/>>. Acesso em: 10 mar. 2008.

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

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

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

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

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P. Doenças fúngicas e bacterianas. In: CORDEIRO, Zilton José Maciel (Org.). **Banana. Fitossanidade**. Brasília: EMBRAPA, 2000. p. 15-20.

CORDEIRO, Z. J. M.; MOREIRA, R. S. A bananicultura brasileira. In: XVII REUNIÃO INTERNACIONAL ACORBAT, 2006, Joinville. **Anais...** Joinville: Ed. Eliséo Soprano, 2006. v. 1, p. 36-47.

COSTA, F. H. S. et al. 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.

DINIZ, J. D. N. *et al.* Absorção de micronutrientes por explantes de bananeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 8, p. 1385-1391, 1999.

DOMINGUES, E. T.; NETO, A. T.; MENDES, B. M. J. Cultura de ápices caulinares de *Musa* sp, var. Maçã: estabelecimento, micropropagação e enraizamento *in vitro*. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 52, n. 2, p. 387-394, 1995.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Embrapa Mandioca e Fruticultura. **Banana Tropical**: variedade tipo Maça tolerante ao mal-do-Panamá. Brasília: EMBRAPA, 2003 (Circular técnica).

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Embrapa Mandioca e Fruticultura. **Pesquisas revelam variedades de banana tolerantes a doenças**. Disponível em: <<http://www.embrapa.br>>. Acesso em: 23 out. 2007.

FAO. ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO. Estudos FAO Productos Básicos. **La economía mundial del banano 1985-2002**. FAO Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/007/>>. Acesso em: 15 mar. 2007.

FHIA – FUNDAÇÃO HONDUREÑA DE INVESTIGACIÓN AGRÍCOLA. **Banano FHIA-18**. Cortes, p.1-4. Série Híbridos FHIA. (Circular técnica).

FIGUEIREDO, J. E. F. *et al.* Caracterização molecular de microrganismos isolados do ecossistema agrícola do cerrado. **Comunicado Técnico 66**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 2003.

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.

GERRA, M. P. *et al.* Somatic embryogenesis is in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. **Fisiologia Vegetal**, v. 13, n.2, p. 117-128, 2001

HABIBA, U. *et al.* Endogenous bacterial contamination during *in vitro* culture of table banana: identification and prevention. **Plant Tissue Culture**, v. 2, n.12, p. 117-124, 2002. Disponível em: <<http://www.bapctb.org/ptc/Full-article/ptc12-2-04pdf>>. Acesso em: 07 dez. 2007.

HINOJOSA, G. F. Auxinas. In: CID, Luis Pedro Barreto (Ed.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: EMBRAPA, 2000. 180 p.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 jan. 2008.

JOSEKUTTY, P. C.; CORNELIUS, S. S.; KILAFWASRU, T. N. Micropropagation of four banana cultivars in micronésia. **Micronésia Supplement**, v. 7, p. 77-81, 2003. Disponível em: <<http://www.uog.edu/up/micronesica/abstract-supp6-7/pdfs7/77-81Josekutty.pdf>>. Acesso em: 08 dez. 2007.

KALIMUTHU, K.; SARAVANAKUMAR, M.; SEINTHILKUMAR, R. *In vitro* micropropagation of *Musa sapientum* L. (Cavendish Dwarf). **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 9, p. 1106-1109, 2006. Disponível em: <<http://www.bioline.org.br/request.?jb07191>>. Acesso em: 22 mar. 2008.

LAZZARETTI, E.; MELO, I. S. Influência de *Bacillus subtilis* na promoção de crescimento de plantas e nodulação de raízes de feijoeiro. **Plantas e Nodulação de Raízes de Feijoeiro**, Jaguariúna, 2005. Boletim Embrapa.

LAKSHAMANAN, V.; VENKATARAMAREDDY, S. R.; NEELWARNE, B. Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of banana using RAPD and ISSR markers. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 10, n. 1, 2006.

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.

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. *et al.* 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.

LEMOS, E. E. P. Ácido Abscísico. In: CID, Luis Pedro Barrueto (Ed.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: EMBRAPA, 2000. 180 p.

LEMOS, E. E. P. *et al.* Micropropagação de clones de banana cv. terra em biorreator de imersão temporária. 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci>>. Acesso em: 23 out. 2007.

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.

MARIANO, R. L. R. *et al.* Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais...** Recife: 2004, v. 1, p. 89-111.

MARTÍNEZ, L. *et al.* Diazotrophic bactéria associated with banana (*Musa* spp.). **Plant and Soil**, n. 257, p.35-47, 2003.

MATSUMOTO, K. Giberelinas. In: CID, Luis Pedro Barrueto (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, 2003.

MORÁN, J. F. A. Híbridos de banana desenvolvidos pela FHIA. In: XVII REUNIÃO INTERNACIONAL ACORBAT 2006, Joinville. **Anais...** Joinville: Ed. Eliséo Soprano, 2006, v. 1, p. 173-177.

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

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

NIETSCHKE, S. *et al.* Estabelecimento *in vitro* de explantes de três cultivares de bananeira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.3, p. 989-991, 2006.

NETO, U. R. M.; 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.

OLIVEIRA, R. P. *et al.* *In vitro* conservation of diploid banana accessions. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 2, p. 245-249, 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 disinfestation methods for *in vitro* cultivation of epiphyte orchids from southern Brazil. **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 24, n.2, p. 217-220, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/hb/v24n2/19.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2008.

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.

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.

RIOS, S. A. **Comprimento de explantes e protocolos de assepsia para micropropagação de bananeira (*Musa sp.*) 'Prata Anã'**. Janaúba: Universidade Estadual de Montes Claros. 2006. 36 p.

REDBIO-EMBRAPA LABORATÓRIOS. Disponível em: <<http://www.cnpt.embrapa.br/redviobr/laboratórios>>. Acesso em: 20 mar. 2008.

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

ROMEIRO, R. S. Indução de resistência em plantas SAR e ISR. In:_____. **Controle biológico de doenças de plantas**. Viçosa: UFV, 2007. 269p. cap.4.

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.

SANTOS, C. C. C.; RODRIGUES, P. H. Variação somaclonal em mudas micropropagadas de bananeira, cultivar pacovan. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 2, p. 201-105, 2004.

SILVA, S. O. *et al.* 2002 BUCHENER Melhoramento genético de fruteiras. In: BRUCKNER, Cláudio Horst (Ed.). **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa: UFV, 2002. 422 p. cap. 4.

SOUTO, R. F.; RODRIGUES, M. G. V.; MENEGUCCI, J. L. P. Efeito da retirada da inflorescência masculina na precocidade da colheita e produção da bananeira 'prata-anã' sob irrigação na região norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 257-260, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v23n2/7960.pdf>>. Acesso em: 07 dez. 2007.

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, cap. VII.

SOUZA, A. S.; CORDEIRO, Z. J. M.; TRINDADE, A. V. Produção de mudas. In: CORDEIRO, Zilton José Maciel. (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.

TEIXEIRA, M. A. *et al.* Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovariedades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 42, n.1, p. 43-49, 2007.

TODA FRUTA. Perguntas relativas às variedades. Disponível em: <http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=15851>. Acesso em: 07 dez. 2007.

TORTORA, G. J. *et al.* Controle do crescimento microbiano. In: _____. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000, p. 181-206, cap. 7.

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.

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**, Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente. n. 16, 2003. 29 p.

ZAIDAN, H. A. *et al.* Comportamento fisiológico *in vitro* de bananeira (*Musa* sp., AAA e AAB) cvs. nanica e prata anã: influência de diferentes níveis de potássio. **Scientia Agrícola**. Piracicaba, v. 56, n. 2, 1999. Disponível em: <<http://www.scielo.br/>>. Acesso em: 17 mar. 2008.

CAPÍTULO I

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM EXPLANTES DE BANANEIRA
TROPICAL E GALIL 18**

RESUMO

GANEM, Solange Teixeira de Souza. **Bactérias Endofíticas em Explantes de Bananeira Tropical e Galil 18**. 2008. Cap. 1, p. 31-57 Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semi-Árido) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG. ¹

O trabalho foi realizado no Campus de Janaúba da Universidade Estadual de Montes Claros com o objetivo de avaliar dois métodos de desinfestação e identificar em nível de espécie os isolados de bactérias provenientes das contaminações dos ápices caulinares das cultivares de bananeira Tropical e Galil 18. Os explantes foram submetidos a dois protocolos de assepsia DES1 e DES2. Após limpeza mecânica os explantes de 3,0 cm de comprimento foram inoculados em tubos de ensaio com 10 mL de meio MS. As avaliações para identificação das contaminações foram realizadas diariamente e de forma visual. A presença de colônias nos tubos contaminados foram isoladas e submetidas aos testes de Reação de Hipersensibilidade (HR), Coloração de Gram e identificação da espécie por meio do teste de perfil de ácidos graxos por Cromatografia Gasosa. O delineamento foi inteiramente casualizado, com duas cultivares, dois métodos de assepsia e 14 repetições. Os dados foram transformados em percentagem e submetidos à estatística não paramétrica pelo teste do Qui-quadrado (χ^2). As contaminações foram exclusivamente de origem bacteriana. Diferenças significativas foram observadas entre os métodos de assepsia apenas para a cultivar Tropical ($\chi^2=0,0291$). O método de assepsia 2 promoveu o menor índice de contaminação, em média de 7,14 %. Não foi observada reação de hipersensibilidade em nenhum dos doze isolados obtidos sendo que todos foram classificados como bactérias do tipo Gram negativa. Sete diferentes espécies endofíticas foram identificadas: *Salmonella sp*; *Pseudomonas huttiensis*; *Enterobacter cloacae*; *Enterobacter gergoviae*; *Paenibacillus polymyxa*; *Erwinia chrysanthemi* biovar IV e *Klebsiella pneumoniae pneumoniae*. Os resultados do presente estudo demonstraram a grande diversidade de espécies de bactérias endofíticas e a necessidade de desenvolvimento de protocolos de assepsia específicos para as diferentes cultivares de bananeira.

Palavras-chave: *Musa* spp., cultura de tecidos, tetraplóides.

¹ Comitê Orientador: Silvia Nietsche – UNIMONTES (Orientadora).

ABSTRACT

GANEM, Solange Teixeira de Souza. **Endophytic Bacteria in Explants of Banana Tropical and Galil 18**. 2008. p. 31-57 Dissertation (Master's degree in Plant Production) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, Minas Gerais, Brazil. ¹

The work was carried out at Campus from Janaúba of the Universidade Estadual de Montes Claros with the purpose of evaluating two desinfestation methods and identifying, in level of species, the isolated coming from bacteria of the contaminations of the shoot tip apices of the cultivars “Tropical” and “Galil 18”. The explants were submitted to two asepsis protocols DES1 and DES2. After the mechanical cleanup, the explants of 3,0 cm of length were inoculated in essay tubes with 10 mL of MS medium. The evaluations to identify the contaminations were accomplished daily and in a visible way. The presence of colonies in the polluted tubes was isolated and submitted to tests of Hypersensitivity Reaction (HR), coloration of Gram and identification of the species through the test of profile of fatty acids by Gas Chromatography. The design was entirely randomized, with two cultivars, two asepsis methods and 14 repetitions. The data were transformed in percentage and submitted to the no parametric statistics by the Qui-square test. The contaminations were exclusively from bacterial source. Significant differences were observed between the asepsis methods just for cultivar Tropical ($\chi^2 = 0,0291$). The method of asepsis 2 provided the smallest index of contamination, on average of 7,14%. Hypersensitivity reaction was not observed in none of the twelve obtained isolated and all were classified as bacteria of the type Gram negative. Seven different endophytic species were identified: *Salmonella sp.*; *Pseudomonas huttiensis*; *Enterobacter clocae*; *Enterobacter gergoviae*; *Paenibacillus polymyxa*; *Erwinia chrysanthemi* biovar IV and *klebsiella pneumoniae pneumoniae*. The results of the present study demonstrated the great diversity of bacteria's species and the need of development of specific asepsis protocols for the different banana cultivar.

Key-word: *Musa* spp., tissues culture, tetraploids.

¹ Comitê Orientador: Silvia Nietsche – UNIMONTES (Orientadora).

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a banana é produzida em todos os Estados, com uma área de aproximadamente 509 mil hectares e uma produção aproximada de sete milhões de toneladas. O Estado de Minas Gerais destaca-se em quinto lugar com uma produção, em 2007, de 541.399 toneladas em área de 38.561 hectares e um rendimento de 14.775 kg ha⁻¹ (IBGE, 2008).

A escolha da muda de qualidade é o primeiro passo para a certeza do sucesso do empreendimento. A muda micropropagada, produzida por cultura de tecidos, permite alcançar a qualidade desejada; pois quando de boa procedência, tem certificada a qualidade genética e fitossanitária, além do considerável aumento do número de plantas dentro de curto espaço de tempo (SOUZA *et al.*, 2000). No ano de 2005, foi publicada a Instrução Normativa N° 24, com objetivo de fixar diretrizes básicas a serem seguidas na produção, comercialização e utilização de mudas, em todo o território nacional, visando à garantia de sua identidade e qualidade (BRASIL, 2008). Apesar disso, ainda há uma grande demanda por mudas de qualidade que proporcionem eficiência e segurança nos projetos de implantação de áreas de banana.

O uso da micropropagação em âmbito comercial já é realidade em diversos países. Os laboratórios comerciais trabalham com objetivo de satisfazer as necessidades de material de propagação livre de doenças e acelerar os métodos convencionais de propagação vegetativa (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Perdas de 20% a 55% na micropropagação foram relatadas por Leifet *et al.* (1994) e podem inviabilizar a micropropagação comercial de mudas de bananeiras, elevando sobremaneira os custos de produção. Com objetivo de reduzir perdas, diferentes agentes anti-sépticos têm sido aplicados na micropropagação com grande importância no estabelecimento dos explantes.

Dentre os produtos utilizados para redução de contaminações durante o processo de micropropagação tem-se o álcool, o cloro (ASSAREH e SARDABI, 2005; ODUTAYO *et al.*, 2007), o antibiótico (WOJTANIA *et al.*, 2005) e os fungicidas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Os antibióticos têm sido utilizados em grande escala em laboratórios de micropropagação e em meios de cultivo ou ainda em soluções para imersão dos explantes para controlar o crescimento bacteriano (HABIBA *et al.*, 2002). Os fungicidas sistêmicos de ação erradicante também são utilizados de forma satisfatória no controle de fungos (CID e ZIMMERMANN, 2006; KIMATI, 1995). Outros produtos têm sido utilizados em menor escala, como é o caso do formaldeído (PARDO *et al.*, 2006) que atua inativando proteínas nas células em função das ligações cruzadas covalentes.

Há poucos relatos na literatura sobre a caracterização das bactérias endofíticas na cultura da bananeira. Weber e Freire (2003) observaram que a espécie *B. 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.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de dois métodos de desinfestação de explantes na fase de estabelecimento no cultivo *in vitro* e identificar, em nível de espécie, os isolados de bactérias provenientes das contaminações dos explantes das cultivares de banana ‘Tropical’ e ‘Galil 18’.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Em 23 de março de 2007, mudas do tipo chifre das bananeiras ‘Galil 18’ e ‘Tropical’ foram retiradas de pomar comercial e do matrizeiro da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado de Minas Gerais (EPAMIG/CTNM), localizados nos municípios de Porteirinha e Nova Porteirinha, Minas Gerais, respectivamente. Após a seleção das mudas, retiraram-se as bainhas foliares e parte dos rizomas. Os explantes com 10 cm de comprimento foram mantidos em água destilada e, em seguida conduzidos ao laboratório de Cultura de Tecidos e Células Vegetais da Universidade Estadual de Montes Claros. No laboratório, o comprimento dos explantes foi reduzido em 50% e foram aplicados, de forma individualizada, dois diferentes protocolos de assepsia. O primeiro tratamento constou da seguinte seqüência: DES 1: solução de Sulfato de Estreptomicina (SSEP), $0,3 \text{ g L}^{-1}$, por 20 minutos, solução fungicida de Derosal 500 SC (Benzimidazol) (SFD), na concentração de 0,6% (vv) por 20 minutos, álcool comercial (AC) a 92,8% por 60 segundos e agitação por 25 minutos em solução de cloro ativo na concentração de 2,5% (pv), adicionada de três gotas de Tween 20 para um litro de solução. O segundo tratamento, DES 2, consistiu da imersão em Solução de Sulfato de Estreptomicina $0,3 \text{ g L}^{-1}$, por 20 minutos, solução fungicida de Derosal, na concentração de 0,6% por 20 minutos, álcool comercial 92,8%, por 60 segundos, solução em agitação com formaldeído a 7,99%, por sete minutos e em seguida agitação por 25 minutos em solução de cloro ativo 2,5% (pv), adicionada de três gotas de Tween 20 para um litro de solução. Em ambos os tratamentos a tríplice lavagem com água estéril e deionizada foi realizada entre cada etapa do processo.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2×2 , sendo duas cultivares de banana e dois métodos de assepsia, com 14 repetições cada método.

Após os tratamentos, os explantes foram conduzidos à câmara de fluxo laminar para finalizar o processo de limpeza mecânica. Nesta fase, os explantes destinados ao protocolo DES 2 foram flambados com álcool 92,8 % e, posteriormente, com o auxílio de bisturi, o comprimento de todos os explantes foram reduzidos a 3 cm de comprimento.



FIGURA 1 - Introdução de ápices caulinares em câmara de fluxo laminar de bananeira ‘Tropical’ e ‘Galil 18’.

Os explantes foram introduzidos em tubos de ensaio de 15 cm com 10 mL do meio MS (MURASHIGUE e SKOOG, 1962) suplementado com sacarose (30 g L⁻¹), carvão ativado (2,5 g L⁻¹), Vitaminas do White (WHITE, 1943) (10 mg L⁻¹), Mio inositol (0,1 g L⁻¹) e Ágar (7 g L⁻¹). Na fase de estabelecimento, os explantes permaneceram em ambiente totalmente escuro durante sete dias e, em seguida, foram mantidos vinte e três dias em sala de cultivo com lâmpadas fluorescentes do tipo super luz do dia de 40 Watts, intensidade luminosa de 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de dias longos (16 horas de luz).

A avaliação de contaminação foi determinada por meio de observação diária de incidência de crescimento microbiano nos tubos até o trigésimo dia e o número de tubos contaminados foi transformado em porcentagem.



FIGURA - 2 Ápices caulinares contaminados por bactérias durante a fase de estabelecimento de bananeira ‘Tropical’ e ‘Galil 18’.

Os tubos apresentando contaminação foram conduzidos ao Laboratório de Microbiologia para obtenção de cultura pura. O isolamento foi realizado em meio B.D.A., em placa de Petri por meio da técnica de esgotamento em placa. As placas foram incubadas a 25° C por 24 horas. Após este período uma colônia bem individualizada foi transferida para tubos de ensaio contendo meio B.D.A. Os isolados foram mantidos em geladeira a 5° C.

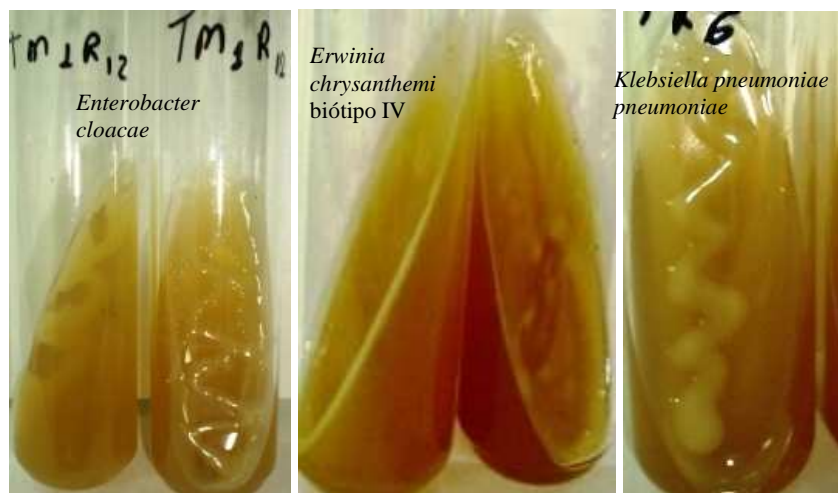


FIGURA - 3 Cultura pura de *Enterobacter cloacae*, *Erwinia chrysanthemi* biótipo IV e *Klebsiella pneumoniae pneumoniae* provenientes de explantes de bananeira ‘Tropical’ e ‘Galil 18’.

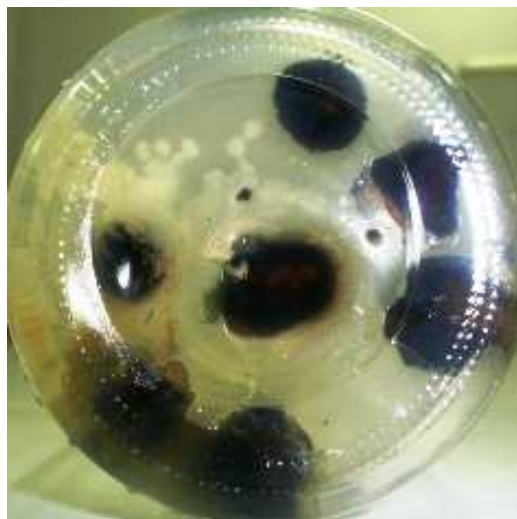


FIGURA - 4 Contaminação bacteriana em explantes de mudas de bananeira ‘Tropical’ e ‘Galil 18’ na fase de multiplicação *in vitro*.

Aos trinta e um dias após a introdução dos explantes, aqueles que não apresentavam sinais visíveis de contaminação foram, de forma asséptica, macerados e o extrato plaqueado em meio B.D.A. para confirmar a ausência de contaminação.

Os isolados bacterianos foram caracterizados com relação à reposta de Gram e morfologia de colônias utilizando a metodologia de Mariano e Assis (2000). A patogenicidade dos isolados bacterianos foi realizada pelo teste de reação de hipersensibilidade (HR), em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) e tomate (*Lycopersicon sculentum* Mill) (ROMEIRO, 2001).



FIGURA - 5 Infiltração de suspensão de 10^8 células bacterianas obtidas nos isolamentos de explantes de bananeira ‘Tropical’ e ‘Galil 18’ durante as fases de estabelecimento e multiplicação *in vitro* para determinação da reação de hipersensibilidade.

A identificação dos gêneros e espécies foi realizada pelo teste de perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa no Laboratório da Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária (Embrapa/CNPMA) de acordo com a metodologia

descrita por Sanhueza e Melo (2007). Foi realizada a identificação de doze isolados por meio do “Software” de Identificação Microbiana (MIDI, Biblioteca Sherlock® TSBA versão 5.0, Microbial ID, Newark, DE, USA).

Colônias com 24 horas de incubação foram recolhidas em meio TSBA (Tryptcase soy broth - Ágar) a partir do terceiro quadrante, com uma alça estéril, e submetidas à saponificação, metilação, extração e lavagem. Alíquotas 2/3 da fase orgânica foram pipetadas para recipiente específico do aparelho e submetidas à leitura no cromatógrafo de gás Agilent 6890. Os resultados do perfil de ácidos graxos totais foram comparados na fase de dados contida na biblioteca TSBA 5.0 utilizando o programa Sherlock® Versão 4.0B. Os isolados que apresentaram os valores de similaridade acima de 0,6 foram considerados identificados para espécie.

Após a identificação dos isolados, foi realizado o teste de patogenicidade para um dos isolados identificado como *E. chrysanthemi*. Para o preparo do inóculo, o isolado foi cultivado em meio TSA em placa de Petri a 28 °C por 24 h e recolhido em solução salina estéril. A suspensão foi ajustada para $AB_{600\text{ nm}} = 0,1$ que corresponde a aproximadamente 10^8 ufc mL^{-1} . A inoculação foi realizada por injeção e por imersão de raízes de mudas de bananeira da cultivar Galil 18 e Tropical, com 120 dias. Realizou-se micro ferimentos nas raízes e, em seguida, foram imersas por 30 minutos em suspensão ajustada para 10^8 ufc mL^{-1} . As mudas foram plantadas em mistura de solo:areia (3:1). Pelo método de injeção, aplicou-se, com auxílio de uma seringa, 1 mL da suspensão na região da base do pseudocaule e raízes. O controle (testemunha) foi realizado pela imersão em solução salina estéril (0,85% de NaCl) e injeção desta solução. Para cada método, utilizaram-se oito repetições e as mudas permaneceram em casa de vegetação por 45 dias. Após este período, as mudas foram cortadas no sentido longitudinal e observada a ocorrência de sintomas de podridão do pseudocaule e rizoma. As plantas tiveram o tecido do rizoma e pseudocaule

retirados e efetuado o isolamento em meio TSA e, após a obtenção de cultura pura, foram enviados para identificação pelo perfil de ácidos graxos.

Em função da variável contaminação ser classificada como quantitativa discreta, com ou sem contaminação, testou-se, através do procedimento GLM (General Linear Models), a aditividade através da análise de covariância dos valores preditos ao quadrado, obtendo-se $P= 0,4621$, a homogeneidade de variância pelo teste de LEVENE ($P= 0,1484$) e a normalidade através do procedimento univariate com a estatística W (Shapiro-Wilk), com $p \geq 0,0001$. Uma vez confirmada a significância do teste de normalidade, utilizando as transformações recomendadas, indicando que a pressuposição de normalidade do resíduo não foi aceita; esta característica avaliada foi submetida à estatística não paramétrica pelo teste do Qui-quadrado (χ^2), por meio do software estatístico SAS (SAS Institute, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As contaminações ocorridas foram exclusivamente bacterianas. A partir do terceiro dia do estabelecimento *in vitro* o crescimento bacteriano em torno dos explantes já podia ser visualizado. Aos 30 dias, 16,07% deles apresentavam sinais visuais de contaminação. Dos explantes que não apresentavam qualquer sintoma nos tubos após o maceramento observaram-se o crescimento de quatro colônias de bactérias, caracterizadas como *Enterobacter gergoviae*, *Salmonella* spp., *Paenibacillus polymyxa* e *Pseudomonas huttiensis*, confirmando a presença de contaminação latente (LEIFERT *et al.*, 1994).

Contaminações latentes são designadas como microrganismos presentes no material e que não produzem sintomas na planta ou crescimento visível no meio de cultivo. Os contaminantes endógenos não causam nenhum sintoma visível na planta ainda no campo e, portanto, são os mais difíceis de serem controlados, pois podem crescer em outras fases da micropropagação quando as condições do meio como pH, concentração de sacarose e sais forem favoráveis ao crescimento. Dessa forma, o aparecimento de contaminações em fases posteriores ao estabelecimento *in vitro* pode acarretar em grandes perdas de material vegetal, tempo de trabalho e conseqüentemente aumento dos custos de produção (LEIFERT *et al.*, 1994).

Com relação aos métodos de assepsia, observou-se diferença significativa apenas para 'Tropical' ($\chi^2=0,0291$). No método de assepsia 2 (DES 2) houve apenas 7,14% de contaminação dos explantes, enquanto que a média de contaminação dos explantes com a aplicação da metodologia de assepsia 1 (DES 1) foi de 42,86%. A cultivar Galil 18 apresentou média de 21,43% e 28,57% ($\chi^2=0,6625$) de explantes contaminados para os protocolos de assepsia DES1 e DES2, respectivamente (TABELA 1).

TABELA 1 - Distribuição de freqüência para porcentagem de contaminação bacteriana de ápices caulinares de bananeira ‘Tropical e ‘Galil 18’ na fase de estabelecimento.

Cultivar	DES 1	DES 2	χ^2	Probabilidade
Tropical	42,86	7,14*	4,7619	0,0291
Galil 18	21,43	28,57	0,1905	0,6625
χ^2	1,4737	2,1913		
Probabilidade	0,2248	0,1388		

*Significativo pelo teste do Qui-quadrado a 5 % de probabilidade.

χ^2 e probabilidade para cultivar na linha.

χ^2 e probabilidade para tratamento na coluna.

As diferenças encontradas entre os dois métodos de assepsia para ‘Tropical’, possivelmente, ocorreram em função do uso do formaldeído na etapa de desinfestação e a flambagem do explante dentro da câmara de fluxo laminar. Esse produto em associação com o álcool e cloro proporcionou uma eficiência maior na assepsia. O calor seco provoca desidratação e oxidação de células microbianas presentes superficialmente nos explantes; o formaldeído inativa proteínas formando ligações cruzadas com vários grupos funcionais presentes na parede das bactérias Gram negativas, o que pode ter potencializado o efeito do hipoclorito de sódio nas células bacterianas. O hipoclorito em solução aquosa libera ácido hipocloroso (HOCl) de carga elétrica neutra que difundi rapidamente através das paredes celulares das bactérias e causa morte celular através da forte oxidação de enzimas da célula. O álcool é outro desnaturante de membrana, rompendo-a e dissolvendo lipídeos (TORTORA *et al.*, 2000).

Diferentes métodos de assepsia e agentes de desinfestação têm sido empregados com objetivo de eliminar as contaminações na fase de

estabelecimento dos explantes das diversas cultivares de bananeira. O cloro tem sido bastante registrado na literatura (OLIVEIRA *et al.*, 2000; HABIBA *et al.*, 2002; JOSEKUTTY *et al.*, 2003; RODRIGUES, 2005), com controle de contaminação variando de 100 a 10% (TITOV *et al.*, 2006; HABIBA *et al.*, 2002; JOSEKUTTY *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2000), observado em diferentes cultivares de bananeira. Em *Heliconia rauliniana* também foram encontrados resultados semelhantes. O índice de contaminação foi de 30% quando se utilizou a desinfestação com solução de hipoclorito de sódio 30% (vv) com 2,5% de cloro ativo e 500 mg L⁻¹ de cefotaxima (RODRIGUES, 2005). Pardo *et al.* (2006), utilizando solução de hipoclorito de sódio (5,5% de cloro ativo) e tabletes de formaldeído em sementes de orquídeas, não observaram nenhuma contaminação durante a fase de estabelecimento e recomendam este produto também para explantes.

Os quinze isolados observados foram classificados como bactérias Gram negativas (TABELA 2). Nietzsche *et al.* (2006), ao caracterizarem os isolados de bactérias provenientes de explantes de bananeiras ‘Prata-Anã’, ‘FHIA 18’ e ‘SH 3640’ contaminados na fase de estabelecimento no cultivo *in vitro*, classificaram-nos como bactérias do tipo Gram negativas, 62,5% para ‘Prata-Anã’, 30% para ‘FHIA 18’ e 14% para ‘SH 3640’ e Gram positivas, 37,5%, 70% e 42,86%, respectivamente.

TABELA 2 - Identificação bioquímica e molecular ao nível de gênero e espécie de bactérias isoladas de ápices caulinares de bananeira ‘Tropical’ e ‘Galil 18’. Janaúba, MG. 2007

Isolado	Identificação	HR	Teste de Gram	Índice de Similaridade
	<i>Bacillus sphaericus</i> *	–	–	0,745
01(GM1R2)	<i>Erwinia chrysanthemi</i> biótipo IV	Negativo	Negativa	0,830
02(GM2R7)	<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i>	Negativo	Negativa	0,814
03(GM2R8)	<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i>	Negativo	Negativa	0,735
04(GM2R10)	<i>Pseudomonas huttiensis</i>	Negativo	Negativa	0,863
05(TM1R4)	<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i>	Negativo	Negativa	0,848
06(TM1R6)	<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i>	Negativo	Negativa	0,829
07(TM1R8)	<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i>	Negativo	Negativa	0,762
08(TM2R3)	<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i>	Negativo	Negativa	0,784
09(TM1R12)	<i>Enterobacter cloacae</i>	Negativo	Negativa	0,888
10(TM1R13)	<i>Enterobacter gergoviae</i>	Negativo	Negativa	0,541
11(TM1R14Ct)	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Negativo	Negativa	0,823
12(TM1R14Cbr)	<i>Salmonella</i> spp.	Negativo	Negativa	**0,566

(*) Isolado controle para cromatografia gasosa.

(**) Índice de similaridade não permitiu a identificação.

Dos isolados bacterianos obtidos, oito provenientes da ‘Tropical’ e sete da ‘Galil 18’, apenas 12 foram identificados por meio do perfil de ácido graxo e separados em sete espécies (TABELA 2 e 3). Identificou-se um isolado como *Erwinia chrysanthemi* biótipo IV; seis como *Klebsiella pneumoniae pneumoniae*; um como *Pseudomonas huttiensis*; um como *Enterobacter gergoviae*; um como *Enterobacter cloacae*; um como *Paenibacillus polymyxa*, e um como *Salmonella* spp. Nenhum destes isolados apresentou reação de hipersensibilidade em plantas de fumo (*N. tabacum*) e tomate (*L. esculentum*). A reação de hipersensibilidade em plantas não hospedeiras, como *N. tabacum* e *L. esculentum*, ocorre quando se injeta no limbo foliar células bacterianas fitopatogênicas. Apesar de todos os isolados terem apresentado reação negativa nessas plantas não hospedeiras, identificou-se na cultivar Galil 18 um isolado identificado como *Erwinia chrysanthemi* biótipo IV. De acordo com Romeiro (2001), as bactérias do gênero *Erwinia* podem não incitar qualquer sintoma visível de HR, comportando-se como saprófitas. É possível que isto possa ter ocorrido para o isolado de *Erwinia* identificado neste trabalho. No teste de patogenicidade realizado com este isolado, observou-se sintoma de escurecimento e maceramento de tecido do pseudocaule em apenas uma planta da cultivar Galil, entretanto a re-identificação do isolado obtido da planta sintomática não confirmou a presença de *E. chrysanthemi*, sendo identificado como *Klebsiella-pneumoniae-pneumoniae*-GC subgrupo B. Este gênero não é patogênico à bananeira. É possível, que este tenha sido um evento ao acaso, já que não houve repetibilidade do sintoma nas demais repetições. Todavia, será importante acompanhar a ocorrência de possíveis murchas no campo associadas geralmente à causa abiótica para determinar qual a real natureza desse fenômeno.

As bactérias podem ser agrupadas em diferentes biovars ou biótipos com base em diferenças bioquímicas (ROMEIRO, 2001). O biótipo IV de *E.*

chrysanthemi identificado neste trabalho possui registro de patogenicidade para *Musa paradisiaca* (SAMSOM *et al.*, 2005). Porém, este mesmo autor apresenta um isolado do biótipo IV patogênico a *Musa* spp. Esta bactéria é descrita como necrotrófica, intracelular e causa podridão mole em diferentes hospedeiros, e principalmente o biótipo IV são principalmente estabelecidos em plantas de clima temperado (JANSE, 2006). De acordo com Venkatesh *et al.* (2006), fatores como pH ácido do fluido intercelular da célula, expressão de sideróforos e alta concentração de Mg^{2+} estão relacionados com a virulência desta espécie.

Três gêneros de bactéria podem causar doença em bananeira, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* (ADDIS *et al.*, 1994) e *Erwinia chrysanthemi* (HASSANZADEH, 1990; RIVERA e EVAZIN, 1989). *Ralstonia solanacearum* ocorre em regiões tropicais, e no Brasil constitui-se numa bacteriose importante, porém é uma praga quarentenária A2 por estar restrita às regiões do Norte do país. *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* ocorre em cultivos de países do continente africano, e *Erwinia chrysanthemi* foi relatada por Hassanzadeh (1990) e Rivera e Evazin (1989) causando podridão aquosa no gênero *Musa* spp. na América Central Insular e no Oriente Médio, entretanto no Brasil não há registro destas fitobacterioses.

O gênero *Klebsiella* foi identificado em 50% dos isolamentos e destes 33,33% estavam associados à cultivar Tropical. Este gênero é amplamente distribuído em água, solo, plantas e está associado a doenças no homem. (MARTÍNEZ *et al.*, 2003). A espécie *Klebsiella pneumoniae pneumoniae* está associada à mucosas em mamíferos, à fixação biológica de nitrogênio e é considerada um microrganismo endofítico associado a raízes de plantas (SHIOMI *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2002). Em banana já foi identificada na raiz, pseudocaule e folhas (MARTÍNEZ *et al.*, 2003).

Braga *et al.* (2001), trabalhando com a cultivar Caipira (AAA), obtiveram índice de 74,7% de contaminação bacteriana na fase de

estabelecimento e, dentre os gêneros identificados, destacaram-se o *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Bacillus*. Habiba *et al.* (2002) observaram sob o microscópio a presença de bactérias na seção transversal do rizoma de explantes de bananeira. Neste estudo foram identificados contaminantes bacterianos endógenos dos gêneros *Klebsiella*, *Erwinia* e *Pseudomonas*. Odutayo *et al.* (2007) verificaram que as bactérias que apresentavam altas taxas de ocorrência, que prevaleceram na fase de estabelecimento dos explantes de bananeira, eram as dos gêneros, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Corynebacterium* spp. e *Erwinia* spp.

Os gêneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Erwinia* e *Klebsiella* são bactérias endofíticas e não fitopatogênicas e frequentemente são isoladas a partir de explantes contaminados de bananeira e outras plantas (ROSENBLUETH e ROMERO, 2006; LEIFERT *et al.*, 1994).

O isolado TM1R14 Ct (TABELA 2), obtido a partir de um explante da cultivar Tropical, foi identificado como da espécie *Paenibacillus polymyxa*. Estudos realizados por Haggag (2007) indicaram que o *Paenibacillus polymyxa* aumentou a resistência à podridão de raízes em amendoim. Entre outras funções, esta bactéria também já foi associada à produção de acetoína, que atua como potencializador de aromas como o de manteiga, vinagre e café. No presente estudo, embora o explante não apresentasse sintomas visuais de colonização bacteriana pelo *Paenibacillus polymyxa*, foi o que também apresentou o maior desenvolvimento ao final de trinta dias de estabelecimento, alcançando média de 4,3 cm de comprimento.

Vários são os exemplos da aplicação de bactérias endofíticas na produção agrícola. Elas aumentam o crescimento do trigo por meio da produção de fitohormônios (BARBIERI *et al.*, 1986), aumentam a produção de arroz por meio do aumento da disponibilidade de minerais (MURTY e LADHA, 1988), aumentam a resistência de plantas de algodão às doenças (CHEN *et al.*, 1995),

contribuem no manejo de pragas do milho (FAHEY *et al.*, 1991), fixam nitrogênio no arroz e trigo (WEBSTER *et al.*, 1997) e aumentam a formação de tubérculos de batata em condições de estresse de calor (BENSALIM *et al.*, 1998). Zinniel *et al.* (2002) sugeriram que as bactérias endofíticas poderão ser utilizadas, futuramente, como produtoras de enzimas degradativas, para controlar certas doenças de plantas ou decompor produtos úteis.

A caracterização morfológica de elevação e bordos da colônia dos isolados bacterianos associados às demais características discriminou três grupos: 1-*Erwinia* spp.; 2-*Klebsiella* spp. e *Salmonella* spp.; 3- *Enterobacter* spp. e *Panenibacillus* spp. (TABELA 3). Esta informação será útil para separar visualmente espécies diferentes na fase inicial de isolamento de bactérias para estudos posteriores.

Winfield e Groisman (2003), relataram que o gênero *Salmonella* spp. foi encontrado em ambientes aquáticos e também no solo, onde podem se multiplicar; considerando, entretanto, que estes são ambientes de transição antes da infecção em um hospedeiro. Este gênero foi isolado em diferentes partes das plantas de mandioca coletadas no Estado do Amazonas representando 9% do total de bactérias endofíticas identificadas (TEIXEIRA *et al.*, 2005).

O resultado da identificação das espécies de bactérias demonstra uma diversidade de microrganismos endofíticos nas cultivares Galil 18 e Tropical, e que parte das contaminações podem ter ocorrido em função do manuseio dos explantes pelo manipulador, que pode ter atuado como fonte de contaminação durante o processo de assepsia.

TABELA 3 - Caracterização morfológica dos isolados bacterianos obtidos de ápices caulinares de bananeira cultivar Tropical e Galil 18, Janaúba/MG.

Isolado	Identificação	Tamanho	Forma	Elevação	Bordos	Estrutura	Brilho	Aspecto
01	<i>Erwinia chrysanthemi</i> b.IV	Pequena	circular	elevada	liso	granulosa	Translúcida	leitosa
02	<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i>	Pequena	Circular	Convexa	Lisos	Lisa	Translúcida	Leitosa
03	<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i>	Pequena	Circular	Convexa	Lisos	Lisa	Translúcida	Leitosa
04	<i>Pseudomonas huttiensis</i>	Pequena	Circular	Convexa	lisos	Lisa	Translúcida	Leitosa
05	<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i>	Pequena	Circular	Convexa	lisos	Lisa	Translúcida	Leitosa
06	<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i>	Pequena	Circular	Convexa	lisos	Lisa	Translúcida	Leitosa
07	<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i>	Pequena	Circular	Convexa	lisos	Lisa	Translúcida	Leitosa
08	<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i>	Pequena	Circular	Convexa	lisos	Lisa	Translúcida	Leitosa
09	<i>Enterobacter cloacae</i>	Pequena	Circular	Convexa	lisos	Lisa	Translúcida	Leitosa
10	<i>Enterobacter gergoviae</i>	Pequena	Circular	Convexa	Ondulado	Granulosa	Translúcida	Leitosa
11	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Pequena	Irregular	Ondulada	Ondulado	Lisa	transparente	Viscosa
12	<i>Salmonella</i> sp (*)	Pequena	Irregular	Convexa	lisos	Lisa	Translúcida	Leitosa

(*) Índice de similaridade não permitiu a identificação.

4 CONCLUSÕES

- O método de assepsia dois (DES 2) foi mais eficiente no controle das contaminações de origem bacteriana nos explantes da cultivar Tropical;
- Identificaram-se sete gêneros diferentes de bactérias em explantes das bananeiras ‘Galil 18’ e ‘Tropical’;
- O gênero *Klebsiella* sp. foi o que apresentou maior frequência nos explantes, na propagação *in vitro* de bananeiras cultivar Tropical e Galil 18.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDIS, T.; HANDORO, F.; BLOMME. Bacterial wilt (*Xanthomonas campestris* pv. *Musacearum*) on enset and banana in Ethiopia. **Infomusa**, Montpellier, v.13, n.2, 1994.

ASSAREH, H. M.; SARDABI, H. Macropropagation and micropropagation of *Ziziphus spina-Christi*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 5, p. 459-465, 2005.

BARBIERI, P.; ZANELLI, E.; GALLI, E.; ZANETTI, G. Wheat inoculation with *Azospirillum brasiliense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. **FEMS Microbiology Letters**, v.36, p.87-90, 1986.

BRAGA, M. F; LISEI DE SA, M. E; 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.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 24 de 16 de dezembro de 2005. Aprova as Normas para Produção, Comercialização e Utilização de Mudanças. **Diário Oficial da União**: 16 dez. de 2005, seção 1, p. 5. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/sislegis.consulta/>>. Acesso em: 02 abr. 2008.

BENSALIM, S.; NOWAK, J.; ASIEDU, S. K. A plant growth promoting rhizobacterium and temperature effects on performance of 18 clones of potato. **American Journal of Potato Research**, v. 75, p. 145-152, 1998.

CHEN, C. et al. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control**, Orlando, v.5, p.83-91, 1995.

FAHEY, J. W. et al. Genetically engineered endophytes as biocontrol agents: a case study from industry. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Ed.). **Microbial ecology of leaves**. London: Springer-Verlag, 1991, p. 401-411.

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.

JANSE, J.D. **Phytopathology**: principles and practice. Cambridge: CABI, 2006. 341p.

HABIBA., U. et al. Endogenous bacterial contamination during *in vitro* culture of table banana : identification and prevention. **Plant Tissue Culture**, Rehovot, v. 2, n.12, p. 117-124, 2002. Disponível em: <<http://www.baptcb.org/ptc/Full-article/ptc12-2-04pdf>>. Acesso em: 07 dez. 2007.

HAGGAG, W. M. Colonization of exopolysaccharide-producing *Paenibacillus polymyxa* on peanut roots for enhancing resistance against crown rot disease. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 13, p. 1568-1577, 2007. Disponível em: <<http://www.academicjournals.org/AJB/PDF/pdf2007/4jul/Haggag.pdf>>. Acesso em: 06 dez. 2007.

HASSANZADEH, N. Characterization of a new soft rot *Erwinia* to banana in Iran. descripción de una nueva pudrición blanda *Erwinia* en los bananos en Iran. **Iranian Journal of Plant Pathology**, v. 26, n.1-4, p. 5-6, 1990.

JOSEKUTTY, P. C.; CORNELIUS, S. S.; KILAFWASRU, T. N. Micropropagation of four banana cultivars in micronesia. **Micronesia Supplement**, v. 7, p. 77-81, 2003. Disponível em: <<http://www.uog.edu/up/micronesica/abstract-supp6-7/pdfs7/77-81Josekutty.pdf>>. Acesso em: 08 dez. 2007.

KIMATI, H. In: BERGAMIN, A. F.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. 919 p.

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.

MARTÍNEZ, L. et al. Diazotrophic bacteria associated with banana (*Musa* spp.). **Plant and Soil**, n. 257, p.35-47, 2003.

MARIANO, R.L.R.; ASSIS, S.M.P. Métodos de coloração de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R.L.R. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: 2000. 171 p.

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

MURTY, M.G.; LADHA, J.K. Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. **Plant and Soil**, v.108, p. 281-285, 1988.

NIETSCHKE, S. et al. Estabelecimento *in vitro* de explantes de três cultivares de bananeira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.3, p.989-991, 2006.

ODUTAYO, O. I. et al. Sources of microbial contamination in tissue culture laboratories in southwestern Nigeria. **African Journal of Agricultural Research**, v. 2, n. 3, p. 67-72, 2007. Disponível em: <<http://www.academicjournals.org/AJAR/PDF/Pdf2007/Mar/Odutayo%20et%20al.pdf>>. Acesso em: 24 jan. 2008.

OLIVEIRA, R. P. et al. *In vitro* conservation of diploid banana accessions. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 2, p. 245-249, 2000.

PARDO, V. M. A.; FERREIRA, A. G.; NUNES, V. F. Seed disinfestation methods for *in vitro* cultivation of epiphyte orchids from Southern Brazil. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n.2, p. 217-220, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/hb/v24n2/19.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2008.

RIVERA, N.; EZAVIN, M.. Necrosis del cormo del plátano causada por *Erwinia chrysanthemi*. Banana corm necrosis caused by *Erwinia chrysanthemi*. **Ciencia y Técnica en la Agricultura. Protección de Plantas**, v.12, n. 2, p.59-70, 1989.

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

ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: UFV, 2001. 279 p.

ROSENBLUETH, M.; ROMERO, E. M. Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.19, n.8, p. 827-837, 2006. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/MPMI-19-0827>>. Acesso em: 08 dez. 2007.

SANHUEZA, R. M. V.B.; MELO, I. S. **Identificação de bactérias por análise dos ácidos graxos**. In: _____. Métodos utilizados no biocontrole de fitopatógenos. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2007. p.59-65.

SAMSON, R. et al. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953) Brenner *et al.* 1973 and *Brenneria paradisiacal* to the genus *Dickeya paradisiacal* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zae* sp. nov. **Journal of Clinical Microbiology Online**, n. 55, p. 1415-1427, 2005 Disponível em: <<http://ijs.sgmjournals.org/cgi/content/full/55/4/1415>>. Acesso em: 24 mar. 2007.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT User's guide**. Version 8. Cary: NC, 2000.

SHIOMI, F. H. et al. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 63, n.1, p. 32-39, 2006.

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

TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S.; VIEIRA, R. F. Diversidade de bactérias endofíticas na cultura da mandioca. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Jaguariúna: Embrapa, 2005. n. 3, 23p.

TEIXEIRA, M. A et al. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e enoviedades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 42, n.1, p. 43-49, 2007.

TITOV, S. et al. Control of phenolic compound secretion and effect of growth regulators for organ formation from *Musa* spp. Cv. Kanthali Floral Bud Explants. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**. Bangladesh: v. 2, n. 3, p. 97-104, 2006. Disponível em: <<http://www.scipub.org/fulltext/ajbb/ajbb2397-104pdf>>. Acesso em: 07 dez. 2007.

TORTORA, G. J. et al. **Microbiologia**. 6 ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. cap. 7.

VENKATESH, B. et al. The *Erwinia Chrysanthemi* 3937 PhoQ sensor kinase regulates several virulence determinants. **Journal of Bacteriology**, v.188, n.8, p. 3088-3098, 2006.

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**. Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente, 2003. n. 16, 29 p.

WEBSTER, G. et al. Interactions of rhizobia with rice and wheat. **Plant and Soil**, v.194, p.115-122, 1997.

WHITE, P. R. Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient medium for cultivation of excised tomato roots. **Growth**, [S.l.], v. 7, p. 53-65, 1943.

WINFIELD, M. D.; GROISMAN, E. A. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. v. 69, n. 7, p. 3687-3694, 2003.

WOJTANIA, A.; PULAWSKA, J.; GABRYSZEWSKA, E. Identification and elimination of bacterial contaminants from *Pelargonium* tissue cultures. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, v. 13, p. 101-108, 2005. Disponível em: <<http://www.insad.pl/files/journal-pdf/journal-2005/full205-10.pdf>>. Acesso em: 08 dez. 2007.

ZINNIEL, D. K. et al. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2198-2208, 2002.

CAPÍTULO II

MICROPROPAGAÇÃO DAS BANANEIRAS TROPICAL E GALIL 18 SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BAP

RESUMO

GANEM, Solange Teixeira de Souza. **Micropropagação das Bananeiras Tropical e Galil 18 Sob Diferentes Concentrações de BAP**. 2008. Cap. 2, p. 59-91 Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semi-Árido) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG.¹

O trabalho foi realizado no Campus de Janaúba da Universidade Estadual de Montes Claros com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes concentrações de BAP na fase de multiplicação *in vitro* e de aclimatização das cultivares de bananeira Tropical e Galil 18. Foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4x2+1, com quatro doses de BAP 1,0, 3,0, 7,0 e 9,0 mg L⁻¹, duas cultivares e uma dose testemunha de 5,0 mg L⁻¹ de BAP, com quatro repetições. Foram avaliadas as características de número total de explantes, comprimento e diâmetro do pseudocaule das mudas *in vitro* e na fase de aclimatização. Para a característica taxa de multiplicação foi utilizado DIC em esquema fatorial 4x2x4+1, sendo quatro doses de BAP, duas cultivares, quatro subcultivos e uma dose padrão de 5,0 mg L⁻¹. Foram realizados quatro subcultivos de 25 dias. Ao final do quarto subcultivo da cultivar Tropical foram produzidos 281,07 plântulas na concentração de 6,5 mg L⁻¹ de BAP. As taxas de multiplicação absoluta *in vitro* para as doses 7,0 e 9,0 mg L⁻¹, no 2º subcultivo foram significativamente superiores a dose padrão de 5 mg L⁻¹. A maior taxa foi obtida na dose de 7,0 mg L⁻¹, no 2º subcultivo, com média de 5,50 explantes. A ‘Galil 18’ apresentou diferença significativa menor que a testemunha no 2º subcultivo, com taxa média de 1,84 explantes. A análise de desdobramento apresentou efeito significativo (p< 0,05) das doses sobre o comprimento do pseudocaule das plântulas *in vitro*. Para ‘Tropical’ foram observados incrementos no comprimento até a dose de 6,5 mg L⁻¹. Em relação ao diâmetro do pseudocaule, a ‘Galil 18’ apresentou incrementos no diâmetro até 5,9 mg L⁻¹ de BAP, enquanto que a ‘Tropical’ demonstrou incrementos lineares da ordem de 0,0241 cm para cada 1,0 mg L⁻¹ de BAP adicionado. Após aclimatização não foram observados efeitos significativos (p> 0,05) para o comprimento do pseudocaule nas plântulas da ‘Galil 18’. Na ‘Tropical’ a dose de 5,5 mg L⁻¹ proporcionou maior crescimento das plântulas, 5,16 cm, trinta dias após a aclimatização. Os resultados indicam que não foram observados efeitos nas concentrações de BAP para a maioria das características na ‘Galil 18’ e concentrações de BAP entre 6,5 e 7,0 mg L⁻¹ promoveram a maior produção de

¹ Comitê Orientador: Silvia Nietsche – UNIMONTES (Orientadora).

mudas e maior taxa de multiplicação *in vitro* na cultivar Tropical, respectivamente.

Palavras-chave: reguladores de crescimento, *Musa* spp., cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

GANEM, Solange Teixeira de Souza. **Micropropagation of Banana Tropical and Galil 18 under different concentrations of BAP.** 2008. p. 59-91
Dissertation (Master's degree in Plant Production) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, Minas Gerais, Brazil. ¹

The work was carried out at Campus from Janaúba of the Universidade Estadual de Montes Claros with the objective of evaluating the effect of different concentrations of BAP in the phase of multiplication *in vitro* and of acclimatization of the banana cultivar “Tropical” and “Galil 18”. The entirely randomized design was used (ERD) in factorial scheme 4 x 2 + 1, with four doses of BAP 1,0; 3,0; 7,0 and 9,0 mg L⁻¹, two cultivars and a control dose of 5,0 mg L⁻¹ of BAP, with four repetitions. Were appraised the characteristics: total number of explants, length and diameter of the pseudostem of the plants *in vitro* and in the acclimatization phase. For the characteristic multiplication rate, ERD was used in factorial scheme 4 x 2 x 4 + 1, being four doses of BAP, two cultivars, four subcultures and a control dose of 5,0 mg L⁻¹. Four subcultures of 25 days were accomplished. At the end of the fourth subculture of the cultivar Tropical, 281 were produced, 07 plantules in the concentration of 6,5 mg L⁻¹ of BAP. The rates of multiplication absolute *in vitro* for the doses 7,0 and 9,0 mg L⁻¹, in the 2nd subculture, were significantly superior to the standard dose of 5 mg L⁻¹. The largest rate was obtained in the dose of 7,0 mg L⁻¹, in the 2nd subculture, with average of 5,50 explantes. Galil 18 presented smaller significant difference than the control in the 2nd subculture, with average rate of 1,84 explantes. The unfolding analysis presented significant effect (p≤ 0,05) of the doses on the pseudostem length of the plantules *in vitro*. For the “Tropical” increments were observed in the length until the dose of 6,5 mg L⁻¹. Concerning to the pseudostem diameter, “Galil 18” presented increments until 5,9 mg L⁻¹ of BAP, while the “Tropical” demonstrated linear increments around 0,0241 cm for each 1,0 mg L⁻¹ of added BAP. After the acclimatization, significant effects (p≤ 0,05) were not observed for the length of the pseudostem in the plantules of “Galil 18”. In the tropical, the dose of 5,5 provided larger growth of the plantules, 5,16 cm, thirty days after the acclimatization. The results show that effects were not observed in the concentrations of BAP for most of the characteristics in “Galil 18” and concentrations of BAP between 6,5 and 7,0 mg

¹ Comitê Orientador: Silvia Nietsche – UNIMONTES (Orientadora).

L⁻¹ provided the largest production of plants and largest rate of multiplication *in vitro* in the cultivar Tropical, respectively.

Key-word: growth regulators, *Musa* spp., *in vitro* culture

1 INTRODUÇÃO

A banana é uma das frutas de consumo “in natura” mais importantes no mundo em termos de alimentação. No Brasil, a produção é de aproximadamente de 7 milhões de toneladas e uma área de aproximadamente 509 mil hectares em todos os estados da federação (IBGE, 2008). O Estado de Minas Gerais se desponta em quinto lugar no cenário nacional e a Região do Norte de Minas Gerais se destaca como a maior região produtora de banana ‘Prata’ do Estado (CEASA, 2008).

Os principais países importadores de banana vêm impondo barreiras fitossanitárias que impedem a entrada de produtos que não estejam dentro dos padrões de qualidade (SILVA e CORDEIRO, 2000). Neste contexto, a utilização da muda micropropagada é indispensável, pois permite a rastreabilidade imposta pelos programas de produção integrada. O desenvolvimento de pesquisa e a transferência de tecnologia para a produção, por meio de mudas micropropagadas e certificadas de bananeira (*Musa spp.*), com qualidade genética e fitossanitária, são fundamentais para garantir uma alta produtividade, bem como suprir a demanda por mudas de qualidade, dos produtores rurais (CORDEIRO e MOREIRA, 2006).

A utilização da micropropagação em larga escala já é realidade em diversos países do mundo. Os laboratórios comerciais trabalham com objetivo de atender as necessidades de material de propagação livre de pragas e de acelerar os métodos convencionais de propagação vegetativa (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Entretanto, a micropropagação comercial só tem sido possível graças à utilização de reguladores de crescimento vegetal, que são substâncias químicas sintéticas semelhantes aos hormônios produzidos pela própria planta, que produzem respostas favoráveis na multiplicação *in vitro* (HINOJOSA, 2000).

O uso de fitorreguladores é uma prática indispensável na micropropagação, uma vez que promove o bom andamento da cultura de tecidos de plantas (HINOJOSA, 2000). O principal objetivo da adição de fitorreguladores é a de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônio nos explantes, sendo as citocininas favoráveis ou até necessárias à formação de brotações laterais (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Na micropropagação da bananeira, o regulador de crescimento mais utilizado é uma citocinina, o 6-Benzilaminopurina (BAP), utilizado nas fases da micropropagação. A concentração usada 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, com diferentes doses, 1,0 mg L⁻¹ (UTINO *et al.*, 2001); 2,5 mg L⁻¹ (BERNARDI *et al.*, 2004), e 3,5 mg L⁻¹ (DINIZ *et al.*, 1999). Entretanto, as doses de citocininas utilizadas na micropropagação de bananeiras na fase de multiplicação podem variar entre 1,0 mg L⁻¹ a 10,0 mg L⁻¹ (QUISEN *et al.*, 2004; JOSEKUTTY *et al.*, 2003; BERNARDI *et al.*, 2004; BRAGA *et al.*, 2001).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a multiplicação *in vitro* das mudas das cultivares de bananeira ‘Tropical’ e ‘Galil 18’, sob diferentes concentrações do regulador de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Em 23 de maio de 2007, mudas do tipo chifre das cultivares de bananeiras Galil 18 (AAAB) e Tropical (AAAB) foram retiradas de um pomar comercial e do matrizeiro da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado de Minas Gerais (EPAMIG/CTNM), localizados nos municípios de Porteirinha e Nova Porteirinha, Minas Gerais, respectivamente. Após seleção das mudas, foi realizada a retirada das bainhas foliares e parte dos rizomas. Os explantes com 10 cm de comprimento foram mantidos em água destilada e, em seguida, conduzidos ao laboratório de Cultura de Tecidos e Células Vegetais da Universidade Estadual de Montes Claros.

Após a etapa da limpeza mecânica, o material foi desinfestado em solução de Sulfato de Estreptomicina ($0,3 \text{ g L}^{-1}$), por 20 minutos, solução fungicida de Derosal 500 SC (Sistêmico – Benzimidazol) na concentração de 0,6% por 20 minutos; álcool comercial a 92,8% por 60 segundos; solução em agitação com formaldeído a 7,99 % por sete minutos e solução comercial com cloro ativo a 2,5%, em agitação por 25 minutos e adicionadas de três gotas de Tween 20 para um litro de solução, sempre intercalando tríplice lavagem com água estéril e deionizada. Em seguida, os explantes foram conduzidos à câmara de fluxo laminar para finalizar o processo de limpeza mecânica e redução. Nesta fase, os explantes foram flambados com álcool 92,8 % e, com o auxílio de bisturi, reduzidos a 1,5 cm de comprimento. Foram estabelecidos 60 ápices caulinares para cada cultivar.

Os explantes foram introduzidos em tubos de ensaio de 15 cm contendo 10 mL do meio MS (MURASHIGUE & SKOOG, 1962) suplementado com sacarose ($30,0 \text{ g L}^{-1}$), carvão ativado ($2,5 \text{ g L}^{-1}$), Vitaminas do White (WHITE 1943) ($10,0 \text{ mg L}^{-1}$), Mio inositol ($0,1 \text{ g L}^{-1}$) e Ágar ($7,0 \text{ g L}^{-1}$). Os explantes permaneceram em ambiente totalmente escuro durante sete dias. Posteriormente,

foram mantidos vinte e três dias em sala de cultivo com lâmpadas fluorescentes do tipo super luz do dia de 40 Watts, intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz.



FIGURA - 1 Armazenamento em sala de cultivo na fase de multiplicação *in vitro* de bananeira ‘Tropical’ e ‘Galil 18’.



FIGURA - 2 Explantes na fase de multiplicação *in vitro* de bananeira ‘Tropical’ e ‘Galil 18’.

Para a fase de multiplicação, foram utilizados frascos com 10 cm de altura por 6 cm de diâmetro, com 20 mL de meio MS (MURASHIGUE & SKOOG, 1962), suplementado com sacarose (30,0 g L⁻¹), vitaminas do Witte (10,0 mg L⁻¹), mio inositol (0,1 g L⁻¹) e Ágar (7,0 g L⁻¹). Nesse momento foram aplicados os tratamentos em cada cultivar utilizando-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4x2+1, com quatro tratamentos: 1, 3, 7 e 9 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP), duas cultivares e uma dose padrão (testemunha) de 5,0 mg L⁻¹ em quatro repetições e três explantes por repetição, num total de 60 explantes. Para as análises de taxas de multiplicação absoluta, foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4x2x4+1, com quatro tratamentos: doses 1,0, 3,0, 7,0 e 9,0 mg L⁻¹, de 6-benzilaminopurina (BAP), duas cultivares, quatro subcultivos e uma dose padrão (testemunha) de 5,0 mg L⁻¹ por cultivar; quatro repetições e três explantes por repetição, num total de 60 explantes por cultivar

Os explantes foram submetidos a quatro subcultivos, com intervalos de 25 dias. No primeiro e segundo subcultivos, os explantes tiveram os tecidos oxidados retirados e foram cortados longitudinalmente ao meio e as duas metades subcultivadas para meio fresco. No terceiro e quarto subcultivos, o processo de multiplicação foi realizado por meio de subcultivos das brotações laterais, sendo efetuada a divisão longitudinal dos explantes.

Foram realizadas avaliações diárias da contaminação de cada tubo nos 30 dias da fase de estabelecimento. Nos subcultivos subseqüentes, os frascos contaminados eram periodicamente contabilizados e descartados.

Ao início de cada subcultivo, foi avaliado o número total de explantes produzidos por frasco, para a obtenção da taxa de multiplicação absoluta e acumulada, para cada tratamento. A taxa de multiplicação absoluta é o número de brotos obtidos por explante inicial em cada subcultivo de 25 dias, e a taxa de

multiplicação acumulada é o número total de brotos obtidos desde o estabelecimento até o subcultivo em estudo, por explante inicial.

Ao final do quarto subcultivo, foram tomadas, aleatoriamente, vinte plântulas por repetição, totalizando 80 plântulas para cada cultivar avaliada, com comprimento mínimo de 2,5 cm. As plântulas foram transferidas para frascos com 20 mL de meio MS (MURASHIGUE & SKOOG, 1962) suplementado com sacarose ($30,0 \text{ gL}^{-1}$), vitaminas do Witte ($10,0 \text{ mg L}^{-1}$), mio inositol ($0,1 \text{ gL}^{-1}$), Ágar ($7,0 \text{ gL}^{-1}$) e $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de Ácido Naftaleno Acético (ANA), para o enraizamento *in vitro*. As mudas permaneceram durante quinze dias no meio de enraizamento e ao final desse período foram avaliadas as características de comprimento e diâmetro do pseudocaule.



FIGURA - 3 Mudanças de bananeira ‘Tropical’ e ‘Galil 18’ na fase de enraizamento *in vitro*.

Após avaliação das características, as plântulas foram lavadas em água corrente para a retirada dos resíduos do meio de cultura e, em seguida, plantadas em tubetes de $0,05 \text{ dm}^3$ com substrato comercial Plantmax®. As mudas foram conduzidas para a aclimatização em viveiro, sob telado com 50% de

sombreamento. As plântulas permaneceram por um período de 10 dias em estufins com cobertura plástica transparente sob sistema de irrigação por nebulização. Após este período permaneceram por mais 20 dias sob telado. Trinta dias após a fase de aclimatização em viveiro, foram avaliadas a porcentagem de sobrevivência, comprimento e diâmetro do pseudocaule.



FIGURA - 4 Mudanças de bananeira ‘Tropical’ e ‘Galil 18’ na fase de aclimatização em viveiro.

Durante todos os subcultivos, o enraizamento e no período de aclimatização em viveiro, foi avaliado o surgimento de plantas anormais com características morfológicas diferenciadas, que pudessem caracterizá-las como variantes somaclonais.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e, quando significativos, aplicou-se o teste Dunnett ($P \leq 0,05$), logo após os dados foram submetidos à análise de regressão por meio do software estatístico SAS (SAS Institute, 2000). As análises foram realizadas conforme o modelo estatístico a seguir:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + D_j + CD_{ij} + e_{ijk}; \text{ onde:}$$

Y_{ijk} = valor observado na parcela k, da cultivar i, submetida a dose de BAP j;

μ = uma constante associada às observações da população;

C_i = efeito da cultivar, com $i = 1$ e 2 ;

D_j = efeito de doses de BAP j; com $j = 1, 3, 7$ e 9 mg.L^{-1} ,

CD_{ij} = efeito da interação da cultivar i e dose j;

e_{ijk} = efeito dos fatores não controlados, ou seja, erro experimental aleatório associado a cada observação, que por hipótese tem distribuição normal, média igual a zero e variância σ^2 .

As análises de taxas de multiplicação absoluta foram realizadas conforme o modelo estatístico a seguir:

$Y_{ijkl} = \mu + C_i + D_j + S_l + CD_{ij} + CS_{il} + DS_{jl} + CDS_{ijkl} e_{ijkl}$; onde:

Y_{ijkl} = valor observado na parcela k, da cultivar i, submetida a dose de BAP j, no subcultivo l;

μ = uma constante associada às observações da população;

C_i = efeito da cultivar, com $i = 1$ e 2 ;

D_j = efeito de doses de BAP; com $i = 1, 3, 7$ e 9 mg.L^{-1} ;

S_l = efeito do subcultivo; com $l = 25, 50, 75$ e 100 dias de subcultivo;

CD_{ij} = efeito da interação da cultivar i e dose j;

CS_{il} = efeito da interação da cultivar i no subcultivo l;

DS_{jl} = efeito da interação da dose j no subcultivo l;

CDS_{ijkl} = efeito da interação da cultivar i, na dose j e no subcultivo l;

e_{ijkl} = efeito dos fatores não controlados na parcela, ou seja, erro experimental aleatório associado a cada observação, com distribuição normal, média igual a zero e variância σ^2 .

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As porcentagens médias de contaminação durante a fase de multiplicação *in vitro* foram de 5,4% e 2,8%, para ‘Galil 18’ e ‘Tropical’, respectivamente. As taxas de contaminação obtidas no presente trabalho são consideradas baixas, equivalentes às observadas em laboratórios comerciais com níveis de contaminação que variam de 3% a 5% (SANDOVAL *et al.*, 1991). Pesquisas demonstram que a porcentagem de contaminação tende a apresentar uma redução à medida que vão sendo realizados os subcultivos e vários autores relatam que é a fase de estabelecimento, na prática, que apresenta as maiores dificuldades de assepsia do material vegetal (OLIVEIRA e SILVA, 1997; CID e ZIMMEMRMANN, 2006). As perdas por contaminação são tão importantes que podem inviabilizar o processo de micropropagação de bananeiras caso não forem tomadas medidas necessárias de assepsia durante todo o processo (CARNEIRO *et al.*, 1999; CARNEIRO *et al.*, 2000).

Observou-se efeito significativo ($p < 0,05$) das doses de BAP sob o número total de brotos apenas para a ‘Tropical’. Com base nos resultados apresentados na Tabela 1, a dose $7,0 \text{ mg L}^{-1}$ foi superior à testemunha. Na ‘Galil 18’ não se observou diferenças significativas ($p > 0,05$) quanto ao número de brotos, com média de 168 brotos em quatro subcultivos.

Observou-se efeito quadrático significativo ($p < 0,05$) para o número total de brotos para a ‘Tropical’. Por meio da derivada primeira da equação de regressão (FIGURA 1) estimou-se que na concentração de $6,5 \text{ mg L}^{-1}$ ocorreu a maior produção de brotos da cultivar Tropical, com um total de 281 brotos, provenientes do quarto subcultivo. A partir deste ponto, níveis superiores de BAP reduziram a produção de brotos. Entretanto, Oliveira *et al.* (2001), ao avaliarem diferentes doses de BAP na micropropagação da bananeira FHIA 01

(AAAB), verificaram que doses superiores a 5,0 mg L⁻¹ de BAP reduziram o número total de brotos produzidos ao final do quinto subcultivo.

TABELA – 1 Número total de brotos de bananeira ‘Tropical’ e ‘Galil 18’ micropropagadas em meio de cultura contendo diferentes concentrações de BAP ao final de quatro subcultivos. Janaúba-MG, 2007.

BAP (mg.L ⁻¹)	Tropical	Galil 18
1	109,00	143,25
3	173,25	96,25
7	311,25*	121,50
9	227,50	163,00
5 (testemunha)	160,25	182,25
CV (%)	25,11	

Significativo pelo teste Dunnett (p<0,05) na coluna.

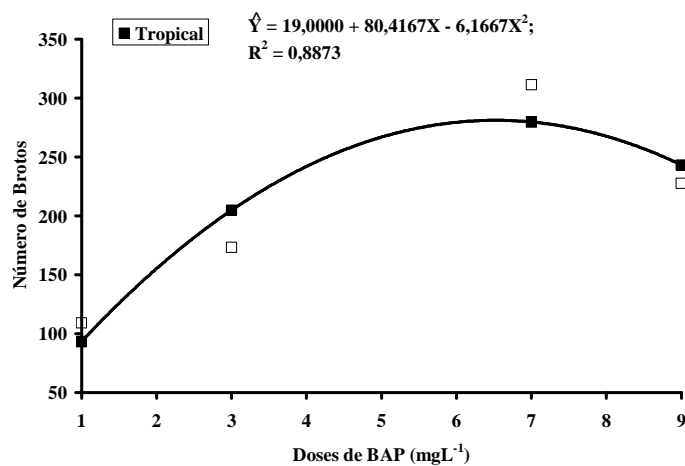


FIGURA – 1 Análise de regressão para número total de brotos *in vitro* de bananeira ‘Tropical’ em função da concentração de BAP.

Na literatura, poucos são os trabalhos sobre a micropropagação *in vitro* de cultivares tetraplóides. Lima e Moraes (2006) recomendam a aplicação de 4,0 mg L⁻¹ e 4,5 mg L⁻¹ de BAP na multiplicação *in vitro* dos híbridos tetraplóides FHIA 01 e PV03-44, respectivamente.

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 e DE LANGHE, 1985; CRONAUER e KRIKORIAN, 1986; VUYLSTEKE, 1989).

As taxas de multiplicação absoluta variaram em função das diferentes doses de BAP ao longo dos quatro subcultivos na ‘Tropical’ e ‘Galil 18’ (TABELAS 2 e 3).

A ‘Galil 18’ apresentou menor taxa de multiplicação de explantes quando submetida à dose de 3,0 mg L⁻¹ de BAP em relação à dose padrão de 5,0 mg L⁻¹ de BAP apenas no 2º subcultivo com 1,84 explantes por explante inicial (TABELA 2). As demais médias não diferiram significativamente ($p > 0,05$) da dose padrão. A taxa média variou de 1,66 a 2,73 explantes por explante inicial, em função das doses de BAP, ao longo dos quatro subcultivos.

TABELA – 2 Taxa de Multiplicação *in vitro* absoluta e (acumulada)¹ por explante inicial de bananeira ‘Galil 18’ em quatro subcultivos em meio de cultura contendo diferentes concentrações de BAP. Janaúba-MG, 2007.

Dias de Subcultivo	Taxa de multiplicação absoluta (acumulada) por explante inicial				
	BAP (mg L ⁻¹)				
	1	3	7	9	5 (testemunha)
25	2,00 (2,00)	2,00 (2,00)	2,00 (2,00)	2,00 (2,00)	2,00
50	2,63 (5,26)	1,84* (3,68)	2,67 (5,34)	2,44 (4,88)	2,96
75	1,66 (8,73)	2,46 (9,05)	2,03 (10,84)	2,17 (10,59)	2,36
100	2,73 (23,84)	1,87 (16,93)	1,98 (21,46)	2,63 (27,85)	2,15
CV (%)	18,27				

* Significativo pelo teste Dunnett ($p < 0,05$) na linha.

¹ A taxa de multiplicação acumulada, entre parênteses, foi estimada.

A cultivar Tropical apresentou, nas doses 7,0 e 9,0 mg L⁻¹ de BAP, no 2º subcultivo aos 50 dias de cultivo, taxas médias significativamente ($p < 0,05$) superiores à dose padrão de 5,0 mg L⁻¹ (TABELA 3). A taxa absoluta de multiplicação *in vitro* da ‘Tropical’ variou de 1,59 a 5,50 explantes por explante inicial, em função das concentrações de BAP, ao longo dos quatro subcultivos. A maior taxa de multiplicação absoluta foi obtida na dose de 7,0 mg L⁻¹ de BAP, no 2º subcultivo aos 50 dias de cultivo, com média de 5,50 explantes por explante inicial.

TABELA – 3 Taxa de Multiplicação *in vitro* absoluta e (acumulada)¹ por explante inicial de bananeira ‘Tropical’ em quatro subcultivos em meio de cultura contendo diferentes concentrações de BAP. Janaúba-MG, 2007.

Dias de Subcultivo	Taxa de multiplicação absoluta (acumulada) por explante inicial				
	BAP (mg L ⁻¹)				
	1	3	7	9	5 (testemunha)
25	1,92 (1,92)	2,00 (2,00)	2,00 (2,00)	2,00 (2,00)	2,00
50	2,77 (5,32)	1,98 (3,96)	5,50*(11,00)	4,17*(8,34)	2,29
75	2,17(11,54)	2,87(11,37)	2,21 (24,31)	2,29(19,10)	2,40
100	1,59(18,35)	2,55(28,98)	2,17(52,75)	1,99(38,01)	2,43
CV (%)	18,27				

* Significativo pelo teste Dunnett (p<0,05) na linha.

¹ A taxa de multiplicação acumulada, entre parênteses, foi estimada.

Oliveira *et al.* (2001) obtiveram a maior taxa de multiplicação absoluta, 4,96, na dose 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 dose 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, doses e tipos de citocininas na taxa de multiplicação (ZAERR e 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 e 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 e MORAES, 2006).

Independentemente das diferentes doses de BAP utilizadas, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) no comprimento do pseudocaule dos brotos nas condições *in vitro* para as cultivares Galil 18 e Tropical em relação à testemunha (TABELA 4). Entretanto, ao se observar a análise de desdobramento, verificou-se que houve efeito significativo ($p < 0,05$) das doses sobre a característica de comprimento do pseudocaule nas plântulas da 'Tropical'.

TABELA – 4 Comprimento do pseudocaule na fase de multiplicação *in vitro* de bananeira 'Tropical' e 'Galil 18' micropropagadas em meio de cultura contendo diferentes concentrações de BAP. Janaúba-MG, 2007.

BAP (mg L ⁻¹)	Comprimento do pseudocaule (cm)	
	Tropical	Galil 18
1	2,80 ^{NS}	3,00 ^{NS}
3	3,52 ^{NS}	2,82 ^{NS}
7	3,54 ^{NS}	3,54 ^{NS}
9	3,61 ^{NS}	2,84 ^{NS}
5 (testemunha)	2,94	2,91
CV (%)	28,94	

^{NS} Não significativo pelo teste Dunnett ($p > 0,05$) na coluna.

Observou-se efeito quadrático com relação ao comprimento *in vitro* das plântulas da cultivar Tropical (FIGURA 2). Por meio da derivada primeira da equação de regressão, houve incrementos no comprimento das plântulas até a dose de 6,5 mg L⁻¹ de BAP, com valor estimado de 3,7 cm e, a partir desse ponto, observaram-se decréscimos com o aumento das doses da citocinina. Oliveira *et al.* (2001) verificaram que o comprimento das plântulas durante a fase de multiplicação foi inversamente proporcional à concentração de BAP, sendo que o menor comprimento, 1,5 cm foi obtido nas doses de 5,0 mg L⁻¹ e 7,5 mg L⁻¹ de BAP. Os autores destacam ainda que estas plantas não são desejáveis no processo de micropropagação devido ao elevado índice de perdas durante a fase de aclimatização. Lima e Moraes (2006) relatam o mesmo comportamento do comprimento dos brotos em relação às doses de BAP, nas cultivares Caipira e Thap Maeo e nos híbridos FHIA 01 e JV03-44. Costa *et al.* (2006), ao avaliarem o efeito de diferentes doses de BAP em associação com o uso do carvão ativado na cultivar Grande Naine, demonstraram que houve efeito negativo dos níveis de BAP em meio desprovido de carvão ativado, o que foi caracterizado pela acentuada redução do comprimento à medida que se elevou a concentração desta citocinina. De acordo com Mok (2000), este fato pode ser atribuído aos efeitos do BAP em quebrar a dominância apical e favorecer a emissão de novos brotos.

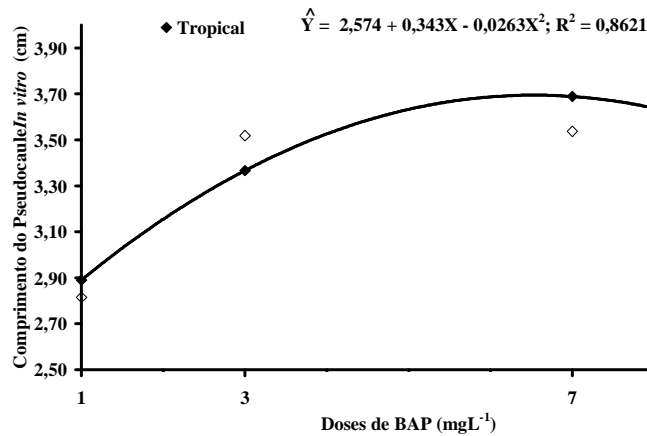


FIGURA – 2 Curva ou análise de regressão para comprimento do pseudocaule *in vitro* de bananeira ‘Tropical’ em função da concentração de BAP.

Na micropropagação de bananeiras, o uso da citocinina BAP tem permitido a multiplicação de plantas em larga escala (CID, 2000). Diversos 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 e MACHADO, 1990; DINIZ *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2006).

Observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) no diâmetro do pseudocaule dos brotos nas condições *in vitro* para a ‘Galil 18’ em relação à testemunha, sendo inferior a mesma (TABELA 5). Ao se observar a análise de desdobramento, verificou-se haver efeito significativo ($p < 0,05$) das doses sobre a característica de diâmetro do pseudocaule nas plântulas para as duas cultivares.

Com base na derivada primeira da equação de regressão (FIGURA 3), estima-se que na concentração de 5,9 mg L⁻¹ ocorreu o maior diâmetro do

pseudocaule dos brotos nas condições *in vitro* para a ‘Galil 18’, com valor estimado de 1,1 cm e, a partir desse ponto, decréscimos foram observados com o aumento das doses de BAP.

TABELA – 5 Diâmetro do pseudocaule na fase de multiplicação *in vitro* de bananeira ‘Tropical’ e ‘Galil 18’ micropropagadas em meio de cultura contendo diferentes concentrações de BAP. Janaúba-MG, 2007.

BAP (mg L ⁻¹)	Diâmetro do pseudocaule (cm)	
	Tropical	Galil 18
1	0,80	0,82*
3	0,87	0,99
7	0,94	1,12
9	0,98	1,00
5 (testemunha)	0,92	1,00
CV (%)	20,12	

*Significativo pelo teste Dunnett ($p < 0,05$) na coluna.

De acordo com a Figura 3, verificaram-se incrementos lineares para o diâmetro do pseudocaule à medida que foram elevadas as doses de BAP na ‘Tropical’. A cada 1,0 mg L⁻¹ de BAP ocorre um acréscimo de 0,0241 cm no diâmetro do pseudocaule dos brotos. Leshem *et al.* (1988) e Lane (1979), citados por Grattapaglia e Machado (1998), relatam que o excesso de citocinina pode ser tóxico aos explantes podendo provocar encurtamento dos entrenós, falta de alongamento das plântulas e engrossamento exagerado dos caules.

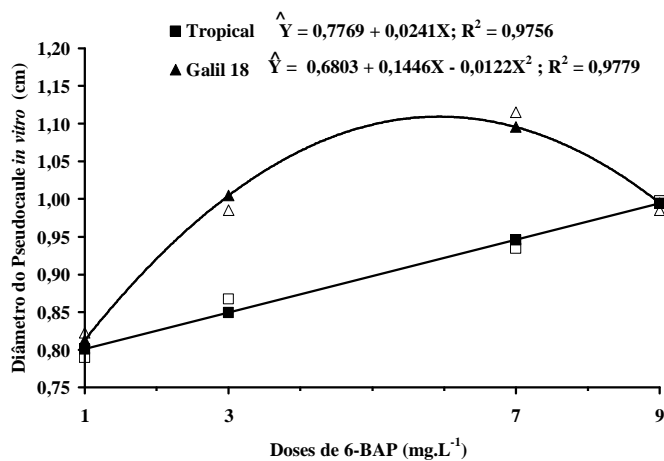


FIGURA – 3 Curva de regressão para diâmetro do pseudocaule *in vitro* das bananeiras ‘Tropical’ e ‘Galil 18’ em função da concentração de BAP.

Trinta dias após aclimatização em telado, não foram observados efeitos significativos ($p > 0,05$) para a característica de comprimento do pseudocaule nas plântulas da ‘Galil 18’. No entanto, a ‘Tropical’ apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) para as doses 3,0 mg L⁻¹ e 7,0 mg L⁻¹ em relação à testemunha (TABELA 6), com valores superiores a esta.

TABELA – 6 Comprimento do pseudocaule na fase de aclimatização de bananeira ‘Tropical’ e ‘Galil 18’ micropropagadas em meio de cultura contendo diferentes concentrações de BAP. Janaúba-MG, 2007.

BAP (mg L ⁻¹)	Comprimento do pseudocaule (cm)	
	Tropical	Galil 18
1	4,30	3,21
3	5,03*	3,17
7	4,95*	3,85
9	4,73	3,22
5 (testemunha)	4,39	3,54
CV (%)	16,31	

*Significativo pelo teste Dunnett ($p < 0,05$) na coluna.

Por meio da derivada primeira da equação de regressão, observou-se que (FIGURA 4) a dose de 5,5 mg L⁻¹ de BAP proporcionou o maior crescimento das plântulas da ‘Tropical’, com valor estimado de 5,16 cm. A partir dessa dose, reduções no comprimento foram observadas. Pereira *et al.* (2005), ao avaliarem o comprimento do pseudocaule em mudas micropropagadas de “Prata Anã” com doses de 5,0 mg L⁻¹ de BAP, aclimatizadas em viveiro durante trinta dias, observaram médias de 4,59 cm.

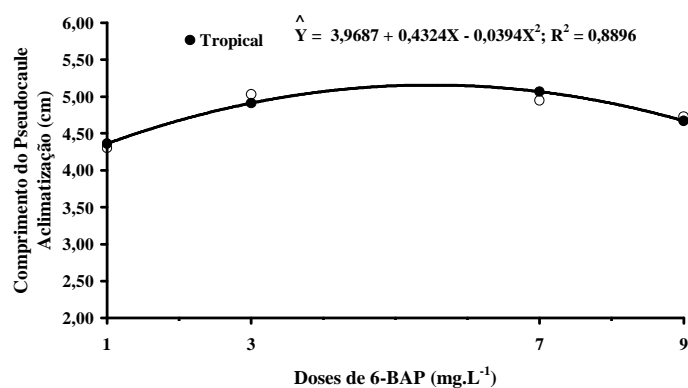


FIGURA – 4 Curva de regressão para comprimento do pseudocaule na fase de aclimatização de bananeira ‘Tropical’ em função das concentrações de BAP.

Para a característica diâmetro do pseudocaule na fase de aclimatização, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) para ambas as cultivares (TABELA 7). Ao se observar a análise de desdobramento, verificou-se que houve efeito significativo ($p < 0,05$) para a cultivar Tropical. Por meio da derivada primeira da equação de regressão, constatou-se que (FIGURA 5) a dose de $5,1 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP proporcionou o maior diâmetro do pseudocaule na fase de aclimatização, com valor estimado de $0,83 \text{ cm}$. A partir dessa dose, reduções foram observadas. Para a cultivar Galil 18, não houve relação entre as doses e o diâmetro do pseudocaule, sendo que a melhor estimativa para o diâmetro do pseudocaule é a média geral de $0,84 \text{ cm}$ em todas as doses utilizadas.

TABELA – 7 Diâmetro do pseudocaule na fase de aclimatização de bananeira ‘Tropical’ e ‘Galil 18’ micropropagadas em meio de cultura contendo diferentes concentrações de BAP. Janaúba-MG, 2007.

Diâmetro do pseudocaule (cm)		
BAP (mg L ⁻¹)	Tropical	Galil 18
1	0,68 ^{NS}	0,84 ^{NS}
3	0,80 ^{NS}	0,86 ^{NS}
7	0,78 ^{NS}	0,89 ^{NS}
9	0,71 ^{NS}	0,79 ^{NS}
5 (testemunha)	0,75	0,85
CV (%)	16,04	

^{NS} Não significativo pelo teste Dunnett (p>0,05) na coluna.

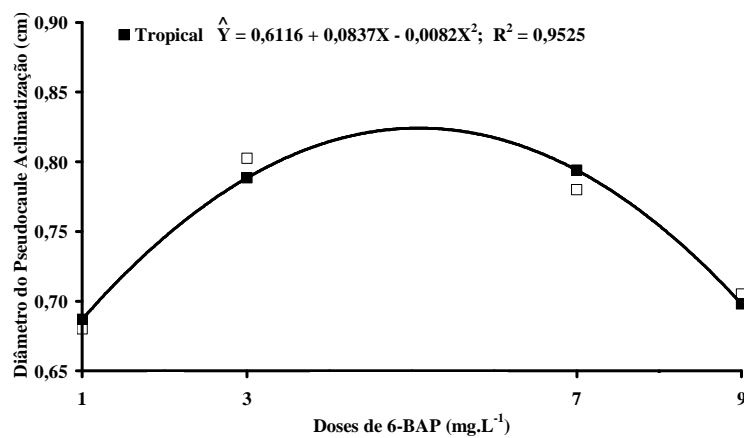


FIGURA – 5 Curva de regressão para diâmetro do pseudocaule (cm) na fase de aclimatização de bananeira ‘Tropical’ em função da concentração de BAP.

Pereira *et al.* (2005) obtiveram média de 0,64 cm de diâmetro ao aclimatizarem mudas da cultivar Prata-Anã em telado por 30 dias. Resultados similares foram obtidos por Costa *et al.* (2007) que, ao avaliarem a relação entre o tempo de enraizamento *in vitro* e o crescimento de plantas de bananeira na aclimatização, utilizando outra citocinina AIB, para as cultivares Caipira, Preciosa e Japira, obtiveram médias de 0,72, 0,82 e 0,77 cm de diâmetro, respectivamente.

Na fase de aclimatização das mudas, período importante e crítico para a sobrevivência das mesmas, observou-se ao final de trinta dias em viveiro, uma taxa de sobrevivência de 97,5% para ‘Tropical’ e de 99,8% para ‘Galil 18’. Oliveira e Silva (1997) e Lima e Moraes (2006) relataram resultados próximos aos obtidos no presente estudo. As médias de sobrevivência durante a fase de aclimatização foram da ordem de 98% para as cultivares Nanicão, Grande Naine, Thap Maeo, Caipira e os híbridos FHIA 01 e PV03-44. Quizen *et al.* (2004) obtiveram taxa de sobrevivência de 85% na fase de aclimatização, que ocorreu em 60 dias. Vários autores sugerem que a presença de raízes e o comprimento adequado das plântulas são fatores fundamentais para o sucesso no pegamento das mudas (BRAGA *et al.*, 2001; DOMINGUES *et al.*, 1995; LIMA e MORAES, 2006).

As plântulas, nas condições *in vitro*, estão sob condições de baixa intensidade luminosa e elevada umidade relativa do ar, apresentando um reduzido fluxo transpiratório. Encontra-se em um estado heterotrófico, em meio supridos de sacarose e nutrientes, além da assepsia do ambiente. Ao passarem para a aclimatização estão sujeitas a uma alta taxa transpiratória (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). A alta transpiração associada à alta condutividade hídrica provoca ausência de controle sobre o fechamento dos estômatos ou uma baixa funcionalidade, podendo provocar altos índices de mortalidade de plântulas aclimatizadas (SUTTER, 1988).

No período de aclimatização e desenvolvimento das mudas em telado não foram observados variantes somaclonais, indicando que o número de subcultivos e doses de BAP não proporcionaram o surgimento de mutantes em ambas cultivares. Estudos realizados por Santos e Rodrigues (2004) também não registraram variantes somaclonais em mudas micropropagadas de bananeira 'Pacovan' até o 5º subcultivo. Segundo Israeli *et al.* (1991), o uso de até seis subcultivos para a micropropagação da bananeira resulta em percentuais de variação somaclonal que não ultrapassam 5%.

4 CONCLUSÕES

- Não há efeitos das doses de BAP para a maioria das características na cultivar Galil 18;
- Concentrações de BAP entre 6,5 mg L⁻¹ e 7,0 mg L⁻¹ promovem a maior produção de mudas e maior taxa de multiplicação *in vitro* na cultivar Tropical, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BERNARDI, W. F. *et al.* 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**, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=>>>. Acesso em: 23 out. 2007.

BRAGA, M. F; LISEI DE SA, M. E; 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, 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**, v.29, n.2, p. 89-94, 1999.

CARNEIRO, M. F. *et al.* Avaliação de produtos na descontaminação de Explantes de Banana (*Musa* AAB cv. MAÇÃ). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.30, n.1, p.29-35, 2000.

CID, L. P. B. Citocininas. In: **Introdução aos hormônios vegetais**. Luis Pedro Barrueto Cid editor. Brasília: EMBRAPA, 180 p. 2000.

CID, L. P. B.; ZIRMMERMANN, M. J. A Contaminação *In Vitro* de Plantas. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 122**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, maio 2006.

COSTA, F. H. S. *et al.* Efeito da Interação Entre Carvão Ativado e N⁶-Belzilaminopurina na Propagação *In Vitro* de Bananeira, c. Grand Naine (AAA). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 280-283, 2006.

CORDEIRO, Z. J. M.; MOREIRA, R. S. A Bananicultura brasileira. In: XVII REUNIÃO INTERNACIONAL ACORBAT 2006, Joinville. **Anais...**Joinville: v. 1, p. 36-47.

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

DINIZ, J. D. N. A. C. *et al.* 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.

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, p. 183-260, 1998.

HINOJOSA, G. F. Auxinas. In: **Introdução aos hormônios vegetais**. Luis Pedro Barrueto Cid editor. Brasília: EMBRAPA, 180 p. 2000.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 jan. 2008.

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

JOSEKUTTY, P. C.; CORNELIUS, S. S.; KILAFWASRU, T. N. Micropropagation of Four Banana Cultivars in Micronesia. **Micronesia Supplement**, v. 7, p. 77-81, 2003. Disponível em:<<http://www.uog.edu/up/micronesica/abstract-supp6-7/pdfs7/77-81Josekutty.pdf>>. Acesso em 08 de dez. 2007.

LEMOS, E. E. P. *et al.* Micropropagação de Clones de Banana cv.Terra em Biorreator de Imersão Temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci>>. Acesso em 23 de out. 2007.

LIMA, J. D.; MORAES, W. S. Concentração de benzilaminopurina e avaliação de protocolo para multiplicação *in vitro* de genótipos de bananeira. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 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, dez. 1996.

MOK, M. C.; MARTIN, R. C.; MOK, D. W. S. Cytokinins: biosynthesis, metabolism and perception. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Columbia, v.36, p.102-107, 2000.

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

NIETSCHKE, S. *et al.* Estabelecimento *In Vitro* de Explantes de Três Cultivares de Bananeira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.3, p.989-991, 2006.

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, jan.-mar 2001.

PEREIRA, M. C. T. *et al.* Aclimatização de mudas micropropagadas de bananeira sob diferentes condições de luminosidade. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 238-240, 2005.

POCASANGRE, L. *et al.* Micropropagación de híbridos tetraploides y cultivares triploides de banano. In: FUNDACIÓN HONDUREÑA DE INVESTIGACIÓN AGRÍCOLA. Programa de banano e platano. La Lima: FHIA, 1994. p.36-39. Informe Técnico.

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.

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.

SANDOVAL, J.A.F.; BRENES, G.G.; SANCHEZ, L.P. Micropropagación de platano y banano (*Musa* AAB, AAA) en el Catie. **Turrialba**. Costa Rica: Catie, 1991. 29 p.

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.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT User's guide**. Version 8. Cary: NC, 2000.

SILVA, J. R.; CORDEIRO, Z. J. M. Fitossanidade na exportação de banana. In: CORDEIRO, Zilton José Maciel. (Org.). **Banana. Fitossanidade**. Brasília: EMBRAPA, 2000. p. 09-14.

SUTTER, E. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry, and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. Davis, v. 113, n. 2, p. 234-238, 1988.

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.

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

WHITE, P. R. Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient medium for cultivation of excised tomato roots. **Growth**, [S.l.], v. 7, p. 53-65, 1943.

ZAERR, J.B.; MAPES, M.O. Action of growth regulators. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Ed.). *Tissue culture in forestry*. Dordrecht: Martinus Nijhoff Pub., 1985. p. 231-255.