

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE DESCONTAMINAÇÃO USADOS NA FASE INICIAL DO ESTABELECIMENTO EM CULTURA *IN VITRO* DE BANANA¹

Iraides Fernandes Carneiro², Lincoln Fonseca Zica² e Lázaro José Chaves²

ABSTRACT

COMPARISON AMONG DECONTAMINATION METHODS AT INITIAL PHASE OF BANANA *IN VITRO* CULTURE.

Four decontamination methods for *in vitro* culture of banana (*Musa* AAB cv. Maçã) explants were compared. Commercial crop rhizomes were used as the explant source. Different sizes of explants obtained from axillary buds were submersed in different concentrations of NaOCl for each different period of time. After being reduced to 8mm X 5mm x 5mm, explants were transferred to modified MS media, which were kept in the dark for 10 days, followed by growth chamber at 28°C ± 2°C with 16h light. Best results were obtained with 40mm x 20mm x 20mm or 40mm x 15mm x 15mm explants, immersed once or twice in 3,5% NaOCl. Higher contamination levels were observed 15 days after the beginning of the experiment; at 1% NaOCl, however, 96,67% contamination was observed after 3 days. Bacterial incidence was higher than fungal.

KEY WORDS: Banana cv. Maçã, tissue culture, superficial sterilization, *Musa* AAB.

RESUMO

Quatro métodos de descontaminação de explantes de banana (*Musa* AAB cv. Maçã) cultivados *in vitro* foram testados utilizando-se, como fonte de explantes, rizomas provenientes de bananeiras comerciais. Explantes de diferentes tamanhos obtidos de brotações axilares foram submetidos a diferentes concentrações e tempo em solução de NaOCl para descontaminação. Após redução para 8mm x 5mm x 5mm, os explantes foram transferidos para meio MS modificado e mantidos em câmara escura durante dez dias e, em seguida, foram levados para câmara de crescimento à temperatura de 28°C ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas. Os melhores resultados foram obtidos quando os tratamentos de descontaminação foram realizados em blocos de 40mm x 20mm x 20mm ou 40mm x 15mm x 15mm, com simples e dupla esterilizações, respectivamente, utilizando-se NaOCl 3,5% de cloro ativo. O aparecimento de fungos e bactérias foi mais acentuado nos primeiros quinze dias, entretanto, em concentração baixa de NaOCl (1%), a contaminação foi quase total nos primeiros três dias (96,67%). Houve maior incidência de contaminação bacteriana do que fúngica.

PALAVRAS-CHAVE: Banana cv. Maçã, cultura de tecidos, esterilização superficial, *Musa* AAB.

INTRODUÇÃO

Os produtores de banana-maçã recorrem, geralmente, a pomares comerciais da própria região, para obtenção de mudas, devido à escassez de viveiros e de mudas de boa qualidade. Nestas condições, as mudas não têm garantia de boa sanidade, podendo portar nematóides, brocas, vírus, fungos, bactérias e outros. A obtenção de mudas de boa qualidade se dá através da seleção e do tratamento das mesmas, bem

como da produção sistemática em viveiros e/ou em laboratórios. A técnica da produção de mudas *in vitro* tem sido destacada, principalmente, pela produção de mudas livres de doenças, além da produção em maior escala e com mais rapidez.

Em locais tradicionais de cultivo e consumo da banana-maçã, no Brasil, essa cultura vem sendo desestimulada, devido à ocorrência do mal-do-panamá, causado pelo fungo *Fusarium oxysporum* F. Smith f. sp. *cubense* Snyder & Hansen. A utilização frequente

1. Entregue para publicação em novembro de 1999.

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

de mudas contaminadas, obtidas a partir do rizoma, é um fator que pode provocar o desenvolvimento mais rápido da doença em regiões onde a cultura da banana é de introdução recente. Giacometti (1986) cita a produção de um milhão de mudas anuais em Formosa, utilizando o processo de cultivo *in vitro*, para atender a demanda, permitindo assim que aquele país se mantenha no mercado internacional, apesar da ocorrência do agente causador do mal-do-panamá, raça 4.

Desde o início da década de 60 já se utilizava a técnica da cultura de tecidos em bananeira (Cox et al. 1960, Mohan & Steward 1964), entretanto, a aplicação desta tecnologia ainda apresenta dificuldades, como, por exemplo, a alta incidência de contaminações fúngicas e bacterianas, provenientes do explante e/ou do ambiente. A contaminação com microrganismos é considerada a mais importante razão para perdas durante a cultura de plantas *in vitro* (Cassels 1987, Boxus & Terzi 1987).

A contaminação por bactérias é considerada a mais séria e tem sido descrita extensivamente na literatura (Leifert et al. 1991, Cassels 1987, Hamill et al. 1993) embora não menos importantes sejam os ácaros e tripses, vetores de fungos e bactérias (Blake 1987). Outros microrganismos são relatados por Leggat & Waites (1987).

Após identificar 293 bactérias provenientes de dois laboratórios comerciais de micropropagação, Leifert et al. (1991) encontraram, dentre estas, 13% de *Bacillus*, bactérias formadoras de endósporos resistentes ao álcool e ao calor, podendo inclusive ser disseminadas pelo álcool usado para esterilizar instrumentos (Boxus & Terzi 1987). Os métodos utilizados para descontaminação dos explantes e para esterilização dos instrumentos, como a flambagem e, mesmo, a autoclavagem do meio, podem não eliminar esta bactéria (Nannetti 1994).

Com o objetivo de obtenção de material descontaminado são utilizadas algumas metodologias de desinfestação do explante inicial, sem conduzi-lo à morte após a excisão. A maioria dos trabalhos de pesquisa encontrados cita a utilização de NaOCl 0,05% a 1,5%, adicionado de espalhante adesivo, durante 15 a 20 minutos, lavando-se, em seguida, os explantes, em água destilada e esterilizada (Cronauer & Krikorian 1984, Damasco & Barba 1984, Cronauer & Krikorian 1985, Jarret et al. 1985, Vuylsteke & Langhe 1985, Wong 1986, Gupta 1986). Às vezes, procede-se também a uma desinfestação superficial pela imersão dos explantes em etanol (70-80%) por 15 segundos, antes

da desinfestação citada anteriormente. Este produto tem ação germicida, além de ser surfactante, facilitando a ação dos outros produtos (Nannetti 1994). Um outro produto químico utilizado é o hipoclorito de cálcio a 0,1-1,5% por 10-20 minutos (Banerjee & Langhe 1985, Jarret et al. 1985). Entretanto, o objetivo pretendido, ou seja, a desinfestação do explante, pode não ser alcançado, vindo o explante, após algum tempo em cultivo *in vitro*, apresentar-se contaminado. Fatores como a sanidade da planta matriz, o tempo e as condições de armazenamento dos rizomas, o tamanho dos explantes, a concentração do produto comercial, a assepsia dos instrumentos e o tempo de exposição ao tratamento influenciam na obtenção de explantes livres de contaminantes.

No presente trabalho, foram testadas diversas metodologias de descontaminação, variando-se o tamanho do explante, a concentração do produto e o tempo de exposição, com o objetivo de obter melhores *performances* na obtenção de mudas livres de fungos e bactérias, na fase de iniciação ou estabelecimento *in vitro* de banana-maçã.

MATERIAL E MÉTODOS

Rizomas de bananeira, cv. Maçã, foram coletados em bananais localizados no município de Itaguaru (GO), e conduzidos ao laboratório do Departamento de Horticultura da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás e armazenados à sombra e à temperatura ambiente, permanecendo nestas condições por aproximadamente dez dias, até a instalação do experimento.

A preparação inicial do material para estabelecimento *in vitro* se deu pela retirada de restos de raízes e terra, com auxílio de uma faca e água corrente. Em seguida, fez-se a retirada das bainhas foliares, situadas mais externamente, e de parte do rizoma, deixando um cubo ou bloco de 100mm x 50mm x 50mm, contendo o meristema. Estes permaneceram mergulhados em uma solução contendo 20 ml de suco de limão China ou Rosa (*Citrus limonia*) por litro de água, até que fossem conduzidos ao laboratório, recebendo os diferentes tratamentos, conforme descritos a seguir:

No procedimento A houve redução dos cubos para dimensões de 40 mm x 20 mm x 20 mm, contendo rizoma, bainhas foliares e o meristema terminal para, em seguida, serem mergulhados em uma solução contendo 3,5% de NaOCl e Tween 20 (30 gotas.L⁻¹) durante 15 minutos, em câmara de fluxo

laminar. Logo após a remoção do tecido tratado, o que reduziu os cubos para 30 mm x 15 mm x 15 mm, utilizando-se lâminas de bisturi esterilizadas, os mesmos foram novamente esterilizados em solução de NaOCl 3,5% e Tween 20 (30 gotas.L⁻¹), durante cinco minutos. Novamente, o tecido tratado foi removido, deixando um bloco de 8 mm x 5 mm x 5 mm, contendo o meristema terminal, envolvido por dois a três primórdios foliares (modificação de Novak *et al.*, citada por Hamill *et al.* 1993).

No procedimento B houve redução do bloco ou cubo para dimensões de 40 mm x 20 mm x 20 mm, contendo rizoma, bainhas foliares e meristema terminal. Este foi excisado, mantendo-se pelo menos dois primórdios foliares, juntamente com uma pequena porção de rizoma (8 mm x 5 mm x 5 mm), e, em seguida, esterilizados dentro de câmaras de fluxo laminar, utilizando uma solução de NaOCl 0,005% + Tween 20 (30 gotas.L⁻¹), durante cinco minutos. Logo após, foram lavados com água destilada e esterilizada por quatro vezes (Cronauer & Krikorian 1984).

No procedimento C houve redução dos blocos para dimensões de 40 mm x 30 mm x 30 mm, contendo rizoma, folhas e meristema, e, em seguida, procedeu-se ao tratamento dos mesmos em condições assépticas, em solução de NaOCl 1% + Tween 20 (30 gotas.L⁻¹) por 15 minutos. Logo após, foram submetidos a três lavagens com água destilada e esterilizada, removendo-se rapidamente o tecido tratado e reduzindo-se os blocos para dimensões de 30 mm x 15 mm x 10 mm. Seguiu-se então a excisão do meristema, deixando-o envolto por dois primórdios foliares, contido em um bloco de 8 mm x 5 mm x 5 mm (Wong 1986).

No procedimento D houve redução do bloco para dimensões de 40 mm x 15 mm x 15 mm, fazendo-se a esterilização em condições assépticas com NaOCl 3,5% + Tween 20 (30 gotas.L⁻¹), por 20 minutos, e lavando-se em seguida com água destilada e esterilizada por três vezes. O tecido tratado e as folhas foram removidos, deixando-se um bloco de 8 mm x 5 mm x 5 mm, contendo o meristema envolvido por dois primórdios foliares (Hamill *et al.* 1993).

Após a realização dos respectivos tratamentos de descontaminação, todos os explantes foram colocados em meio de cultura MS (Murashige & Skoog 1962), suplementado com mio-inositol (100 mg.L⁻¹), sacarose (30 g.L⁻¹), ágar (7 g.L⁻¹), BAP (0,7 mg.L⁻¹) e Kin (0,7 mg.L⁻¹). O pH foi ajustado para 5,8 com a adição de NaOH 0,1N, antes da autoclavagem. Esta

foi realizada a 121°C por 15 minutos, após a distribuição do meio de cultura em tubos de ensaio (10 mL por tubo) e vedação dos mesmos com papel alumínio.

A colocação dos explantes *in vitro* foi feita em condições assépticas, colocando-se um explante por tubo e fazendo-se sua vedação com filme de polietileno. Todos os tratamentos foram mantidos no escuro, durante dez dias, para evitar a oxidação dos explantes. Durante esse período, os tubos contaminados eram retirados, anotados e descartados, a cada três dias. Após esse período, foram levados para a câmara de crescimento, à temperatura de 28°C ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas, utilizando-se lâmpadas fluorescentes.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e 60 repetições. A cada três dias eram retirados os frascos contaminados, fazendo-se também a identificação do fungo ou bactéria contaminantes. Os dados obtidos foram comparados pelo teste de qui-quadrado (c²), enquanto para a frequência de ocorrência de contaminação calculou-se, além da média, o seu intervalo de confiança.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferença altamente significativa entre os tratamentos, pelo teste de qui-quadrado, para todos os períodos de observação (Tabela 1). Na Tabela 2 observa-se que os tratamentos A e D foram os melhores para descontaminação dos explantes, ocorrendo 26,67% e 28,33%, respectivamente, de tubos contaminados, após 15 dias da implantação do experimento. No tratamento A, que consistiu em uma dupla esterilização, sem lavagem do explante, foram observados resíduos de NaOCl presentes no meio, causando leve amarelecimento. O tratamento C, em que foram utilizados blocos de maior tamanho e menor concentração de NaOCl (1%), não foi eficiente na descontaminação, ocorrendo perda quase total dos explantes após 3 dias da inoculação (96,67%), enquanto o tratamento B (desinfestação de blocos pequenos e inoculação, sem retirada do tecido tratado) teve eficiência parcial na descontaminação (51,66% de contaminação). Melhores resultados foram obtidos por Hamill *et al.* (1993), para *Musa* sp. AAA cv. Williams, com o método C, enquanto, para os tratamentos A e B, os resultados foram semelhantes.

Tabela 1. Contaminação fúngica e/ou bacteriana de explantes iniciais de bananeira (*Musa AAB cv. Maçã*), após tratamentos com NaOCl.

TRATA- ¹ MENTOS	Número de explantes contaminados (S) e não contaminados (N)									
	Aos 3 dias		Aos 6 dias		Aos 9 dias		Aos 12 dias		Aos 15 dias	
	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N
A	00	60a	09	51a	11	49a	15	45a	16	44a
B	00	60a	19	41b	21	39b	26	34b	31	29b
C	58	02c	58	02c	58	02c	58	02c	58	02c
D	04	56b	06	54a	9	51a	13	47a	17	43a
χ^2	210,42 ³		121,69 ³		107,06 ³		86,92 ³		76,62 ³	

1. Tratamentos A = 3,5% de NaOCl por 5 minutos, em blocos de 16 cm² + 3,5% de NaOCl por 5 minutos, em blocos de 6,75cm²; B = 0,005% de NaOCl por 5 minutos, em blocos de 0,2cm²; C = 1,0% de NaOCl por 15 minutos em blocos de 36cm²; D = 3,5% de NaOCl em blocos de 9cm², durante 20 minutos.

2. Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente a 1% de probabilidades pelo teste de qui-quadrado (χ^2).

3. Significância ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste de qui-quadrado (χ^2).

Tabela 2. Percentagem de contaminação (%) e intervalos de confiança (IC) de explantes de bananeira (*Musa AAB cv. Maçã*) cultivados *in vitro* e submetidos a diferentes tratamentos de descontaminação.

Dias de cultivo	TRATAMENTOS DE DESCONTAMINAÇÃO							
	A ¹		B ²		C ³		D ⁴	
	%	IC ⁵	%	IC ⁵	%	IC ⁵	%	IC ⁵
3	0,00	0,00-6,00	0,00	0,00-6,00	96,67	88,47-99,59	6,67	1,85-16,20
6	15,00	7,10-26,57	31,67	20,26-44,96	96,67	88,47-99,59	10,00	3,76-20,51
9	18,33	9,52-30,44	35,00	23,13-48,40	96,67	88,47-99,59	15,00	7,10-26,57
12	25,00	14,72-37,86	43,33	30,59-56,76	96,67	88,47-99,59	21,67	12,07-34,20
15	26,67	16,07-39,66	51,67	38,39-64,77	96,67	88,47-99,59	28,33	17,45-41,44

1 - A¹ = 3,5% de NaOCl, durante 15 minutos, em blocos de 16 cm² + 3,5% de NaOCl por 5 minutos, em blocos de 6,75cm²; B² = 0,005% de NaOCl por 5 minutos em blocos de 0,2cm²; C³ = 1,0% de NaOCl por 15 minutos em blocos de 36cm²; D⁴ = 3,5% de NaOCl em blocos de 9cm², durante 20 minutos.

5 - Intervalos de confiança de 95%.

A rapidez de contaminação por bactérias foi maior no tratamento C, sendo que, aos 3 dias da inoculação, 91,67% dos explantes apresentavam-se contaminados, ao passo que, nos outros tratamentos, a contaminação foi lenta e gradual. Nannetti (1994) também verificou alta incidência (100%) de contaminação bacteriana durante o estabelecimento de *Heliconia* sp., uma espécie rizomatosa da família Musaceae. Essa contaminação foi, porém, controlada apenas com o uso do antibiótico cefotaxima sódica.

Comparando-se os resultados obtidos em relação à contaminação fúngica e bacteriana (Tabela 3), observa-se que houve o aparecimento de fungos e bactérias contaminantes em todos os tratamentos realizados, sendo que os tratamentos C e D apresentaram menores taxas de contaminação fúngica e os tratamentos A e D, menores índices de contaminação

bacteriana. A ocorrência de bactérias foi superior em relação à contaminação fúngica, nos tratamentos B, C e D, com maior relevância no tratamento C. Observou-se maior ocorrência de bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Erwinia* e do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Esse alto índice de contaminação pode ocorrer quando o estado sanitário das matrizes é ruim, pois diversos microrganismos de natureza endógena não são expostos aos agentes desinfestantes e devem ser controlados nas plantas matrizes (Grattapaglia & Machado 1990). Hol & van der Linde (1992) também observaram altas taxas de contaminação em materiais oriundos do solo, tais como bulbos, rizomas e estolões, enquanto Leifert *et al.* (1991) afirmam que todas as plantas desenvolvidas no campo, em climas tropicais, ou aquelas irrigadas por aspersão são muito difíceis de desinfestar.

Tabela 3. Intervalos de confiança (IC) e percentagem (%) de contaminação fúngica e bacteriana, em explantes de bananeira (*Musa* AAB cv. Maçã), submetidos a tratamentos de descontaminação, aos 15 dias da inoculação.

Tratamentos	Patógenos contaminantes					
	Fungos		Bactérias		Total	
	%	IC ¹	%	IC ¹	%	IC ¹
A ²	13,33	5,94 - 24,59	13,33	5,94 - 24,59	26,67	16,07 - 39,66
B	13,33	5,94 - 24,59	38,33	26,07 - 51,79	51,67	38,39 - 64,77
C	5,00	1,04 - 13,92	91,67	81,61 - 97,24	96,67	88,47 - 99,59
D	8,33	2,76 - 18,39	20,00	10,78 - 32,33	28,33	17,45 - 41,44

1. Intervalo de confiança de 95%.

2. A = 3,5% de NaOCl, durante 15 minutos, em blocos de 16cm² + 3,5% de NaOCl por 5 minutos, em blocos de 6,75cm²; B = 0,005% de NaOCl por 5 minutos em blocos de 0,2cm²; C = 1,0% de NaOCl por 15 minutos, em blocos de 36cm²; D = 3,5% de NaOCl por 20 minutos, em blocos de 9cm².

Tanto o armazenamento das mudas quanto o tamanho do bloco contendo o meristema são fatores que influenciam o grau de contaminação dos explantes *in vitro* (Hamill *et al.* 1993). No presente trabalho, o índice elevado de contaminação pode ser explicado pelo tempo de armazenamento das mudas (10 dias) e pelo tamanho do bloco trabalhado (8 mm x 5 mm x 5 mm). No caso de pequenos laboratórios, o armazenamento das mudas é necessário, quando adquiridas em grande quantidade e quando há escassez de mão-de-obra para a realização dos trabalhos de limpeza, esterilização, preparo do meio, inoculação etc. A utilização de blocos de maior tamanho facilita o trabalho de excisão, requer menos tempo para o seu preparo e pode ser reutilizado em caso de contaminação fúngica, após receber um novo tratamento de descontaminação. Sendo afetados pela oxidação, explantes maiores também poderão ser aproveitados, desde que seja feita uma limpeza ou retirada dos tecidos oxidados.

Quando se comparam os métodos A e D, que proporcionaram melhores índices de descontaminação, em relação ao tempo necessário para preparo do explante e ao custo de produção da muda, verifica-se que o tempo necessário para a realização de duas descontaminações (A) é maior, tornando-o desvantajoso, ou seja, reduz o rendimento do trabalho no laboratório e eleva o custo de produção da muda. Por outro lado, o método D, que inclui três lavagens com água destilada e esterilizada, também eleva o custo de produção da muda pelo maior gasto de energia e mão-de-obra. Entretanto, ambos os métodos podem ser aprimorados, com o objetivo de utilização rotineira

para estabelecimento de explantes de bananeira-maçã *in vitro*.

CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos conclui-se que o NaOCl 3,5%, por 20 minutos, foi mais eficiente para a obtenção de explantes iniciais de banana-maçã descontaminados, utilizando-se simples ou dupla descontaminação; a frequência de contaminações bacterianas, tanto no meio de cultura quanto no explante, foi maior do que de fungos; o aparecimento de fungos e bactérias foi observado desde o terceiro dia após a inoculação e foi mais acentuado nos primeiros 15 dias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Banerjee, N. & E. Langhe. 1985. A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). *Plant Cell Reports*, 4:351-54.
- Blake, J. 1987. Mites and thrips as bacterial and fungal vectors between plant tissue cultures. *Acta Hort.*, 225:163-66.
- Boxus, P.H. & J. M. Terzi. 1987. Big losses due to bacterial contamination can be avoided in mass propagation scheme. *Acta Hort.*, 212:91-3.
- Cassels, A. C. 1987. Bacterial and bacteria-like contaminants of plant tissue cultures. *Acta Hort.*, v. 225.
- Cox, E. A., G. Stotzky & R. D. Goos. 1960. *In vitro* culture of *Musa bahisiana* Colla embryos. *Nature*, 185:403-04.

- Cronauer, S. S. & A. D. Krikorian. 1984. Multiplication of *Musa* from excised stem tips. *Annals of Botany*, 53:321-28.
- Cronauer, S. S. & A. D. Krikorian. 1985. Aseptic multiplication of banana from excised floral apices. *Hort Science*, 20 (4): 770-71.
- Damasco, O. P. & R. C. Barba. 1984. *In vitro* culture of Saba banana (*Musa* sp. cv. Saba (BBB)). *Phil. Agr.*, 67: 351-58.
- Giacometti, D. C. 1986. Biotecnologia em Fruticultura. *Informativo Sociedade Brasileira de Fruticultura*, 5 (2): 15-6.
- Grattapaglia, D. & M. A. Machado. 1990. Micropropagação. In Torres, A.C. & L. S. Caldas (eds.). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. ABCTP/CNPH/Embrapa, p. 99-69.
- Gupta, P. P. 1986. Eradication of mosaic disease and rapid clonal multiplication of bananas and plantains through meristem tip culture. *Plant-Cell, Tissue and Organ Culture*, 6: 33-9.
- Hamill, S. D., S. L. Sharrock & M. K. Smith. 1993. Comparison of decontamination methods used in initiation of banana tissue cultures from field-collected suckers. *Plant-Cell, Tissue and Organ Culture*, 33: 43-346.
- Hol, G. M. G. M. & P. C. G. Van Der Linde. 1992. Reduction of contamination in bulb explant cultures of *Narcissus* by a hot-water treatment of parent bulbs. *Plant-Cell, Tissue and Organ Culture*, 31: 75-9.
- Jarret, R. L., W. Rodriguez & R. Fernandez. 1985. Evaluation tissue culture propagation of "Saba" and "Pelipita" plantains in Costa Rica. *Sci. Hort.*, 25: 137-47.
- Leggat, I. V. & W. M. Waites. 1987. Characterization of microorganism isolated from plants during micropropagation. *Acta Hort.*, 225: 93-102.
- Leifert, C., J. Y. Ritchie & W. M. Waites. 1991. Contaminants of plant-tissue and cell cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7: 452-69.
- Mohan, H. Y. & F. C. 1964. The induction of growth in explanted tissue of banana. *Can. J. Bot.*, 42: 1579-95.
- Murashige, T. & F. A. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-97.
- Nannetti, D. C. 1994. Utilização da cultura de tecidos vegetais na micropropagação e manutenção de *Heliconia* sp. *Dissertação de Mestrado*. ESAL, Lavras, MG. 106p.
- Vuylsteke, D. & E. Langhe. 1985. Feasibility of *in vitro* propagation of bananas and plantains. *Trop. Agric.*, 62(4): 323-8.
- Wong, W. C. 1986. *In vitro* propagation of banana (*Musa* spp): initiation, proliferation and development of shoot-tip cultures on defined media. *Plant-Cell, Tissue and Organ Culture*, 6: 159-66.