

REASSEPSIA *IN VITRO* DE EXPLANTES DE BANANA 'FARTA VELHACO' E 'WILLIAMS'

Talita Lopes Pereira¹

Dayane Ávila Fernandes²

RESUMO - Um dos fatores que interferem no sucesso da micropropagação é a contaminação microbiana, e alguns protocolos de desinfestação (asepsia) são realizados antes da fase de estabelecimento do cultivo, para que a contaminação não comprometa o trabalho da micropropagação. Mesmo colocando todos os protocolos de uma asepsia regular dentro dos laboratórios, nem sempre é possível contornar inteiramente as contaminações pelos microrganismos, o que acaba acarretando uma perda de explantes no estabelecimento da cultura. O trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da reassepsia nos explantes das cultivares de banana Williams (nanica) e Farta velhaco (terra). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado constituído de três tratamentos e sete repetições, sendo cada uma destas representada por 4 explantes para farta vellhaco e apenas 1 explante para Williams, em diferentes concentrações de cloro ativo durante quinze minutos, quais sejam: T1 – (3:1) água destilada e hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo; T2 – (1:1) água destilada e hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo; T3 – (3:1/1:1) água destilada e hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo. Foram avaliadas as porcentagens de contaminação por bactérias. Os dados foram submetidos às análises de variância. Os resultados permitiram concluir que não houve eficiência dentre os tratamentos testados. Concluiu-se que independente das soluções, não houve eficiência no controle de contaminações para micropropagação de bananeira 'Farta Velhaco' e 'Williams'.

Palavra-chave: *Musa sp.*. Micropropagação. Contaminação.

IN VITRO REASSEPSIA OF BANANA EXPLANTS 'VELHACO FARM' AND 'WILLIAMS'

ABSTRACT- One of the factors that interfere in the success of micropropagation is microbial contamination, and some disinfestation protocols (asepsis) are carried out before the stage of establishing the crop, so that contamination does not compromise the work of micropropagation. Even by putting all the protocols of a regular asepsis inside the laboratories, it is not always possible to completely circumvent contaminations by microorganisms, which leads to a loss of explants in the establishment of culture. The objective of this study was to evaluate the efficiency of re-asepsis in the explants of banana Williams (nanica) and Farta rogue (land) cultivars. The experimental design was completely randomized, consisting of three treatments and seven replications, being each one of them represented by 4 explants for farta vellhaco and only 1 explant for Williams, in different concentrations of active chlorine during fifteen minutes, which are: T1 - (3: 1) distilled water and sodium hypochlorite 2.5% active . The objective of this study was to evaluate the efficiency of re-asepsis in the explants of banana Williams (nanica) and Farta rogue (land) cultivars. The experimental design was completely randomized, consisting of three treatments and seven replications, being each one of them represented by 4 explants for farta vellhaco and only 1 explant for Williams, in different concentrations of active chlorine during fifteen minutes, which are: T1 - (3: 1) distilled water and sodium hypochlorite 2.5% active chlorine; T2 - (1: 1) distilled water and sodium

¹ Discentes do curso de Agronomia do Univag Centro Universitário. email: taly.int@gmail.com.

² Docente do curso de Agronomia do Univag – Centro Universitário. email: dayavila1@hotmail.com.

hypochlorite 2.5% active chlorine, T3 - (3: 1/1: 1) distilled water and 2.5% sodium hypochlorite active chlorine. The percentages of contamination by bacteria were evaluated. Data were submitted to analysis of variance. The results allowed to conclude that there was no efficiency among the treatments tested. It was concluded that, regardless of the solutions, there was no efficiency in the control of contamination for micropropagation of banana 'Farta Velhaco' and 'Williams'.

Keywords: Musa sp .. Micropropagation. Contamination.

1 INTRODUÇÃO

A banana (*Musa spp.*) é uma das principais frutas consumidas in natura no mundo, possuindo uma estimativa de produção no Brasil de 6.844 milhões de toneladas e área de aproximadamente 484.430 mil hectares, sendo o crescimento da cultura cerca de 21,9% na safra de 2015 em comparação com a do ano anterior (IBGE, 2016).

Em Mato Grosso, apesar de ter excelentes condições adafoclimáticas para a produção de bananas, houve redução nas áreas plantadas de 56.247 ha em 1997 para 6.268 ha em 2010, devido à falta de controle fitossanitário, ausência de geração de novas tecnologias e mão de obra qualificada, fatos que acabaram reduzindo a longevidade dos bananais, deixando-os mais suscetíveis a doenças, pragas e nematoides (ANDRADE, 2012).

Para atender com maior eficiência e rapidez os pomares dos produtores, e tendo em vista que o sistema de produção convencional de mudas é demorado e de rendimento inferior (BRAGA et al., 2001), a utilização da micropropagação é uma boa alternativa para suprir a demanda de mudas com uma melhor qualidade (BERNARDI et al., 2006).

Método de cultivo de explantes em meio artificial sob condições específicas de luminosidade, temperatura e fotoperíodo (RIOS et al., 2005), que comparado aos demais, possui mais vantagens, sendo a sua produção de 150 a 300 mudas/matriz, obtendo-se assim um pomar com uniformidade e sincronia na colheita, que podem se manter livres de pragas e doenças por maior período de tempo durante os ciclos de cultivo (ALVES et al., 2004).

Um dos fatores que interferem no sucesso da micropropagação é a contaminação microbiana, e alguns protocolos de desinfestação (asepsia) são realizados antes da fase de estabelecimento do cultivo, para que a contaminação não comprometa o trabalho da micropropagação. Este índice de contaminação pode ser resultante do próprio material vegetal advindos do campo ou do manuseio em laboratório (DEBERGH; ZIMMERMAN 1991).

Microrganismos contaminantes provocam danos diretos e indiretos no explante pela colonização de seus tecidos, por competir nutrientes de seu meio de cultura, eliminando metabólitos tóxicos às plantas (MONTARROYOS, 2000), é frequente se deparar com contaminações presentes no interior dos tecidos, conhecida como contaminação endógena, mais frequente em explantes derivados de plantas cultivadas no campo.

A contaminação por bactérias acontece, geralmente, devido à contaminação endógena dos explantes e plântulas, e as contaminações endógena são de difícil desinfestação, por isso a utilização de plantas que venham de locais mais controlados é indispensável (CORDEIRO et al., 2006).

Na fase de desinfestação, é comum o uso de substâncias como hipoclorito de sódio, Tween 20, álcool 70% e, em alguns casos à adição de antibióticos ao meio de cultura (GARCIA e RAFAEL, 1990; LEIFERT et al., 1991)

O hipoclorito de sódio é uma das substâncias mais utilizadas entre os agentes germicidas, por ser facilmente encontrado como alvejante comercial, é o mais usado em laboratórios de cultura de tecidos (GRATAPAGLIA e MACHADO, 1998). Utilizado na remoção de microrganismos contaminantes superficiais de material e do ambiente (COUTINHO et al., 2000), é essencial à utilização de um protocolo de desinfestação adequado, de acordo com a sensibilidade do tecido do cultivar (CHAVES et al., 2005), em um trabalho realizado na cultura costela de Eva (*Monstera obliqua*) Zanca et al. (2013), observaram em um dos seus tratamento a eficiência da reasepsia com o hipoclorito de sódio associado ao etanol.

Mesmo colocando todos os protocolos de uma assepsia regular dentro dos laboratórios, nem sempre é possível contornar inteiramente as contaminações pelos microrganismos, o que acaba acarretando uma perda de explantes no estabelecimento da cultura. Diante da incidência de contaminação após o estabelecimento da cultura, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da reasepsia nos explantes das cultivares de banana Williams (nanica) e Farta velhaco (terra).

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Empresa Mato-grossense de Pesquisa, Assistência e Extensão Rural (EMPAER-MT), localizado no município de Várzea Grande-MT, de abril a junho de 2018.

Utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com três tratamentos e sete repetições, em um total de 21 parcelas experimentais, sendo a williams constituídos por um explante, e farta velhaco por quatro explantes cada parcela. Cada parcela foi constituída de frasco de vidro de 220 ml com tampa de plástico, sendo 21 frascos para Williams e 84 para Farta velhaco.

- Tratamento 1: água destilada e hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo na proporção de 3:1, por 15 minutos;

- Tratamento 2: água destilada e hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo na proporção de 1:1, por 15 minutos e;

- Tratamento 3: água destilada e hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo na proporção de 3:1, por 15 minutos e outra imersão 1:1, por mais 15 minutos.

As mudas de bananeiras das cultivares 'Williams' e 'Farta Velhaco' do tipo chifrinho, foram obtidas de pomares comerciais de propriedades em Sinop e em Chapada dos Guimarães.

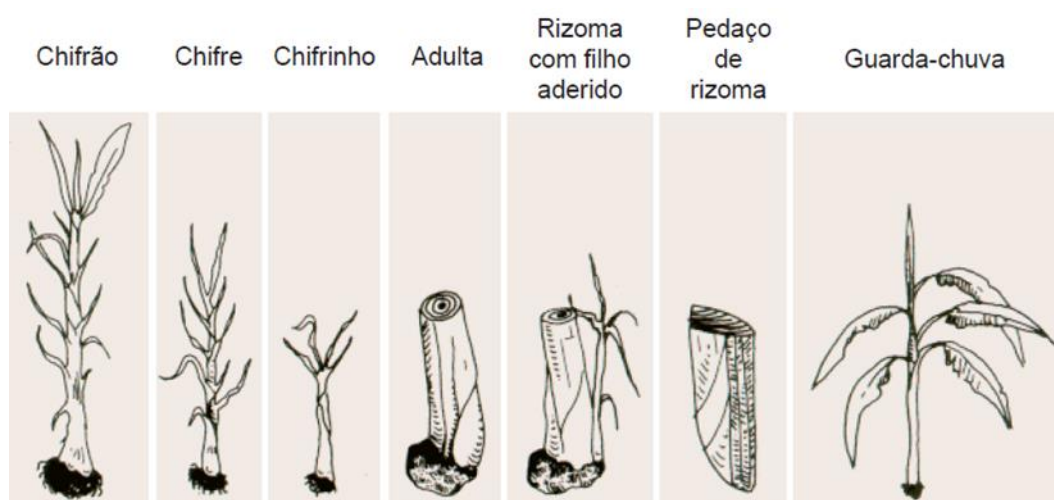


Figura 1 - Esquema de mudas de bananeira utilizadas como material propagativo. Fonte: ECHEVERRI-LOPEZ; GARCIA-REIS, 1977.

A realização da assepsia e estabelecimento da cultivar williams foi realizada pelo laboratório de mudas da Empaer, sendo após 15 dias, retirados dos lotes os frascos identificados 'contaminados' e realizado o procedimento de reassespsia dos explantes.

Após a chegada das mudas de farta velhaco, foi realizada a limpeza mecânica (corte) dos explantes, removendo parte dos rizomas e pseudocaule, com auxílio de faca, até o tamanho aproximado de 5 cm de altura por 1,5 cm de diâmetro, obtendo-se um cilindro formado pelo ápice caulinar (3 cm de pseudocaule e 2 cm de rizoma). Após a limpeza (corte) foi realizada a

assepsia conforme protocolo do laboratório, sendo os explantes imersos em solução de água destilada e hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo na proporção de 3:1, por 15 minutos. Posteriormente foi feita a retirada da camada externa do explante (cortes feitos com faca), após a redução foi realizada a segunda imersão dos explantes em solução de água destilada e hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo na proporção de 1:1 por mais 15 minutos.

Em seguida os explantes foram levados para a câmara de fluxo laminar, onde foram submetidos a tríplice lavagem com água destilada, e última retirada da camada externa por meio de pinça e bisturi, após todo o processo de assepsia realizou-se a inoculação do explante em meio de cultura MS, que é suplementado com sacarose a 30 g L^{-1} e solidificante phytigel a $2,5 \text{ g L}^{-1}$, com pH ajustado para $5,8 \pm 1$ antes da autoclavagem (esterilização), a $120 \text{ }^\circ\text{C}$, com 1 Kg cm^{-2} durante vinte e cinco minutos (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Nesta fase de estabelecimento os frascos com explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ no escuro.

Após o período de quinze dias para a Williams e uma semana para a Farta Velhaco, os explantes foram redirecionados para a sala de câmara de fluxo laminar para a realização da reassepsia, foram retirados do meio de cultura MS, com auxílio de pinças e imersos individualmente em frascos com soluções dos tratamentos.

O tempo de imersão foi de acordo com a metodologia de Carneiro et al. (2000). Em seguida foi realizada com o auxílio de béquer uma tríplice lavagem com água destilada, para retirada do excesso de hipoclorito, e sobre um papel realizados cortes por meio de pinças e bisturis para retirada da camada externa dos explantes, inoculados novamente em meio de cultura MS, e direcionados novamente para a sala de crescimento com ausência de luz, onde os frascos com explantes foram mantidos em uma temperatura $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ no escuro.

Os critérios de avaliação visual utilizados para determinar a contaminação dos frascos foram às alterações visuais no meio de cultura, como turbidez e colônias de bactérias.

As avaliações foram de sete e quinze dias, período esse que ainda compreende a fase de estabelecimento da cultura. Foram avaliadas as porcentagens de contaminação bacteriana. No lote de bananeiras Williams realizou-se a seleção de frascos que foram considerados 'contaminados' para que estes pudessem compor os tratamentos. Tal procedimento ocorreu aos 15 dias após a data de estabelecimento *in vitro*. No lote de bananeiras Farta Velhaco o procedimento de seleção dos frascos considerados 'contaminados' e a reassepsia ocorreram semanalmente durante quatro semanas consecutivas.

Para análise de dados realizou-se a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As contaminações ocorridas foram exclusivamente bacterianas. A partir do quarto dia do estabelecimento *in vitro* o crescimento bacteriano em torno dos explantes já podia ser visualizado. Aos 15 dias, quase 100% deles apresentavam sinais visuais de contaminação avançada. De acordo com a análise de variância não houve diferença significativa entre os tratamentos, onde as médias dos tratamentos foram superiores a 95% de contaminação para ambas cultivares.

A qualidade da assepsia, está relacionada diretamente à obtenção dos rizomas nas planta-matrizes. Deve-se ser levado como critério na obtenção dos rizomas o histórico destas plantas, tais como: a idade fitossanitária, local (áreas de cultivo sucessivo e áreas de bananais velhos) e o histórico de doenças.

Os resultados obtidos no experimento foram diferentes dos resultados de Zanca et al. (2013), onde a desinfestação dos explantes de segmentos nodais da costela de Eva (*Monstera obliqua*), utilizou-se uma assepsia com a combinação de Etanol 70% e hipoclorito de sódio a 2% por 15 minutos, sendo eficaz somente quando realizaram-se uma reassepsia do material contaminado, com os mesmos desinfestantes. Chaves et al. (2004), em cerejeiras (*Prunus sp*), observou-se um baixo índice de contaminação em explantes tratados com hipoclorito de sódio nas concentrações 0,5%, 1%, 1,5% e 2%.

Em um trabalho realizado por Pereira et al. (2015), com objetivo de realizar a assepsia dos explantes *in vitro* da bananeira ‘Farta velhaco’, no tratamento de hipoclorito de sódio a 1,0% de cloro ativo, obteve-se 95% dos explantes não contaminados por bactérias. Já em outro trabalho Pereira et al. (2011), verificou 0% de contaminação dos explantes da bananeira ‘Grande Naine’, com o tratamento de hipoclorito de sódio a 2,0% de cloro ativo. Sendo utilizado no primeiro experimento mudas oriundas de jardim clonal, e no segundo mudas oriundas de clones da *Musa sp cv.* ‘Grande Naine’. Não corroborando com os resultados obtidos com o presente trabalho.

A contaminação bacteriana possui uma variação que pode estar associada à infinidade de microrganismos encontrados no ambiente natural que podem infiltrar no tecido vegetal, as bactérias são capazes de penetrar por aberturas naturais ou por ferimentos causados por insetos

ou animais, nos tecidos vegetais (SCHERWINSKI-PEREIRA; ALTERTHUM, 2010). Contudo a presença de bactérias como prováveis contaminantes endógenos acaba a acarretar perdas nos explantes *in vitro*, uma vez que, não sendo eliminadas pela substância utilizada na assepsia, elas poderão permanecer latentes (PEREIRA et al., 2003). Desse modo, podem inviabilizar o seu uso como explante secundário para a etapa de multiplicação *in vitro*.

Sendo contaminação endógena advinda dos problemas fitossanitários da planta-matriz, esta, afeta diretamente a qualidade da assepsia dos explante. Este tipo de problema é de difícil observação no campo, pois a sua manifestação não é aparente. Segundo Leifert et al. (1994), contaminantes endógenos não causa nenhum sintoma aparente nas plantas em campo, sendo assim mais difíceis de serem controlados, porém podem se desenvolver durante as fases da micropropagação, pois o seu desenvolvimento fica mais fácil em condições de meio com pH, sais e sacaroses concentrados, pois os favorecem. Desta maneira, o aparecimento em fases seguintes ao estabelecimento *in vitro* pode gerar uma grande perda de material vegetal, tempo de trabalho e conseqüentemente o aumento dos custos de produção.

CONCLUSÃO

Concluiu-se que independente das soluções, não houve eficiência no controle de contaminações para micropropagação de bananeira 'Farta Velhaco' e 'Williams'.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, J. E.; LIMA, M. B.; TRINDADE, A. V. **Mudas micropropagada**. Agência de informação Embrapa banana, Brasília-DF, 2004. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia40/AG01/arvore/AG01_8_41020068054.html. Acesso em: 02 de maio. 2018.

ANDRADE, L. A. Tecnologias de produção para a cultura da banana no estado de Mato Grosso: Tangara da Serra. Informativo. MT, v.1, n° 2, p. 01-04, 2012.

BERNARDI, W. F. et al., Micropropagação de baixo custo em bananeira cv. maçã em meios com diferentes fontes de carbono e avaliação de performance em campo das mudas produzidas. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaticabal-SP. v. 26, n. 26, n. 3. p. 503-506, 2006.

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

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

CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Estabelecimento e multiplicação in vitro de *Physalis peruviana* L. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.29, n.6, p.1281-1287, 2005.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; FILHO, P. E. **Doenças e métodos de controle**. Agência de informação Embrapa banana. Brasília-DF, 2006. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia40/AG01/arvore/AG01_44_41020068055.htm. Acesso em: 10 de maio, 2018.

COUTINHO, W. M.; PEREIRA, L. A. A. SILVA, O. F.; PENA, R. C. M.; MAGALHÃES, F. H. L. Efeitos de hipoclorito de sódio na germinação de conídios de alguns fungos transmitidos por semente. *Revista Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 25, n. 3, p. 552-555, 2000.

DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H.; *Micropropagation. Technology and Application*. London: Kluwer Academic Publishers, ed.1, p. 48, 1991.

ECHEVERRI-LOPEZ, M.; GARCIA-REIS, E. Influencia de la classe de material de siembra sobre la producción de plátano. In: RUIZ CAMACHO, R. (Org.). **Manual para el cultivo del banano y plátano**. Bogotá, p. 136-148, 1977.

GARCIA, E. V.; RAFAEL, M. Control de la oxidacion y contaminacion em microesquejes de café (*Coffea arabica* “Catimor”) cultivados in vitro. *Agronomia Tropical*. **Revista de Investigación**, Venezuela, v.40, p. 281-290, 1990.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, DF: Embrapa-SPI, v. 1, p. 183-260, 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2016. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2013-agencia-de-noticias/releases/9812-pesquisa-agricola-municipal-records-de-producao-de-soja-e-milho-impulsionam-agricultura-em-2015.html>. Acesso em: 02 de maio. 2018.

LEIFERT, C., RITCHIE, J. Y., WAITS, W. M. Contaminants of plant-tissue and cell cultures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 7, p. 452-69, 1991.,

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.

MONTARROYOS, A. V. V. Contaminação in vitro. *ABCTP Notícias*, Brasília, n. 36-37, p.5-10, 2000.

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

PEREIRA, G. A.; BOLIANI, A. C.; CORREA, L. S. Desinfestação e estabelecimento in vitro de explante de bananeira ‘Thap mao’ (sub grupo AAB) Submetidos a concentrações de cloro ativo. **Comunicata Scientae**. Bom Jesus. v. 6, n. 4, p. 412-417, 2015.

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

PEREIRA, 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. **Revista Brasileira Agropecuaria**, Brasília, v. 38, n. 7, p. 827-834, 2003.

RIOS, S. A. et al., Protocolos de assepsia e comprimento de explantes de bananeira ‘Prata anã’ sobre a produção de mudas por micropropagação. **Unimonte científica**, Montes Claros, v.10, 1-2, p. 47-52, 2008.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; ALTERTHUM, F. Detecção, isolamento e preservação de microrganismos contaminantes da cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (editor técnico). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 163-185, 2010.

ZANCA, S. S.; ZAFFARI, G. R. Micropropagação de *monstera obliqua* miq in vitro. **Plant Cell Cult. Micropropag.** Lavras. v. 9, n. 1-2, p. 9-16, 2013.