

## Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira 'Thap maeo' (sub grupo AAB) submetidos a concentrações de cloro ativo

Gustavo Alves Pereira\*, Aparecida Conceição Boliani, Luiz Souza Correa

Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita, Ilha Solteira, SP, Brasil

\*Autor correspondente, e-mail: gustavo\_apereira@yahoo.com.br

### Resumo

A maioria dos plantios de bananeira ainda são realizados utilizando mudas tradicionais do tipo chifrinho, chifre, chifrão e pedaços de rizoma. Outros métodos de propagação como a micropropagação vêm sendo desenvolvidos e aperfeiçoados, para elevar a taxa de multiplicação em curto espaço de tempo e melhorar a qualidade fitossanitária das mudas. O objetivo foi avaliar a desinfestação, *in vitro*, utilizando concentrações de cloro ativo em explantes de bananeira 'Thap maeo', sendo esta variedade resistente às Sigatokas negra e amarela, bem como ao mal-do-Panamá. Os tratamentos utilizados foram: T1 - testemunha sem cloro ativo, T2 - 0,5% de cloro ativo, T3 - 1,0% de cloro ativo, T4 - 1,5% de cloro ativo e T5 - 2% de cloro ativo. Foram avaliadas as porcentagens de contaminação por bactérias e fungos como também a porcentagem de oxidação dos explantes. Concluiu-se que a maior eficiência dentre os tratamentos testados foi o de imersão dos explantes em 2% de cloro ativo o qual proporcionou redução 82% e 88% respectivamente para bactérias e fungos.

**Palavras-chave:** contaminantes, *Musa sp*, micropropagação

### Disinfestation and *in vitro* establishment of "Thap maeo" (AAB subgroup) banana explants submitted to chlorine concentrations

### Abstract

Most of banana plantations are still carried out using traditional seedlings types, named in Brazil as 'chifrinho', 'chifre', 'chifrão' (with a literal translation of little horn, horn and big horn, respectively) and also using rizoma pieces. Other propagation methods, such as micropropagation, have been developed and improved in order to increase the multiplication rate in a short period of time and improve the seedlings phytosanitary conditions. The aim of this study was to evaluate the '*in vitro*' disinfection using active chlorine concentrations in explants of 'Thap maeo' bananas, which is a variety resistant to black and yellow Sigatokas, as well as Panama disease. The treatments were: T1 – control without active chlorine, T2 - 0.5% of active chlorine, T3 - 1.0% of active chlorine, T4 - 1.5% of active chlorine and T5 - 2% of active chlorine. The percentage of contamination by bacteria and fungi as well as the percentage of oxidation of the explants were evaluated. It was concluded that the highest efficiency among treatments was the T5 – immersion of the explants in 2% of active chlorine, which resulted in 82% and 88% of reduction, respectively, for bacteria and fungi.

**Keywords:** contaminants, micropropagation, *Musa sp*,

## Introdução

O Brasil é um dos principais produtores mundiais de banana, ocupando o 5º lugar. Na primeira posição está a Índia com uma produção de 24.869.490 toneladas seguido por, China, Filipinas e Equador com 10.845.265, 9.225.998 e 7.012.244 toneladas respectivamente. O estado de São Paulo é o Segundo maior produtor de banana do país com área colhida de 54.563 ha, produzindo 1.225.193 toneladas (Agrarianual, 2015).

A propagação da bananeira (*Musa sp.*) pode ser feita de várias formas: por sementes, ou vegetativamente por meio de mudas tipo chifrão, chifre e chifrinho ou *in vitro* (Pereira et al., 2011). Pelo método vegetativo, mesmo o material sendo de ótima qualidade, o processo é lento e permite a disseminação de doenças e pragas como mal do Panamá, Sigatoka negra, Sigatoka amarela e broca do rizoma (Souza et al., 2010).

Diversas práticas de cultura de tecidos são utilizadas, sendo a micropropagação uma das mais utilizadas e responsável pela produção de mudas de diversas espécies com fins comerciais (Pereira et al., 2011). Devido a técnica da micropropagação proporcionar um ambiente favorável para o crescimento de microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, o princípio básico para o sucesso da cultura de tecidos é, em parte, medidas de prevenção e controle da contaminação microbiana (Pereira et al., 2011).

Os microrganismos contaminantes competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura, eliminando metabólitos tóxicos neste meio, podendo ocasionar a morte da plântula (Pereira et al., 2011).

Na fase de estabelecimento *in vitro*, dependendo da origem do material a contaminação pode comprometer o trabalho de micropropagação. Uma desinfestação pode ser por meio de técnicas físicas ou químicas; separadas ou combinadas. A utilização de produtos químicos deve ser avaliada quanto à concentração e o tempo de imersão para observar o impacto deste(s) produto(s) sobre o explante. Em altas concentrações e tempo elevado de imersão pode desinfestar de forma

satisfatória, porém, a viabilidade dos explantes pode reduzir, provocando perdas; o contrário pode não desinfestar o explante (Cid & Zimmermann, 2006).

De acordo com Donini et al. (2005) quanto maior a concentração de cloro ativo maior será o aumento do pH na solução desinfestante, o que levará à diminuição da ação biocida pelo aumento da formação de íons. O aumento da concentração de cloro livre na solução resultará no correspondente aumento da atividade biocida, sendo que o aumento de quatro vezes na concentração de cloro reduz pela metade o tempo de exposição dos explantes.

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

## Material e Métodos

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de micropropagação da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Ilha Solteira. Os explantes utilizados foram obtidos de plantas matrizes originadas de clones de *Musa sp.* 'Thap maeo' cultivada na Fazenda de Ensino Pesquisa e Extensão da UNESP, Campus de Ilha Solteira, localizada no município de Selvíria-MS, no período de 10 de abril a 10 de maio de 2011. Após a obtenção dos rizomas, os mesmos foram lavados para retirar o excesso de solo e raiz. Em seguida, as bainhas foram seccionadas com uma faca esterilizada, permitindo assim a redução de seu tamanho.

Foi utilizado água sanitária como fonte de cloro ativo (com 2,5% de cloro ativo), pelo fato da mesma ter um baixo custo. Os tratamentos utilizados foram: T1 – testemunha em água – 0% de cloro ativo; T2 - 0,5% de cloro ativo; T3 - 1% de cloro Ativo; T4 - 1,5% de cloro ativo e T5 - 2% de cloro ativo. Todos os explantes ficaram imersos nas respectivas soluções de cloro ativo durante vinte minutos, conforme recomendações de Costa et al. (2006), Lima & Moraes (2006), Souza et al. (2010), Pereira et al (2011)). Os meristemas foram extraídos em condições assépticas e incubados em meio de cultura MS (Murashige &

Skoog, 1962), suplementado com sacarose em  $30 \text{ g L}^{-1}$  e o solidificante phytigel a  $2,3 \text{ g L}^{-1}$ , com pH ajustado para  $5,8 \pm 1$  antes da autoclavagem (esterilização) à  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  com  $1 \text{ Kg cm}^{-2}$  durante vinte minutos. A fase de estabelecimento foi realizada em sala de crescimento com temperatura  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas de luz a uma intensidade luminosa de  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Os explantes foram avaliados após trinta dias contados da data de inoculação, período esse que compreende a fase de estabelecimento da cultura. Foram avaliadas as porcentagens de contaminação por bactéria e fungo como também a porcentagem de oxidação dos explantes.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos, cinco repetições, sendo cada repetição representada por cinco tubos contendo um explante cada. Este delineamento está de acordo com Lima & Moraes (2006),

que utilizaram um explante por repetição. Os dados foram submetidos a análise de variância utilizando-se o programa SISVAR, e análise de regressão para as concentrações do cloro ativo.

### Resultados e Discussão

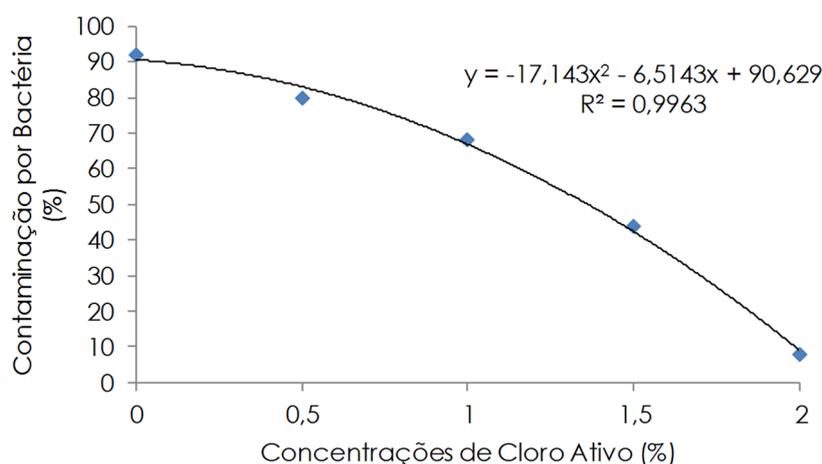
De acordo com a análise de variância, pode-se observar que houve diferença significativa para o teste F entre as concentrações de hipoclorito de sódio para as variáveis percentagens de contaminação bacteriana, fúngica e explantes oxidados ( $P < 0,05$ ) (Tabela 1). A análise de regressão indicou equações de segundo grau, como melhor ajuste para todas as variáveis.

Na concentração de 2,0% de cloro ativo verificou-se taxa de 8% de contaminação por bactérias (Figura 1), mostrando assim baixa contaminação em relação ao tratamento com 0% de cloro ativo havendo 90,6% de contaminação.

**Tabela 1.** Quadrados médios da análise de variância e níveis de significância referentes a porcentagem de explantes de bananeira 'Thap maeo' contaminados por bactéria, fungos e oxidados.

Concentrações	Quadrados médios		Características	
	Bactéria (%)	Contaminação fungo (%)	Oxidação (%)	
	5544,00*	5656,00*	864,00*	
CV (%)	18,28	24,65	25,86	

\* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; CV-Coeficiente de variação

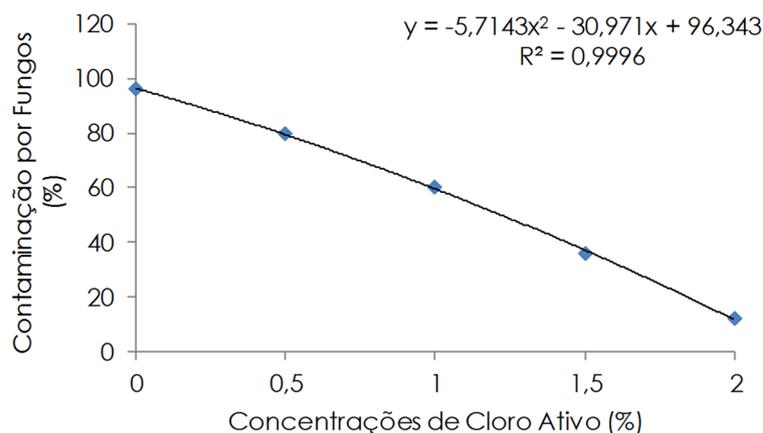


**Figura 1.** Porcentagem de contaminação por bactéria em explantes de bananeira 'Thap maeo' submetidas a concentrações de cloro ativo.

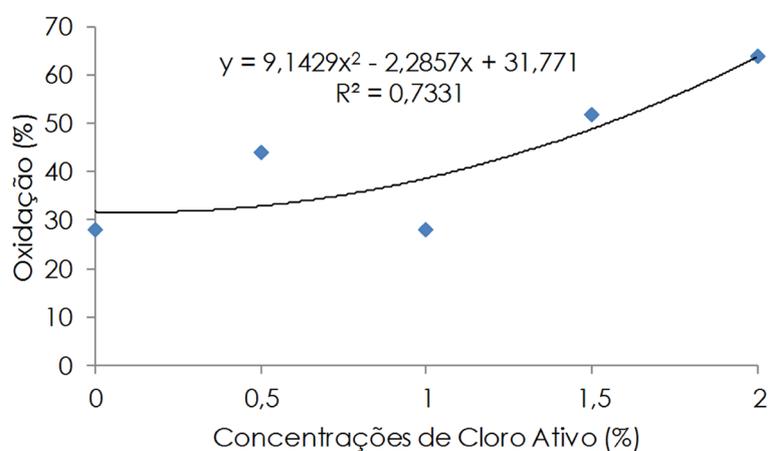
Para o controle de fungos, a concentração de 2% de cloro ativo proporcionou controle de 88% de contaminantes, sendo que na concentração de 0% de cloro ativo a taxa foi de 96% de contaminação mostrando também eficiência do cloro ativo (Figura 2).

Em relação a oxidação foi verificado

taxa de 64% quando se utilizou a concentração de 2% de cloro ativo (Figura 3), porém não ocasionou a morte dos mesmos permitindo o desenvolvimento e continuidade do processo de micropropagação. Essa oxidação ocorre naturalmente em bananas, sendo causadas por compostos fenólicos.



**Figura 2.** Porcentagem de contaminação por fungo em explantes de bananeira 'Thap maeo' submetidas a concentrações de cloro ativo.



**Figura 3.** Porcentagem de oxidação em explantes de bananeira 'Thap maeo' submetidas a diferentes concentrações de cloro ativo.

O hipoclorito de sódio é um efetivo agente antimicrobiano, utilizado para desinfestação de microorganismos existentes em superfícies inertes, por isso é usado na limpeza e manutenção da qualidade em todo o material exposto à contaminação.

A eficiência na desinfestação depende muito da condição fitossanitária da planta matriz determinando a facilidade em descontaminar o explante durante o isolamento.

Diniz et al. (2008) verificaram em rizomas de lírio da paz que a maior eficiência na desinfestação foi observada no tratamento com álcool + hipoclorito de cálcio com 73% de explantes livres de contaminação, seguido dos tratamentos com hipoclorito de sódio somente e álcool + hipoclorito de sódio, com 70% e 57%.

A eficiência do hipoclorito de sódio na desinfestação de explantes *in vitro* foi confirmada por Chaves et al. (2004) quando utilizado, nas

concentrações de 0,5%; 1,0%; 1,5% e 2,0%, em explantes de *Prunus*. Os autores observaram que o hipoclorito de sódio proporcionou maiores porcentagens de sobrevivência (96,25%). Entretanto, somente (67,25%) dos explantes se estabeleceram no meio de cultura.

Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com Pereira et al. (2011) que obtiveram 0% de contaminação por bactérias e fungos em explantes de bananeira 'Grande Naine' quando se utilizou a concentração de 2% de cloro ativo. Concordam também com outros autores como Piccolotto et al. (2007) que utilizaram concentrações diferentes de hipoclorito de sódio em jabuticabeira e obtiveram 2% de contaminantes utilizando hipoclorito de sódio a 5%. Teixeira et al. (2008) conseguiram desinfestação adicionando 0,005% de hipoclorito de sódio ao meio de cultura para a micropropagação de *Eucalyptus pellita*.

Souza et al. (2006) também observaram que explantes caulinares de goiabeira serrana e de pitangueira podem ser desinfestados usando a concentração de hipoclorito de sódio entre 1,5% a 2,5%, por 10 minutos de exposição no agente desinfestante.

Oliveira & Nino (2009) utilizaram o hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos na desinfestação *in vitro* de quatro cultivares de framboeseira, e observaram que na fase de estabelecimento *in vitro*, as cultivares Autumn Bliss e Heritage apresentaram as maiores porcentagens de explantes vivos, respectivamente de 97% e 84%.

A concentração e o tempo de exposição aos desinfetantes dependem do material vegetal e diferentes partes da planta apresentam respostas variadas quanto à sensibilidade dos tecidos. Uma desinfestação eficiente elimina os microorganismos e não causa danos ou morte aos tecidos (Erig & Schuch, 2005).

Por outro lado, os resultados conseguidos discordam de Palu et al. (2011) que não obtiveram êxito com hipoclorito de sódio na micropropagação de figueira, tendo que utilizar antibióticos e obtendo melhor resultado com a adição de ampicilina sódica na concentração de 250 mg L<sup>-1</sup>. Lima & Moraes (2006) constataram que a imersão apenas em solução de NaOCl não mostrou diferenças significativas sobre a contaminação bacteriana, pelo qual justificaram a baixa eficiência da descontaminação somente com NaOCl pode ser atribuída à sua ação superficial no tecido vegetal. Costa et al. (2007) obtiveram êxito utilizando uma baixa concentração de hipoclorito de sódio (0,8%) na micropropagação de Alecrim-pimenta, discordando deste trabalho que utilizando 0,8% de cloro ativo verificou-se 70% de contaminantes. Nietsche et al. (2006) afirmaram que o hipoclorito de sódio é mais tóxico do que o hipoclorito de cálcio, e dependendo do tempo de imersão, pode ocorrer desidratação do explantes, porém as concentrações utilizadas foram eficientes na assepsia e não tóxicas aos explantes.

### Conclusões

A perda total de explantes foi de 20%, sendo 8% contaminados por bactéria e 12% por

fungos, na concentração de 2% de cloro ativo.

A concentração de 2% de cloro ativo apresentou 64% de oxidação nos explantes, porém não ocasionou a perda dos mesmos

### Referências

Agriannual. 2015. *Anuário estatístico da agricultura brasileira*. Instituto FNP, São Paulo, Brasil. 163-172.

Chaves, A.C., Schuch, M., Walmor, B. 2004. Desinfestação de explantes de *Prunus* cv. Mr. S. 2/5 com hipoclorito de sódio e cálcio. *Revista Brasileira de Agrociência* 10: 249-250.

Cid, L.P.B., Zirmmermann, M.J.A. 2006. *Contaminação In Vitro de Plantas*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brasil. 20 p.

Costa A.S., Arrigoni-Blank M.F., Blank A.F., Mendonça A.B., Amancio V.F., Ledo A.S. 2007. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. *Horticultura Brasileira* 25: 68-72.

Costa, F.H.S., Pereira, J.E.S., Pereira, M.A.A., Oliveira, J.P. 2006. Efeito da interação entre carvão ativado e N<sup>6</sup>-benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, cv. Grand Naine (AAA). *Revista Brasileira de Fruticultura* 28: 280-283.

Diniz, J.D.N., Almeida, J.L., Oliveira, A.B., Bezerra, A.M.E. 2008. Protocolo para desinfestação, multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Spathiphyllum wallisi*. *Revista Ciência Agronômica* 39: 107-113.

Donini, L.P., Souza, J.A., Moura, I. F., Guisso, A.P., Viégas, J. 2005. Preparo de lâminas foliares de Aráceas ornamentais: desinfestação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. *Arquivos do Instituto Biológico* 72: 517-522.

Erig, A.C., Schuch, M.W. 2005. Estabelecimento *in vitro* de Mirtilo a partir de segmentos nodais. *Scientia Agraria* 6: 91-96.

Lima, J.D., Moraes, W.S. 2006. Controle de bactérias contaminantes em explantes de bananeira (*Musa* AAA cv. Caipira). *Pesquisa Agropecuária Tropical* 36:181-186.

Murashige, T., Skoog, F.A. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

Nietsche, S., Marques, S.V., Pereira, M.C.T., Salles, B., Xavier, A.A. França, A.C., Lima, C., Silva, L.S. 2006. Estabelecimento *in vitro* de explantes de três cultivares de bananeira. *Ciência Rural* 36: 989-991.

Oliveira, R.P., Nino, A.F.P. 2009. Potencial

de multiplicação *in vitro* de cultivares de framboeseira. *Revista Brasileira de Fruticultura* 31: 280-284.

Palu, E.G., Correa, L.S., Suzuki, A.N., Boliani, A.C. 2011. Uso de antibióticos para o controle de bactérias endógenas visando à micropropagação da figueira. *Revista Brasileira de Fruticultura* 33: 587-592.

Pereira, G.A., Correa, L.S., Boliani, A.C. 2011. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira 'Grande naine' em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. *Revista Brasileira de Fruticultura Edição Especial*: 222-226.

Picolotto, L., Schuch, M.W., Souza, J.A., Silva, L.C., Ferri, J., Fachinello, J.C. 2007. Efeito do hipoclorito de sódio, fotoperíodo e temperatura no estabelecimento *in vitro* de jabuticabeira. *Scientia Agraria* 8: 18-23.

Souza, J.A., Schuch, M.W., Silva, L.C., Soares, G.C. 2006. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret) e pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). *Revista Científica Rural* 11: 39-44.

Souza, D.S., Siqueira, D.L., Cecon, P.R., Santos, D. 2010. Micropropagação das bananeiras 'Prata-Anã' e 'FHIA 01' a partir de explantes de plantas tratadas com paclobutrazol. *Revista Brasileira de Fruticultura* 32: 561-570.

Teixeira, S.L., Ribeiro, J.M., Teixeira, M.T. 2008. Utilização de hipoclorito de Sódio na esterilização de meio de cultura para multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus Pellita* L. *Ciência Florestal* 18: 185-191.