

DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AGRIMICINA NO CONTROLE DE CONTAMINAÇÕES DE EXPLANTES DE BANANEIRA NA MICROPROPAGAÇÃO

Gustavo Alves Pereira¹; Renato Lepri Bobroff²; Janaina Batista Lenza³; Luiz de Souza Corrêa⁴.

¹ Engenheiro Agrônomo, Doutorando em Agronomia pela UNESP - Campus de Ilha Solteira, Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia;

² Aluno de graduação UNIC/Cuiabá-MT;

³ Docente da Universidade de Cuiabá (UNIC) - Cuiabá-MT;

⁴ Docente do Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia/UNESP - Campus de Ilha Solteira.

RESUMO: A contaminação de explantes por bactérias ocasiona grandes perdas na micropropagação de plantas, comprometendo a fase de estabelecimento *in vitro*. Com o objetivo de diminuir essas contaminações bacterianas, este trabalho avaliou diferentes concentrações do bactericida agrimicina na desinfestação de explantes para micropropagação de bananeira. Os explantes foram imersos em soluções do antibiótico agrimicina contendo 0g L⁻¹; 1g L⁻¹; 2g L⁻¹; 3g L⁻¹; 4g L⁻¹; 5g L⁻¹; 6g L⁻¹ durante vinte minutos e introduzidos em meio de cultura MS sólido com pH 5,8. O estabelecimento foi realizado em sala de crescimento com temperatura 25 ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas de luz a uma intensidade luminosa de 30 μmol m⁻² s⁻¹. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado composto por cinco tratamentos e cinco repetições, sendo cada repetição composta por um explante. A maior eficiência dentre os tratamentos testados foi o de imersão dos explantes em 6g L⁻¹ do bactericida agrimicina por 20 minutos e as doses testadas não foram tóxicas aos explantes, permitindo o desenvolvimento normal dos mesmos.

Palavras-chave: *Musa sp*; Descontaminação; Cultura de Tecidos de Plantas

DIFFERENTS CONCENTRATIONS OF AGRIMICIN IN THE CONTROL OF CONTAMINATION OF EXPLANTS OF BANANA IN MICROPROPAGATION

SUMMARY: The explants contamination causes great losses in the plants micropropagation, compromising the phase of *in vitro* establishment. With the objective of reducing those contaminations, different concentrations of agrimicin antibiotic were evaluated in the disinfection of the explants of banana. The explants were immersed in concentrations of agrimicin antibiotic with 0g L⁻¹; 1g L⁻¹; 2g L⁻¹; 3g L⁻¹; 4g L⁻¹; 5g L⁻¹; 6g L⁻¹ for twenty minutes and introduced in solid medium MS, with pH 5.8. The establishment was accomplished at growth room with temperature 25 ± 2 °C and photoperiod of 16 hours of light at a luminous intensity of 30 μmol m⁻². The experimental design was entirely randomized with four treatments and five replicates, being each replicate composed by five explants. The largest efficiency among the tested treatments was the immersion of the explants in 6g L⁻¹ do bactericin agrimicin for twenty minutes and the tested doses were not poisonous to the explants, allowing the normal development of the same ones.

Keywords: *Musa spp.*; Descontamination; Plant Cell Culture

INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos principais produtores mundiais de banana. Em 2006, o país apresentou área plantada de 511.151 hectares e área colhida de 504.586 hectares (IBGE 2008).

A utilização de técnicas modernas de biotecnologia como a cultura de tecidos, a manipulação genética e a biologia molecular estão sendo utilizadas para o melhoramento genético de plantas permitindo assim o desenvolvimento de novas variedades (Pereira 2004).

A primeira aplicação comercial da micropropagação foi feita por Morel, no ano de 1960, ao multiplicar orquídeas, mediante cultura de ápices caulinares e regeneração de protocormos (Carvalho et al. 2006).

O sucesso da micropropagação depende da sequência de fases ou etapas, onde o êxito de cada uma é necessário para o êxito da próxima etapa e a introdução do explante no meio de cultivo (George 1993).

Para minimizar a contaminação microbiana, inúmeros protocolos de esterilização são apresentados por diversos autores. Estes relatam o uso de substâncias como hipoclorito de sódio (Pereira et al. 2009) e, em alguns casos, a adição de antibióticos ao meio de cultura (Garcia & Rafael 1990, Leifert et al. 1991, Buckley et al. 1995, Tanprasert & Reed 1998; Reed et al. 1998).

Objetivo deste trabalho foi avaliar as diferentes concentrações do antibiótico agrimicina no controle de contaminações de explantes de bananeira na micropropagação *in vitro*.

MATERIALE MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Centro regional de Pesquisa e Transferência de Tecnologia da EMPAER-MT. O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Empresa Matogrossense de Pesquisa,

Assistência e Extensão Rural S/A - EMPAER-MT, localizado no Município de Várzea Grande-MT. Foram utilizadas mudas de bananeira do tipo chifrinho da cultivar IAC 2001, procedentes do Campo Experimental da EMPAER-MT, localizado no Município de Cáceres-MT. 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 estéril, permitindo assim a redução de seu tamanho. Esses rizomas reduzidos foram mantidos imersos em água deionizada para evitar a desidratação até o momento da extração do meristema. Os tratamentos que constituíram o experimento foram: T1 (testemunha, sem agrimicina); T2 (1g L⁻¹ de agrimicina); T3 (2g L⁻¹ de agrimicina); T4 (3g L⁻¹ de agrimicina) e T5 (4g L⁻¹ de agrimicina), T6 (5g L⁻¹ de agrimicina), T7 (6g L⁻¹ de agrimicina). Os rizomas, em tamanhos reduzidos, ficaram imersos nos respectivos tratamentos durante vinte minutos. A extração dos meristemas foi realizada em condições assépticas e incubados em meio de cultura MS (Murashige & Skoog 1962), suplementado com sacarose a 30 g L⁻¹ e o solidificante phytigel a 2,5 g L⁻¹, com pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (esterilização) a 120°C com 1 Kg f cm⁻² durante vinte minutos. A fase de estabelecimento foi realizada em sala de crescimento com temperatura 25 ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas de luz a uma intensidade luminosa de 30 μ-mol m⁻² s⁻¹. As avaliações foram realizadas aos 30 dias após o estabelecimento dos explantes. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições, sendo cada repetição representada por um explante. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os dados foram processados pelo programa estatístico ESTAT da UNESP de Jaboticabal-SP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com as análises de variância (Tabela 1), os tratamentos utilizando o antibiótico agrimicina em diferentes concentrações para assepsia dos explantes resultaram em diferença significativa para as avaliações realizadas trinta dias após o início do trabalho. Verificou-se que o tratamento com agrimicina com maior eficiência foi T7 com 6g L^{-1} de agrimicina que constatou 0% de contaminação, o T1 com 100% de

contaminação, T2, T3 e T5 com 60%, T4 com 80% e T6 com 40% de contaminação da bactéria *Erwinia sp.*

O tratamento 7 foi o que obteve os melhores resultados no controle de desenvolvimento de microorganismo e diferiu da testemunha (tratamento 1). Para o resultado encontrado faz-se necessário lembrar que a etapa da descontaminação é primordial para ação da agrimicina, como descrevem alguns autores em outros estudos.

Tabela 1. Número e percentagem de contaminação de explantes de bananeira IAC 2001 submetidas a diferentes concentrações de agrimicina na fase de estabelecimento.

| Tratamentos | Médias % de Contaminação |
|--|--------------------------|
| T1 (Testemunha) | 100 a |
| T2 (1g L^{-1} de agrimicina) | 80 ab |
| T3 (2g L^{-1} de agrimicina) | 60 ab |
| T4 (3g L^{-1} de agrimicina) | 60 ab |
| T5 (4g L^{-1} de agrimicina) | 60 b |
| T6 (5g L^{-1} de agrimicina) | 40 b |
| T7 (6g L^{-1} de agrimicina) | 00 b |
| CV (%) | 78,26 |

*Valores seguidos de letras iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Vianna et al. (2003), utilizaram como descontaminante para os explantes de mamoeiro apenas hipoclorito de sódio em diferentes concentrações sendo impossível conseguir explantes sem sinais visíveis de contaminação, principalmente por bactérias.

Pereira et al. (2009), obtiveram maior eficiência na descontaminação de explantes de bananeira IAC 2001, quando utilizou-se hipoclorito de sódio com a dosagem de 1% de cloro ativo.

No estabelecimento in vitro de cultivares de pereira (*Pyrus spp.*), obtiveram contaminação bacteriana em 45,7% das gemas e 18,8% dos

meristemas utilizando-se como rotina de assepsia somente álcool 70% e hipoclorito de sódio (Erig & Fortes 2002).

Naue et al. (2007), verificaram que a adição de antibióticos ao meio de cultura foi necessária no controle de contaminação bacteriana em *Nicotiana tabacum* SP. Alguns fungicidas adicionados ao meio de cultura foram eficientes e controlaram 100% das contaminações fúngicas e a utilização de álcool e hipoclorito de sódio não foram eficientes para controlar os microrganismos contaminantes.

Handa et al. (2005), verificaram em

explantos de pau-rosa (*Aniba rosaeodora*), agrimicina nas concentrações de (0, 300, 400 e 500 mg L⁻¹), tendo a concentração de 300 mg L⁻¹, a maior eficácia.

Imersão de estacas de videira em Jales-SP em solução de agrimicina (1g L⁻¹), durante trinta minutos, resultou em uma perda média de explantes por contaminação de 7,1% em todo o experimento, o que indica, segundo os autores, que a assepsia utilizada foi eficiente (Biasi et al. 1998).

Donato et al. (2005), também adicionaram vários grupos de antibióticos ao meio de cultura para eliminar contaminantes endógenos na micropropagação de cana-de-açúcar. Estes autores relatam que a amoxicilina foi o antibiótico mais eficiente na inibição do crescimento das bactérias *Acetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum spp.*, enquanto que o uso dos antibióticos amoxicilina e cefatoxima sódica, no meio de cultura, nas concentrações empregadas foi eficiente para eliminar a bactéria endofítica *Acetobacter diazotrophicus*. Já o uso dos antibióticos amoxicilina e cefatoxima sódica, não foi eficiente para eliminar a bactéria *Herbaspirillum spp.*

Cunha et al. (2006), testaram os antibióticos sulfato de amicacina, cefoxitina, cefalexina, ceftriaxona e cefadril e apresentaram potencial de uso, pois promoveram a inibição do crescimento dos isolados de bactérias fitopatogênicas testados, sendo que o sulfato de amicacina apresentou melhor resposta para o controle de *Pseudomonas chichorii*, enquanto cefoxitina, cefalexina e cefadroxil foram os mais eficazes para *Rhizobium sp.* e ceftriaxona foi eficaz para os dois isolados testados, superando mycoshield e agrimicina.

Weingaertner & Debiase (2008), para germinação in vitro de sementes de *Dionaea muscipula*, observaram que a imersão durante três dias consecutivos, antes da inoculação, em uma solução asséptica contendo 0,25g. L⁻¹ de Manzate, 1g. L⁻¹ de Benlate e 100mg. L⁻¹ de sulfato de streptomina, resultou em uma desinfestação satisfatória e em 53% na taxas de germinação das sementes.

Pereira et al. (2003), verificaram que os antibióticos cloranfenicol e a tetraciclina (agrimicina) nas concentrações de 64 e 128 mg L⁻¹ foram mais eficientes no controle de bactérias do gênero *Erwinia sp* em explantes de batatas.

Mantovani (2007), obteve controle de bactérias em explantes de urucum usando os antibióticos agrimicina e timentin. Aos 30 dias se obteve 28% de explantes livres de contaminações como também baixa toxicidade.

Lima & Moraes (2006), obtiveram maior eficiência no controle das contaminações com a imersão prévia dos ápices caulinares em hipoclorito a 5%, por vinte minutos, seguida da imersão em 300 mg L⁻¹ rifampicina por vinte minutos e posterior cultivo em meio nutritivo contendo 100 mg L⁻¹ de rifampicina.

CONCLUSÃO

Concluiu-se que a dosagem de 6g L⁻¹ do bactericida agrimicina é capaz de reduzir a contaminação em explantes de bananeira IAC 2001 na micropropagação in vitro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIASI, L.A.; PASSOS, I.R.S.; POMMER, C. V. Micropropagação do porta-enxerto de videira jales. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.33, n.10, p.1587-1594, 1998.

BUCKLEY, P.; DeWILDE, T; REED, B. Characterization and identification of bacteria isolated from micropropagated mint plants. In Vitro Cellular & Developmental Biology. Germany, v.31, p. 58-64, 1995.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L. Fatores Inerentes à micropropagação. Campina Grande-PB: Embrapa, 2006. p. 11-25. (Documentos 148).

CUNHA, J.F; PICOLI, E. A.T; ALFENAS, A..C; GONÇALVES, R.C. Efeito in vitro de antibióticos e rizobactérias no controle de bactérias fitopatogênicas ao *Eucalyptus spp.* Revista Árvore, Viçosa-MG, v.30, n.6, p.871-

876, 2006.

DONATO, V. M. T. S; ANDRADE , A. G; TAKAKI, G. M. C; MARIANO, R. L. R; MACIEL, G.A. Plantas de cana-de-açúcar cultivadas in vitro com antibióticos. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 29, n. 1, p. 134-141, 2005.

ERIG, A C.; FORTES, G. R. Estabelecimento de pereira (*Pyrus spp.*) in vitro a partir de meristemas e gemas. *Revista Ciência Rural*, Santa Maria-RS. v. 32, p. 577-582, 2002.

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

GEORGE, E.F. Plant Propagation by tissue culture: The Technology. 2 ed London: Exegetics. Inglaterra, p.98-165, 1993.

HANDA, L.; SAMPAIO, P.; QUISEN, R.; Cultura in vitro de embriões e de gemas de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaodora Ducke*). *Acta amazônica*, Manaus-AM, v.35, p. 29-33, 2005.

IBGE, Censo agropecuário e produção agrícola nacional. www.ibge.gov.br 2008.

LIMA, J.D.; MORAES, W.S. Controle de bactérias contaminantes em explantes de bananeira (*musa aaa cv. Caipira*). *Goiânia, Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 36, n.3. p. 181-186, 2006.

LEIFERT, C.; RITCHIE, J. Y.; WAITES, W. M. Contaminantes of plant-tissue and cell cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Netherlands, v.7, p. 452-469, 1991.

MANTOVANI, N.C. Propagação vegetativa e cultivo in vitro de *Bixa orellana* L e *Ginkgo biloba* L. In: Tese de Doutorado, UFV, Lavras-MG, p. 41-57, 2007.

MURASHIGE, T; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. Copenhagen, v.15, n.3 p.473-497, 1962.

NAUE, C.R; BENITIZ, L.B; MEDEIROS, C. V. Eliminação de contaminantes microbianos da cultura de tecidos de *Nicotiana tabacum* L. In: XVI Congresso Iniciação Científica, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Resumos. Pelotas-RS, 2007, p. 1-5.

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.

PEREIRA, G. A. Uso do gene xylA - xilose isomerase como agente de seleção na transformação genética de citros. 2004. p. 01-03. Dissertação. ESALQ. 2004.

PEREIRA, G. A.; RIBEIRO, B. V.; MARCÍLIO, H. C.; SANTAELLA, M. B. Desinfestação e estabelecimento in vitro de explantes de bananeira 'IAC 2001' em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. *Tecnologia & Ciência Agropecuária*., João Pessoa-PB, v.3, n.2, p.43-46, 2009.

REED, B.M.; MENTZER, J.; TANPRASERT, P.; YU, X.. Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut: Identification and antibiotic treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Netherlands, v.52, p. 67-70, 1998.

TANPRASERT, P; REED, B. Detection and identification of bacterial contaminants os strawberry runner explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Netherlands, v. 52, p. 53-55, 1998.

VIANNA, G.R.; COUTO, F. A. A.; OLIVEIRA, A.

B.; ZAMBOLIM, L.; MARIA, J. Arifampicina na descontaminação bacteriana de explantes de mamoeiro provenientes do campo. *Bragantina*, v. 56, n.2. Campinas. p. 249-254, 2003.

WEINGAERTNER, D.; DEBIASI, C. Estabelecimento in vitro de *Dionaea muscipula*. Programa de Pós-Graduação. Laboratório de Biotecnologia, Micropropagação Vegetal, Departamento de Ciências Naturais, FURB, Blumenau. 2008.