

AVALIAÇÃO DE PRODUTOS NA DESCONTAMINAÇÃO DE EXPLANTES DE BANANA (*Musa* AAB cv. MAÇÃ)¹

Maurízia de Fátima Carneiro², Gilson Dourado da Silva³, Paulo Alcanfor Ximenes⁴, Iraídes Fernandes Carneiro⁴ e Jácomo Divino Borges²

ABSTRACT

EVALUATION OF DESCONTAMINATION PRODUCTS, IN EXPLANTS OF BANANA (*Musa* AAB cv. MAÇÃ)

This experiment was accomplished in the tissue culture laboratory at Setor de Horticultura, Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil, from May to August 1999. Some products were evaluated concerning their potential control of endogenous fungi and bacteria on banana explants of *Musa* AAB cv. Maçã *in vitro* culture. The following products and respective concentrations were evaluated. NaOCl at 10^3 , $3 \cdot 10^3$ and $5 \cdot 10^3$ mg L⁻¹; benomyl at 100, 200 and 300 mg L⁻¹; cefotaxim at 100, 200 and 300 mg L⁻¹ and rifampicin at 100, 200 and 300 mg L⁻¹. The results showed that cefotaxim at 300 mg L⁻¹ retarded the contamination of explants in the initial phase of implantation and reduced of bacteria and fungi infestation.

KEY WORDS: Banana-maçã, tissue culture, contamination agents, fungicides, bactericides.

RESUMO

Este experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos do Setor de Horticultura da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás, em Goiânia, (GO), no período de maio a agosto de 1999. Alguns produtos foram avaliados quanto ao controle potencial de bactérias e fungos endógenos em explantes de banana *Musa* AAB cv. Maçã, em cultura de tecidos. Foram avaliados os seguintes produtos e respectivas concentrações: NaOCl a 10^3 , $3 \cdot 10^3$ e $5 \cdot 10^3$ mg L⁻¹; benomyl a 100, 200 e 300 mg L⁻¹; cefotaxima a 100, 200 e 300 mg L⁻¹ e rifampicina a 100, 200 e 300 mg L⁻¹. Os resultados mostraram que a cefotaxima a 300 mg L⁻¹ retardou a contaminação dos explantes na fase inicial de implantação, reduzindo a infestação com bactérias e fungos.

PALAVRAS-CHAVES: Banana-maçã, cultura de tecidos, agentes contaminantes, fungicidas, bactericidas.

INTRODUÇÃO

O desempenho do Brasil, em termos de produção para consumo de banana *in natura*, em relação aos países maiores produtores, é de 9,8%, sendo considerado o segundo maior produtor mundial (FAO 1998). O cultivo ocorre de Norte a Sul do país, desde sua faixa litorânea até os planaltos interiores, com uma produção de 5,78 milhões de toneladas, em 1997 (Álvares 1998). Em Goiás, a bananicultura representa uma importante atividade agrícola, sendo a principal atividade da fruticultura, ocupando uma

área cultivada de 10.910 ha e uma produção de 169.950 toneladas, em 1992, participando com 2,0% da produção nacional (Carneiro 1997). A mesma autora salienta que a cultivar Maçã já dominou os plantios, no Estado de Goiás, até os anos de 1980, mas vem apresentando um decréscimo na produção, por apresentar grande susceptibilidade ao mal-do-panamá (*Fusarium oxysporum* F. Smith f. sp. *cubense* Snyder & Hansen).

A propagação da bananeira é feita normalmente por via vegetativa, através de mudas extraídas de plantas já desenvolvidas, o que tem facilitado a

1. Entregue para a publicação em abril de 2000

2. Doutorandos do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Goiás. Agência Rural. Cx. Postal 331 - CEP 74 610-060, Goiânia-GO. E-mail: maurizia@uol.com.br

3. Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Unesp-Jaboticabal, SP.

4. Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás. C. Postal 131- CEP 74001-970, Goiânia -GO.

disseminação de certos patógenos. Aliada a este problema, a necessidade de uma grande quantidade de materiais para plantio tem estimulado a multiplicação de clones promissores, pelo uso de técnicas de propagação rápida com menor taxa de multiplicação (Álvares 1998).

A grande limitação da micropropagação da bananeira é a alta incidência de contaminação fúngica e/ou bacteriana, proveniente do explante ou do meio ambiente. A contaminação por bactérias é considerada a mais importante (Cassel 1987, Leifert *et al.* 1991, Hamill *et al.* 1993). Grattapaglia & Machado (1998) e Torres *et al.* (1998) recomendam o uso de fungicidas e antibióticos tanto para a desinfestação quanto, adicionados ao meio de cultura, para o controle da contaminação por fungos e bactérias endógenos da bananeira.

Para Pollock *et al.* (1983), o fungicida tem de apresentar um amplo espectro de ação, ser pouco tóxico para as culturas (nas concentrações necessárias para controlar os fungos), devendo ser adicionado ao meio de cultura antes da autoclavagem, nas dosagens recomendadas para cada espécie vegetal, para eliminar a contaminação fúngica.

Os antibióticos são usados para o controle de contaminações bacterianas endógenas, que representam sério problema no estabelecimento das culturas. Os explantes, depois de reduzidos os contaminantes superficiais, podem ser transferidos para meio nutritivo contendo antibiótico (Grattapaglia & Machado 1998). Esses autores citam que o antibiótico deve ser esterilizado a frio e adicionado ao meio antes da sua solidificação, e também apresentar um amplo espectro de ação. Os antibióticos mais usados em cultura de tecidos vegetais possuem ação bacteriostática e não bactericida.

Em laboratórios comerciais de micropropagação de plantas, Leifert *et al.* (1991) identificaram 293 espécies de bactérias, das quais 13% pertenciam ao gênero *Bacillus*. As espécies deste gênero formam endósporos resistentes ao álcool e ao calor, podendo, inclusive, ser disseminadas pelo álcool utilizado na esterilização dos instrumentos e resistir à flambagem e à autoclavagem do meio de cultura, por 20 minutos a 110°C (Boxus & Terzi 1987, Nannetti 1994).

A contaminação fúngica pode ser eliminada através do benomyl (Haldeman *et al.* 1987), e o controle de bactérias endógenas pode ser efetivado através da ampicilina, da carbecilina, da rifampicina, da trimetropina, da polimixina e da cefotaxima, em diferentes concentrações (Torres *et al.* 1998).

Segundo Carneiro (1997), a descontaminação de explantes iniciais de banana da cultivar Maçã pode ser feita com NaOCl a $3,5.10^3$ mg L⁻¹, por um período de 20 minutos, com simples ou dupla esterilização, resultando em índices abaixo de 30% de contaminação dos explantes.

O presente trabalho teve como objetivo testar diferentes produtos (antibióticos e fungicidas) em diferentes concentrações, visando ao controle de bactérias e fungos, em cultura *in vitro* de *Musa* AAB cv. Maçã.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Setor de Horticultura da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás, no período de maio a junho de 1999.

O material vegetal usado para propagação *in vitro* foi a bananeira *Musa* AAB cv. Maçã, proveniente de lavouras comerciais, localizadas no município de Brazabrantes, Estado de Goiás. Neste experimento foram usados meristemas da porção do rizoma, retirados de mudas tipo “chifrinho”, com altura aproximada de 30 cm.

As mudas obtidas no campo foram levadas ao laboratório para retirada de explantes de 4 cm de altura por 4 cm de espessura, e imediatamente lavado em água corrente. Em seguida, eles passaram por um processo de redução de tamanho para 2 cm de altura por 2 cm de espessura, sendo desinfestados em solução de hipoclorito de sódio a 10³ e Tween 20 (30 gotas/L) durante 30 minutos. Logo após, foram conduzidos em câmara de fluxo laminar e enxaguados três vezes com água destilada e esterilizada.

Os explantes, após a desinfestação, foram reduzidos a 0,8 cm de altura por 0,5 cm de espessura e transferidos para o meio de cultura MS (Murashige & Skoog 1962), suplementado com 3% de sacarose, 0,7% de agar e 0,01% de mioinositol, e com seu pH ajustado para 5,8 (Carneiro, 1997) e autoclavado a 121°C durante 20 minutos, previamente à transferência dos explantes.

Para o controle de fungos e bactérias endógenos foram utilizados um fungicida e dois antibióticos, adicionados ao meio de cultura em três diferentes concentrações, e o hipoclorito de sódio para imersão dos explantes por um período de 20 minutos conforme especificado na Tabela 1.

Os antibióticos foram esterilizados a frio e adicionados ao meio de cultura antes da sua solidificação, enquanto o fungicida foi adicionado ao

meio antes da autoclavagem (Grattapaglia & Machado 1998). O meio de cultura, assim preparado, foi distribuído em tubos de ensaios, na quantidade de 10 ml por tubo, e, logo após, foram vedados com papel alumínio. No caso do hipoclorito de sódio, as soluções foram preparadas nas concentrações citadas, nos quais os explantes permaneceram por 20 minutos. Em seguida, foram lavados em água destilada e esterilizada, por três vezes e colocados em tubos de ensaio com 10 ml do meio MS.

Tabela 1. Produtos e dosagens utilizados para o controle de fungos e bactérias em *Musa* AAB cv. Maçã, *in vitro*, em condições controladas. Goiânia, GO. 2000.

Produtos	Concentrações (mg L ⁻¹)	Ação
benomyl	100; 200; 300	Fungicida
rifampicina	100; 200; 300	Bactericida
cefotaxima	200; 300; 400	Bactericida
hipoclorito de sódio	10 ³ ; 3.10 ³ ; 5.10 ³	Bactericida e Fungicida

A inoculação foi feita em câmara de fluxo laminar, colocando-se um explante por tubo, sendo este vedado com filme plástico transparente. Os tubos foram mantidos, durante dez dias, em uma câmara escura com o objetivo de evitar a oxidação dos explantes. Após este período, o experimento foi conduzido em uma câmara de crescimento com temperatura de 28°C ± 2°C e com fotoperíodo de 16 horas.

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com 12 tratamentos e 15 repetições, totalizando 180 parcelas. Cada repetição foi representada por um explante. As avaliações da eficácia dos produtos foram feitas durante 30 dias. As leituras para verificar a ocorrência de explantes contaminados foram realizadas a cada dois dias, o que possibilitou determinar a velocidade de contaminação e as porcentagens de patógenos contaminantes. Na interpretação dos resultados, utilizaram-se a regressão, para determinar a velocidade de infestação, e o teste do qui-quadrado para verificar significância entre os produtos e as concentrações usadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados desta pesquisa sobre o controle

de fungos e bactérias, feito através dos produtos químicos avaliados em explantes de bananeiras (*Musa* AAB cv. Maçã), podem ser analisados através da Tabela 2 e das Figuras 1 a 5. Constatou-se o desenvolvimento do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* e da bactéria *Erwinia* sp., ambos contaminantes endógenos, em todos os tratamentos, havendo uma diferença de ação dos produtos para todas as avaliações realizadas. Entretanto, a contaminação do meio de cultura por agentes externos foi pequena.

As menores taxas de contaminação bacteriana, em relação às contaminações fúngicas, foram nos tratamentos NaOCl, cefotaxima e rifampicina. O tratamento com 300mg L⁻¹ de cefotaxima foi o que apresentou maior eficiência, com 73,33% dos explantes não contaminados (Tabela 2 e Figura 1). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Torres *et al.* (1998), que recomendam o controle de bactérias endógenas através dos produtos ampicilina, carbecilina, rifampicina, trimetropina, polimixina e cefotaxima, em diferentes concentrações. No entanto, o uso de cefotaxima pode elevar o custo de produção de mudas *in vitro*, pelo seu elevado custo de aquisição, se comparado com NaOCl e benomyl.

O tratamento NaOCl, nas concentrações estudadas, promoveu a descontaminação bacteriana em níveis inferiores a 33,33% dos explantes de bananeira, indicando uma ação eficaz sobre as bactérias, mas não foi eficiente no controle dos fungos, que apresentaram infestação acima de 45% (Figura 1). Carneiro (1997), trabalhando com a cultivar Maçã, também obteve uma descontaminação dos explantes iniciais em índices próximos (30%) aos obtidos nesta pesquisa, com utilização de NaOCl, na concentração de 3,5.10³, por um período de 20 minutos.

Nota-se que os tratamentos não eliminaram a contaminação dos explantes (Tabela 2), embora o antibiótico cefotaxima, na concentração de 300 mg L⁻¹, tenha controlado satisfatoriamente o desenvolvimento de patógenos, apresentando, apenas, 26,67% de contaminação fúngica (Figura 1). Apesar de o benomyl ser um fungicida indicado para o controle de fungos em meio de cultivo, observou-se que, nas concentrações utilizadas, este produto não foi eficiente no controle dos agentes patogênicos de explantes de bananeira da cultivar Maçã (Tabela 2 e Figura 1). Estes dados são contraditórios com os resultados obtidos por Haldeman *et al.* (1987), nos quais foi observada a eliminação da contaminação fúngica pelo uso do benomyl.

Tabela 2. Tratamentos, concentrações, número e percentagem de explantes de bananeira (*Musa* AAB cv. Maçã) infectados por fungos e bactérias. Goiânia, GO. 2000.

Tratamentos	Concentrações (mg L ⁻¹)	Nº explantes contaminados	Nº explantes não contaminados
NaOCl	10 ³	13ab ¹	2
	3.10 ³	12 ab	3
	5.10 ³	9 b	6
Benomyl	100	14 a	1
	200	11 ab	4
	300	14 a	1
Cefotaxima	100	9 b	6
	200	10 ab	5
	300	4 c	11
Rifampicina	100	12 ab	3
	200	15 a	0
	300	12 ab	3
χ^2		34,933*	

1. Números seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste do χ^2 , a 5% de probabilidade.

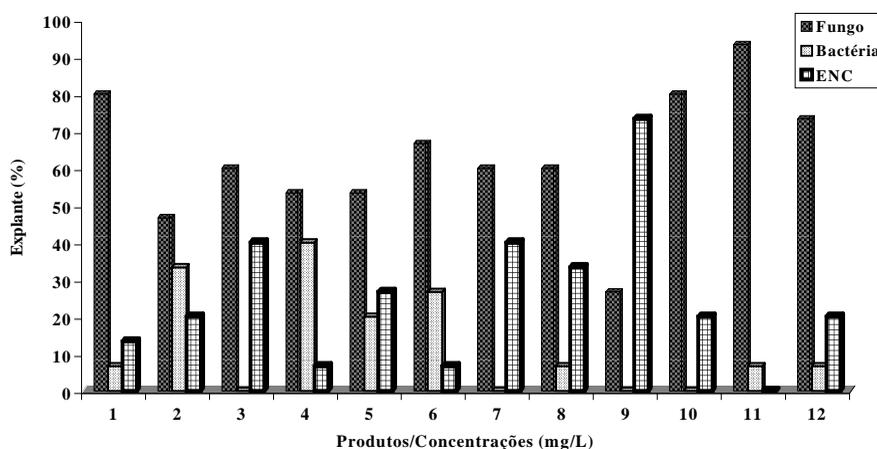


Figura 1. Percentagem de explantes de bananeira (*Musa* AAB cv. Maçã) infectados por fungos e bactérias e, de explante não contaminados (ENC), em diferentes tratamentos 1 - NaOCl 10³ mg L⁻¹; 2 - NaOCl 3.10³ mg L⁻¹; 3 - NaOCl 5.10³ mg L⁻¹; 4 - benomyl 100 mg L⁻¹; 5 - benomyl 200 mg L⁻¹; 6 - benomyl 300 mg L⁻¹; 7 - cefotaxima 100 mg L⁻¹; 8 - cefotaxima 200 mg L⁻¹; 9 - cefotaxima 300 mg L⁻¹; 10 - rifampicina 100 mg L⁻¹; 11 - rifampicina 200 mg L⁻¹ e 12 - rifampicina 300 mg L⁻¹.

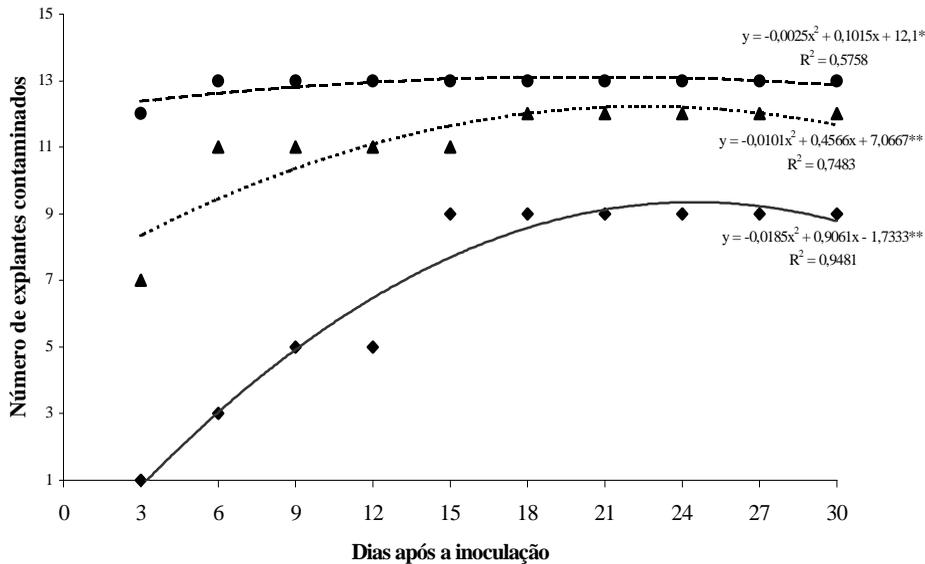
A velocidade de contaminação dos agentes patogênicos (fungos e bactérias), como pode ser observado na Figura 2, foi maior no tratamento com NaOCl nas concentrações de 10³ mg L⁻¹ e 3.10³ mg L⁻¹, a partir do terceiro dia de implantação, sendo que os maiores índices foram atingidos no sexto dia. Na concentração de 5.10³ L⁻¹, observa-se que a velocidade

de infestação foi mais lenta até o 15^o dia de implantação, ocorrendo, a partir deste período, uma estabilização da infestação patogênica. Os resultados obtidos por Carneiro (1997) confirmam que concentrações mais elevadas de NaOCl promoveram uma velocidade de contaminação mais lenta e gradual dos explantes de bananeira da cultivar Maçã.

Verifica-se, na Tabela 2 e nas Figuras 3 e 5, que as dosagens de benomyl e de rifampicina, usadas neste trabalho, não demonstraram eficiência no controle de agentes patogênicos, visto que a infestação iniciou-se no terceiro dia e foi aumentando lentamente até o 24º dia, com perda significativa no número de explantes. Estes produtos químicos não impediram o desenvolvimento dos patógenos, sendo esta uma das grandes limitações da propagação, como observado

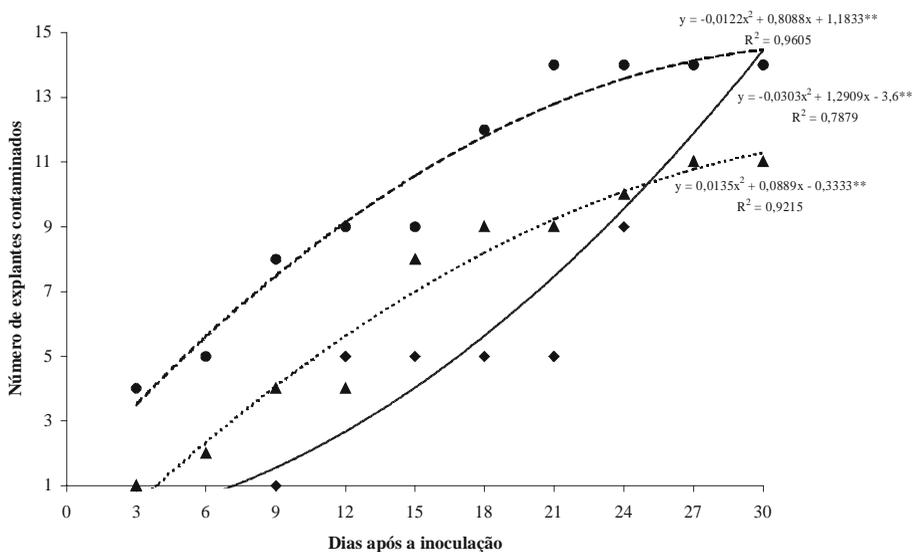
por Cassel (1987), Leifert *et al.* (1991) e Hamill *et al.* (1993).

Verificou-se que o antibiótico cefotaxima, nas concentrações de 100, 200 e 300 mg L⁻¹, inibiu o desenvolvimento dos agentes patogênicos até o nono dia da implantação dos explantes da bananeira cultivar Maçã e que houve um incremento na velocidade de infestação até o 18º dia, estabilizando-se até o final das observações (Figura 4).



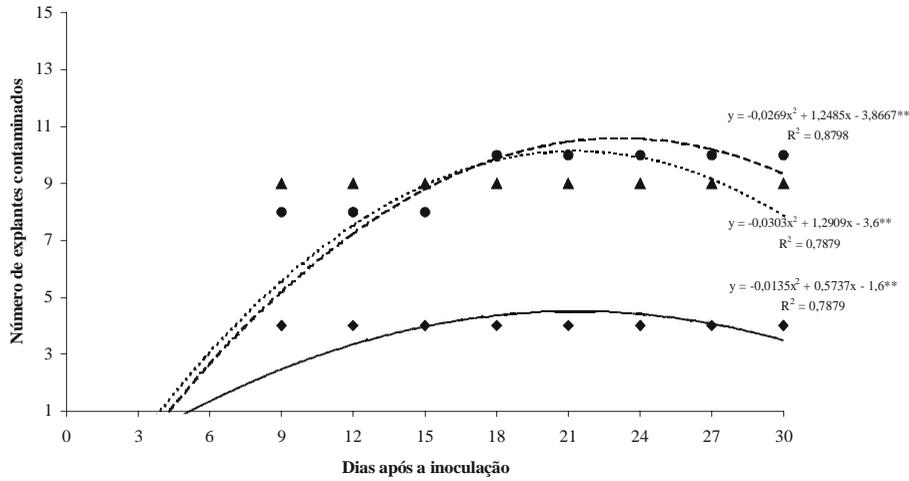
** - Significativo a 5%, e a 1%, pelo teste F, respectivamente.

Figura 2. Curvas de avaliação da evolução de contaminantes sob efeito de NaOCl (l NaOCl 10³ mg L⁻¹; p NaOCl 3.10³ mg L⁻¹; NaOCl 5.10³ mg L⁻¹), em explantes de bananeira (*Musa* AAB cv. Maçã).



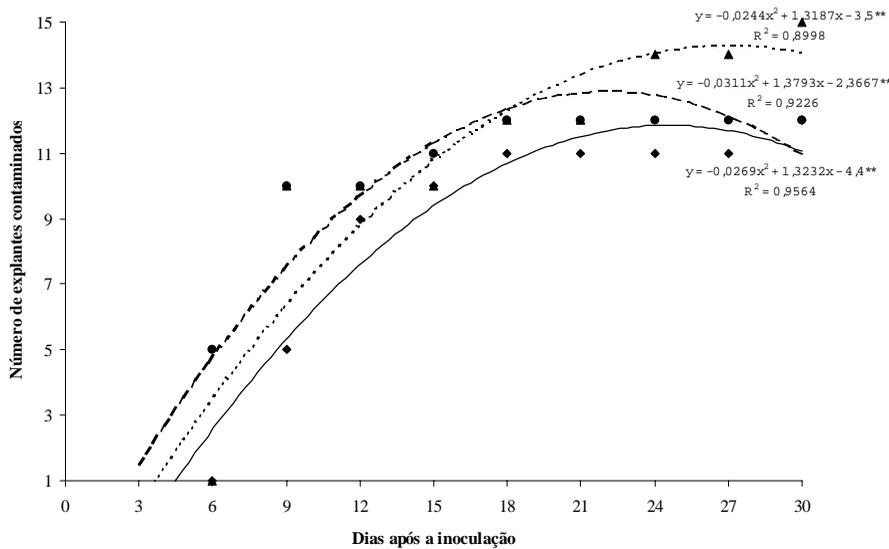
** - Significativo a 1%, pelo teste F

Figura 3. Curvas de avaliação da evolução de contaminantes sob efeito de benomyl (l benomyl 100 mg L⁻¹; p benomyl 200 mg L⁻¹; benomyl 300 mg L⁻¹), em explantes de bananeira (*Musa* AAB cv. Maçã).



** - Significativo a 5%, pelo teste F

Figura 4. Curvas de avaliação da evolução de contaminantes sob efeito de cefotaxima (l cefotaxima 100 mg L⁻¹; p cefotaxima 200 mg L⁻¹; r cefotaxima 300 mg L⁻¹), em explantes de bananeira (*Musa* AAB cv. Maçã).



** - Significativo a 5%, pelo teste F.

Figura 5. Curvas de avaliação da evolução de contaminantes sob efeito de rifampicina (l rifampicina 100 mg L⁻¹; p rifampicina 200 mg L⁻¹; r rifampicina 300 mg L⁻¹), em explantes de bananeira (*Musa* AAB cv. Maçã).

Apesar da quantidade insuficiente em alguns tratamentos, ao final de 30 dias após a implantação dos experimentos para determinação de peso fresco, da altura de explantes e do diâmetro da base do pseudocaule, foi possível observar, visualmente, o efeito de cada produto no desenvolvimento dos explantes durante este período. Os explantes submetidos aos tratamentos NaOCl e cefotaxima

apresentaram-se com desenvolvimento normal, quando comparados com os demais produtos. Contudo, a ação do benomyl e da rifampicina, nas três concentrações, pode ser considerada prejudicial ao desenvolvimento dos explantes. Nos frascos contendo benomyl, os explantes apresentaram-se normais, inicialmente, mas foi possível observar sua ação fitotóxica depois de transcorridos alguns dias,

levando alguns explantes à morte. No caso da rifampicina, os explantes apresentaram deformação da parte aérea e eram bem menores em relação aos explantes dos tratamentos com NaOCl e cefotaxima.

CONCLUSÕES

Os produtos benomyl, rifampicina, cefotaxima e hipoclorito de sódio, nas concentrações estudadas, não foram eficientes no controle de agentes patogênicos na propagação *in vitro* de bananeira da cultivar Maçã, com exceção da cefotaxima, na concentração de 300 mg L⁻¹, que apresentou um controle de 73,33% para bactérias. A contaminação ocorreu nos primeiros dias de implantação dos explantes, com um crescimento lento e progressivo até o 15º dia, quando se verificaram as maiores perdas. Observou-se que houve maior ocorrência do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* em relação à bactéria *Erwinia* sp. no meio e nos explantes, na propagação *in vitro* de bananeira cultivar Maçã.

REFERÊNCIAS

- Alvares, M. C. 1998. Produtividade e variabilidade em bananeiras micropropagadas. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Agronomia e Veterinária. Universidade de Brasília. Brasília, DF. 64p.
- Boxus, P. H. & J. M. Terzi. 1987. Big losses due to bacterial contamination can be avoided in mass propagation scheme. *Acta Horticultural*, 212 : 91-3.
- Carneiro, I. F. 1997. Adequação de técnicas de cultura *in vitro* na obtenção de mudas de bananeira (*Musa AAB*) cultivar maçã. Tese de Doutorado. Escola de Agronomia. Universidade Federal de Goiás. 112 p.
- Cassel, A. C. 1987. Bacterial and bacteria-like contaminants of plant tissue cultures. *Acta Horticultural*, 212 : 25-8.
- FAO. 1998. Production yearbook. Roma: FAO. (Fao Statistics Series).
- Grattapaglia D. & M. A. Machado. 1998. Micropropagação. In A. C. Torres, L. S. Caldas & J. A. Buso (Eds). *Cultura de tecidos e transformação de plantas*, v. 1. CNPH - Embrapa. Brasília, DF. 509p.
- Haldeman, J. H., R. L. Thomas & D. L. Mckamy. 1987. Use of benomyl and rifampicin for *in vitro* shoot tip culture of *Camellis sinensis* and *C. japonica*. *Hort Science*, 22 : 306-7.
- Hamill, S. D., S. L. Sharrock & M. K. Smith. 1993. Comparasion of descontamination methods used in initiation of banana Tissue cultures from field-collected suckers. *Plant Cell, tissue and Organ Culture*, 33 : 343-6.
- Leifert, C., J. Y. Ritchie & W. M. Waits. 1991. Contaminants of plant-tissue and cell cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7 : 452-69.
- Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantum*, 15 : 473-97.
- Nannetti, D. C. 1994. Utilização da cultura de tecidos vegetais na micropropagação e manutenção de *Heliconia* sp. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura de Lavras, MG. 106 p.
- Pollock, K. , D. G. Barfield & R. Shields. 1983. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. *Plant Cell*, 2 : 36-9.
- Torres, A. C., L. S. Caldas, & A. T. Ferreira. 1998. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. p. 11-20. In A. C. Torres, L. S. Caldas & J. A. Buso. (Eds). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. v. 1. CNPH - Embrapa. Brasília, DF. 509p.